

УДК 577.151

**СЕКРЕТИРУЕМАЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗА
BACILLUS INTERMEDIUS: ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕННОГО
ПРЕПАРАТА ФЕРМЕНТА И ИССЛЕДОВАНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

*Н.Л. Рудакова, А.Р. Сабирова, А.Р. Каюмов, А.М. Марданова,
Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова*

Аннотация

Исследованы динамика роста и накопления протеолитической активности рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* BG 2036, несущего на плазмиде *pCM4* ген секретлируемой металлопротеиназы *Bacillus intermedius*. Разработан эффективный метод получения гомогенного препарата фермента из культуральной жидкости с применением гидрофобных сорбентов бацитрацин-силохрома и бутил-сефарозы. Изучены чувствительность металлопротеиназы к различным ингибиторам, влияние ионов двухвалентных металлов на активность фермента, а также некоторые физико-химические свойства.

Ключевые слова: металлопротеиназа, гомогенный белок, гидрофобный сорбент, *Bacillus subtilis*.

Введение

Секретируемые металлопротеиназы – особая группа протеолитических ферментов, выполняющих в клетке широкий спектр функций: от общих трофических до специфических регуляторных. Большой интерес для исследования представляют минорные металлопротеиназы, доля которых в общем пуле протеолитической активности не превышает 10%. Низкий уровень активности фермента может свидетельствовать о том, что белок выполняет специфическую функцию в клетках бактерий. В связи с этим представляет интерес исследование его физико-химических свойств и субстратной специфичности. Для решения этих задач необходимо разработать эффективный способ выделения белка и его очистки до гомогенного состояния.

При разработке метода выделения и очистки фермента перспективным является использование генно-инженерных штаммов, содержащих на плазмиде ген индивидуального фермента, что позволяет избежать контаминации белковых примесей при получении гомогенного препарата фермента.

Рекомбинантный штамм *B. subtilis* был получен путем трансформации плазмиды *pCM4*, несущей ген секретлируемой металлопротеиназы *B. intermedius*, в лабораторный протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG 2036, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам. Использование модельного штамма позволило избежать наложения пула контаминирующих белков при получении гомогенного препарата фермента.

Целью работы явилось создание эффективного метода получения гомогенного препарата секретируемой металлопротеиназы *Bacillus intermedius 3-19* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis BG 2036* и изучение некоторых свойств гомогенного белка.

1. Материалы и методы

1.1 Бактериальный штамм и условия культивирования. В работе использовали рекомбинантный штамм *B. subtilis BG 2036*, несущий на мультикопийной плазмиде *pSM4* ген секретируемой металлопротеиназы *B. Intermedius 3-19*. Штаммом-реципиентом служил штамм *B. subtilis BG 2036*, из хромосомной ДНК которого были делетированы гены внеклеточных протеиназ (штамм любезно предоставлен проф. Е. Феррарри, Genencor Int. Inc. USA). В работе использовали плазмиду *pSM4*, несущую 6 kb фрагмент геномной ДНК *B. Intermedius 3-19* с геном металлопротеиназы под собственным промотором.

Культивирование рекомбинантного штамма проводили на среде, описанной ранее [1], на вибростенде («В. Braun», Германия) при 200 об/мин в течение 30 ч. Соотношение объема среды к объему колбы составляло 1 : 7. Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием в течение 20 мин при 8 тыс. об/мин.

1.2. Реагенты для выделения фермента. Для выделения фермента использовали бацитрацин-силохром, синтезированный на химическом факультете МГУ (г. Москва) [2], ДЭАЭ- и КМ-целлюлозу («Sigma», США), бутил-сефарозу HiTrap («Pharmacia», США).

1.3. Выделение фермента. Выделение металлопротеиназы *B. intermedius* из 1 л культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* проводили с помощью дробного фракционирования сульфатом аммония с разными интервалами насыщения: 0.3–0.8; 0.2–0.8; 0.3–0.7 и 0.2–0.7. Сульфатаммонийную фракцию диализовали против 0.05 М трис-НСl буфера рН 7.3 до исчезновения следов сульфата аммония (контроль – 5% BaCl₂). Очистку диализата сульфатаммонийной фракции проводили на колонке (1 см × 13 см) с бацитрацин-силохромом, уравновешенным 0.05 М трис-НСl буфером рН 7.3, содержащим 5 мМ Ca²⁺. Элюцию проводили тем же буфером, содержащим 1 М NaCl и 7% изопропанола. Фракции с высокой протеолитической активностью объединяли и диализовали против 0.05 М трис-НСl буфера рН 7.3 с 5 мМ Ca²⁺. Для получения гомогенного фермента использовали два способа очистки с целью выбора наилучшего варианта.

