

УДК 579.842.21:579.23'314

## О ПОЛУЧЕНИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ БАКТЕРИЙ *SERRATIA MARCESCENS*

Р. Шах Махмуд, М.Н. Филимонова

### Аннотация

В статье показана возможность получения цитоплазматической фракции грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* в результате нарушения целостности цитоплазматической мембраны сферопластов осмотическим шоком. Осмотическим раствором служил 1 мМ водный раствор фенолметилсульфонилфторида, который добавляли в соотношении сферопласты/осмотический раствор 1 : 80 ÷ 1 : 1600. Получение цитоплазматической фракции описанным способом является простым и быстрым и не требует специального оборудования и реактивов. Установлена устойчивость части сферопластов к осмотическому шоку, что предполагает высокую способность цитоплазматической мембраны клеток *S. marcescens* к растягиванию.

**Ключевые слова:** бактерии *Serratia marcescens*, цитоплазматическая фракция, сферопласты, осмотический шок.

### Введение

Грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* являются продуцентами ряда внеклеточных гидролаз, в том числе эндонуклеазы [1–4]. Эндонуклеаза *S. marcescens* (КФ 3.1.4.9) – дезоксирибонуклеат(рибонуклеат)-5'-нуклеотидогидролаза – один из наиболее изученных ферментов в ряду бактериальных нуклеаз с широкой специфичностью [5–14]. Благодаря биологической активности эндонуклеазу промышленно производят и применяют на практике [15–17]. Есть сведения о биосинтезе и секреции этого фермента [12, 18–20]. Однако в целом этот процесс изучен недостаточно в силу его сложности и многоэтапности. Исследование данного вопроса непосредственно связано с качественным и количественным анализом как культуральной жидкости, так и периплазматической и цитоплазматической фракций. Получение этих фракций представляет собой многоступенчатую последовательность операций, универсально используемую исследователями для самых разных организмов. Между тем известно, что цитоплазматическую фракцию можно получать и просто осмотическим шоком. Однако нет опубликованных сведений о получении цитоплазматической фракции грамотрицательных бактерий *S. marcescens* таким способом, чем и была обусловлена цель настоящей работы – определить возможность получения цитоплазматической фракции бактерий *S. marcescens* с помощью осмотического шока.

### Материалы и методы

В исследовании использовали бактерии *S. marcescens* W1050, предоставленные профессором М. Бенедиком, Университет г. Хьюстона (США). Бактерии выращивали 12 ч при 37 °С на скошенном МПА и смывали 0.5%-ным NaCl. Клетки отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 5000 об/мин и промывали 5–6 раз 0.5%-ным NaCl. Для разрушения внешней мембраны и клеточной стенки клетки дважды промывали 10 mM Трис-HCl буфером, pH 8.0, и затем инкубировали 30 мин при комнатной температуре в 30 mM Трис-HCl буфере, pH 8.0, содержавшем 60% сахарозу, 1 mM фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ), 10 mM ЭДТА и 0.2% лизоцим [21].

Сферопласты выделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Наличие сферопластов подтверждали светлопольной микроскопией, предварительно окрасив препараты по Граму.

При исследовании эффективности разрушения цитоплазматической мембраны при разных соотношениях сферопласты/осмотический раствор (1 mM водный раствор ФМСФ) сферопласты быстро смешивали с охлажденным раствором и инкубировали 10 мин в ледяной бане с периодическим перемешиванием. Затем смесь замораживали при –14 °С и оттаивали при комнатной температуре. Образовавшиеся фрагменты цитоплазматической мембраны и оставшиеся сферопласты отделяли центрифугированием (12000 об/мин, 20 мин). При оптимизации условий из описанной последовательности операций исключили стадию замораживания/оттаивания, а само разрушение цитоплазматической мембраны проводили при соотношении сферопласты/осмотический раствор, равном 1 мг : 80 мкл.

Эффективность разрушения оценивали по содержанию сферопластов в осадке и поглощению надосадочной жидкости при 260 и 280 нм. Для корректной оценки содержания материала, поглощающего ультрафиолет (УФ), полученные значения нормализовали, приводя к общему объему.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых математических средств для доверительного интервала 95%.

### Результаты и обсуждение

Установлено нарушение целостности цитоплазматической мембраны грамотрицательных бактерий *S. marcescens* осмотическим шоком, что подтверждено появлением в окружающей среде (супернатант) значительного количества материала, поглощающего свет при 260 и 280 нм (рис. 1 и 2). Доминирование адсорбции при 260 нм над адсорбцией при 280 нм свидетельствует о том, что в состав супернатанта входили нуклеотидосодержащие вещества, к которым принадлежат нуклеиновые кислоты. Поскольку в клетках прокариот цитоплазма является основным местом локализации нуклеиновых кислот, можно заключить, что супернатант – это цитоплазматическая фракция, образованная в результате повреждения цитоплазматической мембраны.