1.3.1. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозе. Фракцию фермента после очистки на бацитрацин-силохроме и диализа помещали на колонку (1 см × 7 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной 0.01 М трис-НСl буфером рН 8.0 с 5 мМ Ca²⁺. Элюцию проводили тем же буфером, содержащим 0.6 М NaCl. Активные фракции белка объединяли, диализовали против 0.02 М Na-ацетатного буфера рН 6.8 с 5 мМ Ca²⁺ и помещали на колонку (1 см × 7 см) с КМ-целлюлозой, уравновешенной 0.02 М Na-ацетатным буфером с рН 6.8, содержащим 5 мМ Ca²⁺.

1.3.2. Очистка фермента на гидрофобном носителе бутил-сефарозе.

На колонку с бутил-сефарозой объемом 1 мл, уравновешенной 0.05 М трис-НСl буфером рН 7.3 с 5 мМ Ca^{2+} , содержащим 35% сульфата аммония, помещали фермент, полученный после очистки на бацитрацин-силохроме и диализа против 0.05 М трис-НСl буфера рН 7.3 с 5 мМ Ca^{2+} . Элюцию проводили тем же буфером с понижением концентрации сульфата аммония до 20–15%.

Полученные после каждого способа очистки фракции собирали и диализовывали против 0.05 М трис-НСl буфера рН 7.3 с 5 мМ Ca^{2+} .

Степень чистоты полученных препаратов и молекулярную массу определяли методом электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лаэммли [3]. Окраску проводили двумя красителями: Coomassie Brilliant Blue (SERVA) и раствором ZnCl_2 . Было установлено, что точность определения молекулярной массы белка при использовании раствора ZnCl_2 составляет 30 нг белка [4]. Перед окрашиванием гель выдерживали в течение 10 мин в 0.2 М растворе имидазола, а затем переносили в 0.3 М раствор ZnCl_2 . В результате наблюдалось негативное окрашивание белковых полос. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду.

Молекулярную массу фермента определяли электрофоретически, используя маркерные белки («Sigma»).

Протеолитическую активность металлопротеазы определяли по расщеплению азоказеина [5]. К 100 мкл субстрата (раствор азоказеина («Sigma», США) в концентрации 10 мг/мл в 0.05 М трис-НСl буфере рН 7.3 с 5 мМ Ca^{2+}) добавляли 50 мкл белка и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, затем реакционную смесь осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой и выдерживали 10 мин на ледяной бане. Далее пробы центрифугировали 7 мин при 13 тыс. об/мин, отбирали 250 мкл супернатанта и добавляли 50 мкл 4 н NaOH. Контрольным являлся образец, в котором изначально к субстрату добавляли ТХУ, выдерживали вместе с опытными пробами в течение 1 ч при 37 °С, а затем добавляли 50 мкл фермента. Против данного контроля проводили измерение на спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин. Удельную активность определяли как отношение единицы активности к единице белка по A_{280} и выражали в ед/мг белка.

Белок определяли спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует поглощению A_{280} , равному единице в кювете толщиной 1 см.

Для выяснения влияния различных ингибиторов на активность металлопротеиназы гомогенный препарат белка выдерживали в присутствии ингибитора в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего определяли остаточную активность по гидролизу азоказеина по описанной выше методике. Остаточную активность выражали в процентах относительно контроля, активность которого в отсутствие ингибиторов принимали за 100%. Используемые в работе ингибиторы («Sigma», Германия) – EDTA (неспецифический ингибитор металлопротеиназ), 1,10-фенантролин (специфический ингибитор металлопротеиназ), PMSF (специфический ингибитор сериновых протеиназ), парахлормеркурий-

бензоат и HgCl_2 – добавляли к ферменту в соотношениях фермент : ингибитор, составляющих 1 : 10 и 1 : 100.