Как видно из рис. 1 и 2, с увеличением соотношения сферопласты/осмотический раствор содержание УФ-поглощающих веществ в цитоплазматической фракции возрастало.

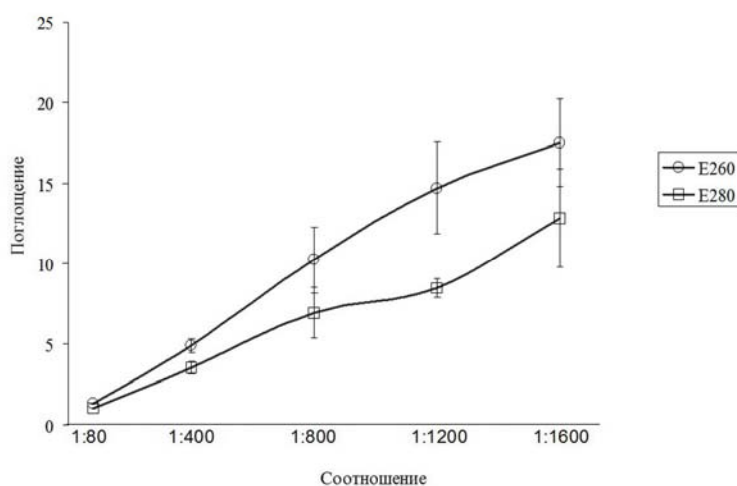


Рис. 1. Нормализованное поглощение (ед./мл) при 260 (-o-) и 280 нм (-□-) цитоплазматической фракции, полученной при разном соотношении сферопласты/осмотический раствор. Здесь и далее дано среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка;  $n = 3$

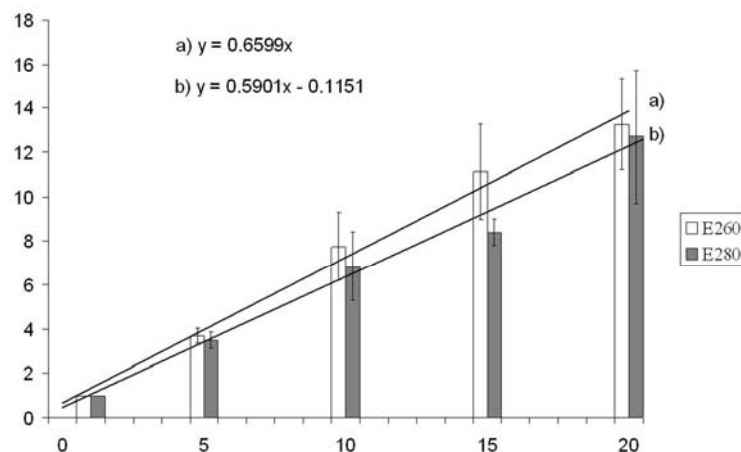


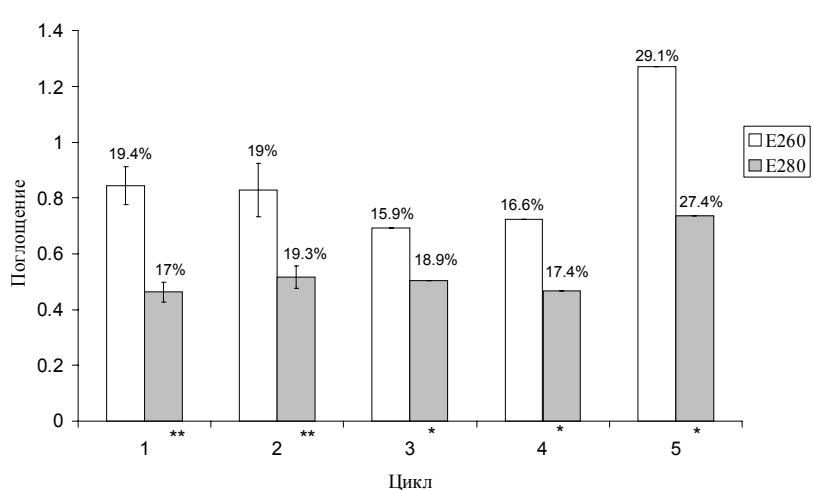
Рис. 2. Кратность изменения содержания УФ-поглощающего материала (ось  $y$ ) и соотношения сферопласты/осмотический раствор (ось  $x$ ). Соотношение сферопласты/осмотический раствор 1 : 80 и абсолютные значения поглощения при этом соотношении приняты за 1;  $a$  и  $b$  – линии и уравнения тренда