При изучении влияния ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы использовали хлориды кальция, магния, кобальта, меди и никеля в конечной концентрации от 1 до 20 мМ, а хлорид цинка – от 0.01 до 20 мМ. К ферментным растворам добавляли указанные растворы двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем по описанной ранее методике определяли активность фермента и выражали ее в процентах относительно контроля. Контролем (100%) служил уровень активности фермента в отсутствие ионов металлов.

pH-Оптимум активности фермента определяли по гидролизу азоказеина в 0.05 М трис-НСI буфере pH 7.3 с 5 мМ Ca^{2+} в интервале pH от 7.2 до 9.5.

Для анализа экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних.

2. Результаты и их обсуждение

Исследование динамики роста и накопления протеолитической активности металлопротеазы рекомбинантного штамма *B. subtilis* показало, что активность фермента появляется в культуральной жидкости на 20-й час роста, ее уровень достигает максимума на 29–31-й ч роста, что соответствует стационарной фазе роста культуры. Протеолитическая активность контрольного безпротеазного штамма *B. Subtilis BG 2036* обнаруживается в следовых количествах по сравнению с уровнем активности рекомбинантного штамма (рис. 1).

Для получения гомогенного белка дальнейшая работа была направлена на разработку эффективного метода очистки металлопротеиназы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*.

Первым этапом выделения фермента было проведение дробного фракционирования сульфатом аммония. При исследовании 4 интервалов насыщения культуральной жидкости сульфатом аммония было установлено, что оптимальным является интервал насыщения 0.2–0.7. В этом случае достигался максимальный выход белка (около 50%), степень очистки составляла 20 (табл. 1). В дальнейшей работе использовали фракцию фермента, полученную при насыщении сульфатом аммония в интервале 0.2–0.7.

Диализат сульфатаммонийной фракции подвергали хроматографической очистке на гидрофобном носителе бацитрацин-силохроме, с помощью которого удалось повысить степень очистки фермента в 2 раза по сравнению с предыдущей стадией, выход составил 19% (табл. 2).

SDS-электрофорез показал наличие 4 белковых полос (рис. 2, дорожка 3).

Для получения гомогенного фермента использовали два способа, описанных в разделе «Материалы и методы».

1-й способ – сочетание методов ионообменной хроматографии на ДЭАЭ и КМ-целлюлозе. Полученный после обработки на бацитрацин-силохроме и диализа ферментный раствор подвергали хроматографической очистке на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, что позволило увеличить степень очистки в 2.2 раза по сравнению со степенью очистки фермента на бацитрацин-силохроме (табл. 3).

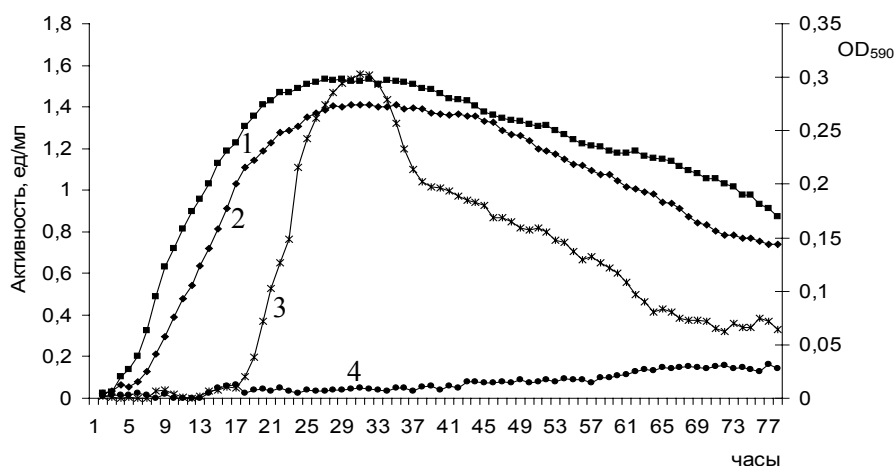


Рис. 1. Динамика роста и накопления протеолитической активности: 1 – рост беспротеазного штамма, 2 – рост рекомбинантного штамма, 3 – протеолитическая активность рекомбинантного штамма, 4 – протеолитическая активность беспротеазного штамма

Табл. 1

Дробное фракционирование сульфатом аммония металлопротеиназы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Интервал насыщения сульфатом аммония	Степень очистки	Выход, %
0.3–0.8	9.5	10.2
0.2–0.8	10	40.5
0.3–0.7	9.1	16.8
0.2–0.7	20	47.5

Табл. 2

Выделение металлопротеиназы из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis*