Зависимость прироста поглощения от объема осмотического раствора приближалась к линейной при соотношении сферопласты/осмотический раствор 1 : 80 ÷ 1 : 800. Дальнейшее увеличение соотношения до 1 : 1200 ÷ 1:1600 сопровождалось небольшим замедлением прироста содержания УФ-поглощающего материала. Следует заметить, что при всех исследованных соотношениях в преципитате оставались сферопласты, что указывало на устойчивость части сферопластов к действию осмотического шока в подобранных условиях. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, с одной стороны, о возможности разрушения цитоплазматической мембраны осмотическим шоком и получении цитоплазматической фракции, с другой – о необходимости оптимизации условий с целью повышения эффективности процесса разрушения.

Табл. 1

УФ-поглощение цитоплазматической фракции (ед./мл), полученной при разных условиях

Условия	Длина волны, нм	
	260	280
С замораживанием/оттаиванием	0.983 ± 0.0475*	0.56 ± 0.0283*
Без замораживания/оттаивания	0.844 ± 0.0688**	0.495 ± 0.0425**

\*  $n = 2$ ; \*\*5.Рис. 3. Содержание УФ-поглощающего материала (ед./мл) в цитоплазматических фракциях, полученных под действием пяти циклов осмотического шока (\* $n = 1$ , \*\*5; содержание УФ-поглощающего материала в сумме равно 100%)

Исследование влияния замораживания/оттаивания на разрушение сферопластов выявило неэффективность этой стадии. Как видно из табл. 1, цитоплазматические фракции, полученные с замораживанием/оттаиванием сферопластов и без них, не имели достоверных различий по содержанию УФ-поглощающего материала. Полученные данные были подтверждены результатами светлопольной микроскопии: сравниваемые препараты содержали сферопласты примерно в равных количествах. Таким образом, из последующего исследования стадия замораживания/оттаивания сферопластов была исключена.

С целью сокращения объема выделяемой цитоплазматической фракции осмотический раствор, разделив на порции, добавляли к сферопластам дробно (в несколько этапов) и анализировали динамику содержания УФ-поглощающего материала в супернатанте. Результаты представлены на рис. 3. Из рисунка видно, что за исключением пятой остальные фракции содержали одинаковое количество УФ-поглощающего материала, так как разница значений была недостоверной. Выявленная тенденция проявлялась и при 280 и при 260 нм.

В сумме содержание УФ-поглощающего материала во всех 5 фракциях соответствовало тому количеству материала, которое было получено в результате добавления эквивалентного количества (400-кратный избыток) осмотического раствора в один прием. В связи с этим можно заключить, что способ добавления осмотического раствора не оказывал существенного влияния на результат – получение цитоплазматической фракции под действием осмотического шока.

Таким образом, мы показали возможность получения цитоплазматической фракции грамотрицательных бактерий *S. marcescens* в результате нарушения осмотическим шоком целостности цитоплазматической мембраны предварительно подготовленных сферопластов. Осмотическим раствором служил 1 мМ водный раствор ФМСФ, который добавляли в соотношении сферопласты/осмотический раствор 1 : 80 ÷ 1 : 1600. Так как часть сферопластов оставалась устойчивой к осмотическому шоку, что, очевидно, обусловлено их физиологическим состоянием, можно сделать заключение о высокой способности цитоплазматической мембраны клеток *S. marcescens* к растягиванию. Выявленная устойчивость свидетельствовала о нецелесообразности дальнейшего увеличения объема осмотического раствора. Получение цитоплазматической фракции описанным способом является простым и быстрым, что и требуется при проведении анализа динамики состава цитоплазмы клеток живых организмов, в частности грамотрицательных бактерий *S. marcescens*.

### Summary

*R. Shah Mahmud, M.N. Filimonova.* About Preparation of Cytoplasmic Fraction from Bacterium *Serratia marcescens*.

Preparation of a cytoplasmic fraction from gram-negative bacteria *Serratia marcescens* as a result of disruption of the spheroplast membrane by osmotic shock was demonstrated to be realistic. The osmotic solution 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride was used at the spheroplast/osmotic solution ratio 1 : 80 ÷ 1 : 1600. The preparation of cytoplasmic fraction by the described method is fast and easy to use without special equipment and reagents. Resistance of some the spheroplasts to osmotic shock was found, which suggested a high extent of straining the cytoplasmic membrane of *S. marcescens* cells.