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ , общ., мг	Активность, общ., ед. акт.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход, %
Культуральная жидкость	760	11400	595	0.05	1	100
Диализат сульфат-аммонийной фракции	24	312	322	1.03	20.6	54
Хроматография на бацитрацин-силохроме	149	47.5	114.3	2.41	48.2	19.2

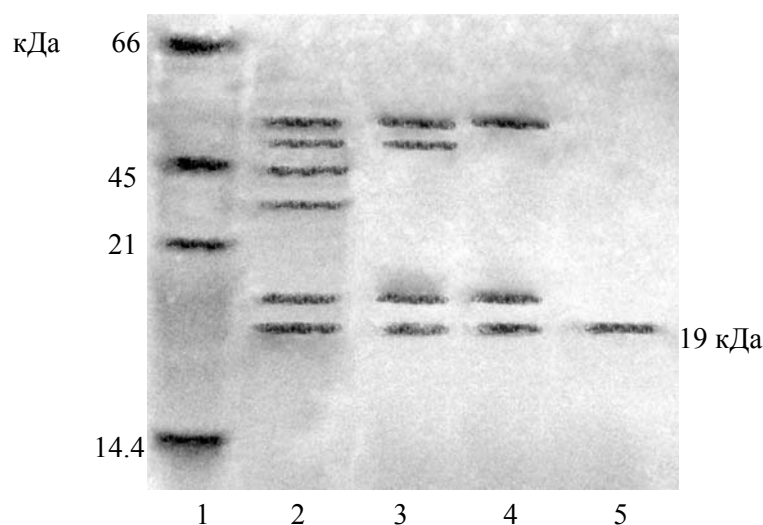


Рис. 2. SDS-электрофорез в ПААГ: 1 – маркеры: BSA (66 кДа), альбумин (45 кДа), папаин (21 кДа), лизоцим (14.4 кДа), 2 – фракция белка после осаждения сульфатом аммония, 3 – фракция белка после очистки на бацитрацин-силохроме, 4 – фракция белка после ионообменной хроматографии (ДЭАЭ-целлюлоза), 5 – фракция белка после очистки на бутил-сефарозе

Табл. 3

Очистка металлопротеиназы методом ионообменной хроматографии

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ , общ., мг	Активность, общ., ед. акт.	Удельная активность, ед./мг	Степень очистки	Выход, %
Хроматография на бацитрацин-силохроме	7	2.23	5.37	2.41	1	100
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	4	0.156	2.38	5.31	2.2	44.3
Хроматография на КМ-целлюлозе	5	0.135	1.74	2.9	1.2	32.4

SDS-электрофорез показал наличие 3 полос белка (рис. 2, дорожка 4).

Следующий этап очистки фермента на КМ-целлюлозе не привел к увеличению степени очистки, так как белок не сорбировался на катионообменнике, а в собранной после прохождения через КМ-целлюлозу белковой фракции терялась значительная часть активности (табл. 3). Таким образом, ионообменная хроматография на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозе не позволила получить гомогенный фермент.

2-й способ – хроматография на гидрофобном носителе бутил-сефарозе. Для работы с носителем предварительно следует подобрать концентрацию сульфата аммония, максимально близкую к той, при которой протеолитическая активность белка начинает резко снижаться, свидетельствуя о начале осаждения белка сульфатом аммония. Нами было установлено, что концентрация сульфата аммония в растворе фермента, при которой его активность резко снижается, составляет 35%. Фракцию фермента, полученную после хроматографии на бацитрацин-

силохроме, помещали на колонку с бутил-сефарозой и проводили хроматографическую очистку так, как описано в разделе «Материалы и методы». Удельная активность фермента повысилась в 4 раза по сравнению с предыдущей стадией, выход составил около 14% (табл. 4).

SDS-электрофорез показал наличие одной белковой полосы после хроматографии на бутил-сефарозе. Окраску геля проводили раствором Кумасси и раствором ZnCl₂. В обоих случаях наблюдали наличие только одной белковой полосы, свидетельствующей о гомогенности препарата (рис. 2, дорожка 5).

Таким образом, разработан способ получения гомогенного препарата металлопротеиназы из рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 pCM4.

Молекулярная масса металлопротеиназы, определенная электрофоретически, составляет 19 кДа (рис. 2).

Табл. 4

Очистка на бутил-сефарозе фермента, полученного после очистки на бацитрацин-силохроме

Стадии очистки	V, мл	A ₂₈₀ , общ., мг	Актив- ность, общ., ед. акт.	Удельная актив- ность, ед./мг	Сте- пень очист- ки	Вы- ход, %
Диализат сульфатаммонийной фракции	24	312	322	1.03	1	100
Хроматография на бацитрацин-силохроме	149	47.5	114.3	2.41	2.07	35.5
Хроматография на бутил-сефарозе	44.7	5.14	43.8	8.52	8.27	13.6

Исследование влияния различных ингибиторов на активность металлопротеиназы показало практически полное ингибирование активности белка в присутствии 1,10-фенантролина, а также высоких концентраций EDTA; белок не ингибируется PMSF. Эти результаты подтверждают, что белок относится к классу металлопротеиназ. Высокие концентрации парахлормеркурийбензоата ингибируют активность фермента, что позволяет предположить наличие цистеина в молекуле фермента (табл. 5).

Табл. 5

Влияние ингибиторов на активность металлопротеиназы *B. intermedius*

Ингибитор	Остаточная активность, % фермент : ингибитор	
	1 : 10	1 : 100
EDTA	96	5.7
1,10-фенантролин	5.8	0
PMSF	93.9	91.2
парахлормеркурийбензоат	94.2	1.9
HgCl ₂	51.1	39.7

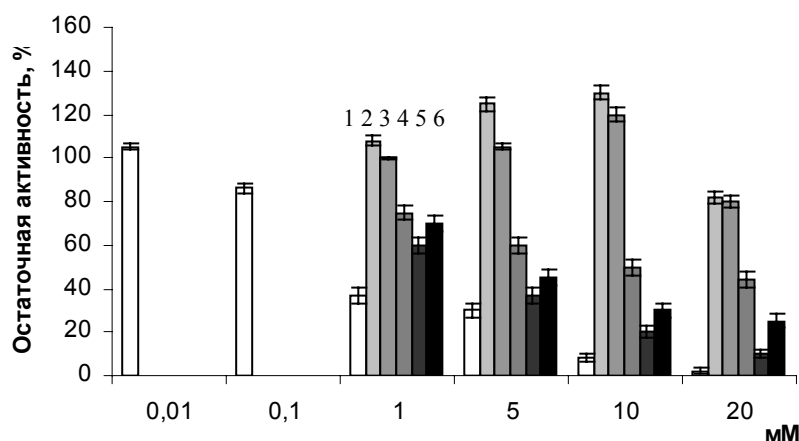


Рис. 3. Влияние ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы: 1 – Zn²⁺; 2 – Ca²⁺; 3 – Mg²⁺; 4 – Co²⁺; 5 – Cu²⁺; 6 – Ni²⁺ (представлено в виде доверительных интервалов для долей)

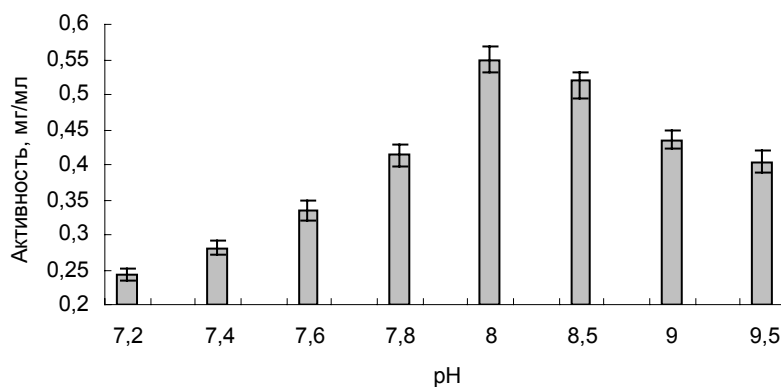


Рис. 4. pH-оптимум металлопротеиназы: представлены 95%-ные доверительные интервалы для истинной медианы ($n = 15$)

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на активность металлопротеиназы показало, что Ca²⁺ и Mg²⁺ в концентрации 10 мМ повышают активность фермента на 30% и 20% соответственно. Co²⁺, Cu²⁺ и Ni²⁺ в концентрациях от 1 до 20 мМ снижают активность металлопротеиназы, причем с увеличением концентрации это снижение более значительно. Низкие концентрации Zn²⁺ (0.01 мМ) практически не влияют на активность фермента, увеличение его концентрации приводит к резкому снижению активности металлопротеиназы (рис. 3). Это согласуется с данными литературы. Так, при исследовании нейтральной протеиназы *B. cereus* было показано, что добавление в раствор апофермента 10 мкМ ионов Zn полностью восстанавливало его активность [6]. Для цинковой эндопептидазы термолизина установлено, что внесение в раствор фермента ионов Zn в концентрации более 10 мкМ ингибирует его активность [7].