**Key words:** bacteria *Serratia marcescens*, cytoplasmic fraction, spheroplasts, osmotic shock.

### Литература

1. Лецинская И.Б., Богаутдинов З.Ф. Нуклеазы *Serratia marcescens* // Микробиол. – 1963. – Т. 32, № 3. – С. 412–415.
2. Порфирьева О.В., Юсупова Д.В., Зоткина Н.Л., Соколова Р.Б., Габдрахманова Л.А. Хитиноподобный комплекс *Serratia marcescens* и особенности его биосинтеза // Микробиол. – 1997. – Т. 66, № 3. – С. 347–353.
3. Bromke B.J., Hammel J.M. Regulation of extracellular protease formation by *Serratia marcescens* // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25, No 1. – P. 47–27.
4. Heller K.B. Lysoytic activity copurified with the outer membrane of *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. – 1979. – V. 140, No 3. – P. 1120–1122.
5. Miller M., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M., Krause K. A structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA // Nature Struct. Biol. – 1994. – V. 1, No 7. – P. 461–468.
6. Friendhoff P., Kolmes B., Gimadudinow O., Wende W., Krause K., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // Nucleic Acids Res. – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–2639.
7. Педерсен Ю., Филимонова М., Роенсторф П., Бидерманн К. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens* природного и рекомбинантного штаммов. Сравнительная характеристика плазменно-десорбционной масс-спектрометрией // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 3. – С. 450–461.

8. Филимонова М.Н., Гарусов А.В., Сметанина Т.А., Андреева М.А., Богомольная Л.М., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Сравнительный анализ субстратной специфичности // Биохимия. – 1996. – Т. 61, Вып. 10. – С. 1800–1806.
9. Филимонова М.Н., Губская В.П., Нуретдинов И.А., Бенедик М.Дж., Богомольная Л.М., Андреева М.А., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Роль ионов  $Mg^{2+}$  в механизме гидролиза // Биохимия. – 1997. – Т. 62, Вып. 9. – С. 1148–1154.
10. Филимонова М.Н., Бенедик М.Дж., Уразов Н.Г., Лецинская И.Б. Полидисперсность нуклеазы *Serratia marcescens* при оптимальном значении pH // Прикл. биохимия и микробиол. – 1999. – Т. 35, Вып. 1. – С. 20–24.
11. Filimonova M.N., Krause K.L., Benedik M.J. Kinetic studies of the *Serratia marcescens* extracellular nuclease isoforms // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – V. 33, No 6. – P. 1229–1236.
12. Bidermann K., Jepsen P.K., Riise E., Sevendsen I. Purification and characterization of a *Serratia marcescens* nuclease produced by *Escherichia coli* // Carlsberg. Res. Commun. – 1989. – V. 54, No 1. – P. 17–27.
13. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Тяньшин В.И., Третьяк Т.М. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1974. – Т. 39, Вып. 1. – С. 116–122.
14. Nestle M., Roberts W.K. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme // Biol. Chem. – 1969. – V. 244, No 19. – P. 5213–5218.
15. Габдуллина Г.К. Действие нуклеазы *Serratia marcescens* на клетки и рост асцитной опухоли Эрлиха: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 1980. – 20 с.
16. Детиненко Л.Д., Клименко В.П., Подгорный В.Ф., Аликин Ю.С., Масычева В.И., Гробов О.Ф., Батуев Ю.М. Патент 2038776 РФ. Средство «Эндоглиокин» для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляции развития пчелиных семей. – 1995.
17. Handbook of ELISPOT. Methods and Protocols / Ed. A. Kalyuzhny. – N. Y.: Humana Press, 2005. – 336 p.
18. Suh Y., Jin S., Ball T., Benedik M. Two step secretion of extracellular nuclease in *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178, No 13. – P. 3771–3778.
19. Юсупова Д. В., Соколова Р.Б., Порфирьева О.В., Пономарева А.З. Индукция синтеза внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* агентами подавляющими репликацию ДНК // Микробиол. – 1991. – Т. 60, № 2. – С. 279–284
20. Benedik M.J., Strych U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 165, No 1. – P. 1–13.
21. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedik M.J. The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli* // Gene. – 1987. – V. 57, No 2–3. – P. 183–192.

Поступила в редакцию  
24.09.08

---

**Шах Махмуд Райхан** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [raihan.shah@gmail.com](mailto:raihan.shah@gmail.com)

**Филимонова Мария Николаевна** – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [maria.filimonova@ksu.ru](mailto:maria.filimonova@ksu.ru)