Исследовали pH-оптимум гомогенного белка (рис. 4). Установлено, что pH-оптимум фермента в 0.05 М трис-НСl буфере с 5 мМ Ca²⁺ соответствует 8.0, что дает основание называть фермент щелочной эндопептидазой.

Таким образом, нами разработан эффективный способ получения гомогенного препарата металлопротеиназы рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* BG 2036 *pCM4* и определены некоторые свойства этого фермента.

Авторы выражают благодарность профессору С.В. Кострову за предоставленную плазмиду *pCM4*, профессору Е. Феррарри за предоставленный протеазодефицитный штамм *Bacillus subtilis* BG 2036, а также доктору Г. Лохнит за помощь в определении N-концевой последовательности зрелого белка методом Эдмана.

Работа поддержана грантами РФФИ (проект № 09-04-99044 р-офи), Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № П406 от 12.05.2010) и Аналитической ведомственной целевой федеральной программы (РНП 2.11.1005).

Summary

N.L. Rudakova, A.R. Sabirova, A.R. Kayumov, A.M. Mardanova, N.P. Balaban, M.R. Sharipova. Bacillus intermedius Secreted Metalloproteinase: Homogeneous Enzyme Receiving and Physicochemical Properties Investigation.

Growth dynamics and proteolytic activity of recombinant strain *Bacillus subtilis* BG 2036 carrying *Bacillus intermedius* secreted metalloproteinase gene on the plasmid *pCM4* were investigated. The efficient method for homogeneous enzyme isolation from culture broth using hydrophobic sorbents bacitracin-sylochrom and butyl-sepharose was created. Inhibitor analysis, bivalent metal ions influence and some physicochemical properties of metalloproteinase were studied.

Key words: metalloproteinase, homogeneous enzyme, hydrophobic sorbent, *Bacillus subtilis*.

Сокращения

SDS – sodium dodecyl sulfate
PMSF – phenylmethanesulfonyl fluoride
BSA – bovine serum albumin
ПААГ – полиакриламидный гель
ТХУ – трихлоруксусная кислота
EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid
ДЭАЭ-целлюлоза – диэтиламиноэтил-целлюлоза
КМ-целлюлоза – карбоксиметил-целлюлоза

Литература

1. Габдрахманова Л.А., Балабан Н.П., Шарипова М.Р., Токмакова Ю.С., Соколова Е.А., Руденская Г.Н., Лецинская И.Б. Оптимизация среды культивирования для продукции глутамилэндопептидазы *Bacillus intermedius* 3–19 // Микробиол. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 323–329.
2. Stepanov V.M., Rudenskaya G.N. Proteinase affinity chromatography on bacitracin-Sepharose // J. Appl. Biochem. – 1983. – V. 5, No 6. – P. 420–428.

3. Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250. – URL: http://www.molbiol.ru/protocol/17_02.html, свободный.
4. Окрашивание белковых SDS PAAG с помощью Imidazol/Zn. – URL: http://www.molbiol.ru/protocol/17_03.html, свободный.
5. Charney J., Tomarelli R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice // J. Biochem. – 1947. – V. 177. – P. 501–505.
6. Feder J., Keay L., Garrett L.R., Cirulis N., Moseley M.N., Wild B.S. Bacillus cereus neutral protease // Biochim. Biophys. Acta. – 1971. – V. 251, No 1. – P. 74–78.
7. Roche R.S., Voordouw G. The structural and functional roles of metal ions in thermolysin // CRC Crit. Rev. Biochem. – 1978. – V. 5. – P. 1–23.

Поступила в редакцию
18.09.09

Рудакова Наталья Леонидовна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: puphen@rambler.ru

Сабирова Альбина Рушановна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: albina12@mail.ru

Каюмов Айрат Рашитович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: airat_kayumov@rambler.ru

Марданова Айслу Миркасимовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Ayslu.Mardanova@ksu.ru

Балабан Нэлли Павловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: NellyBalaban@yandex.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Margarita.Sharipova@ksu.ru