

УДК 577.152.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СУБСТРАТОВ В ОТНОШЕНИИ АКТИВНОСТИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ БАКТЕРИЙ *SERRATIA MARCESCENS*

Ю.Д. Шабаета, М.Н. Филимонова

Аннотация

Проведен сравнительный анализ субстратов РНК и ДНК, выделенных из разных источников разными фирмами изготовителями, и активности нуклеазы бактерий *Serratia marcescens* в отношении этих субстратов.

Показано, что препараты РНК, выделенные из одного и того же источника разными фирмами, незначительно отличаются друг от друга по степени полимерности и величине нуклеотидных фрагментов. Напротив, препараты ДНК, выделенные одной и той же фирмой из разных источников, существенно различались по величине нуклеотидных фрагментов, и, как следствие, упаковке полинуклеотидной цепи. Активность нуклеазы *S. marcescens* в отношении сравниваемых субстратов, за исключением ДНК из спермы сельди, практически не различалась. Результаты, полученные двумя разными методами (по гиперхромному эффекту и кислото-растворимым фракциям) коррелировали друг с другом. Подтвержден ранее установленный факт эндонуклеолитического типа гидролиза высокомолекулярной ДНК. Установлен эндонуклеолитический тип гидролиза РНК на начальном этапе, далее, вероятно, изменяющийся на эндо-экзонуклеолитический.

Введение

Внеклеточная эндонуклеаза Грам отрицательных энтеробактерий *Serratia marcescens* (Sma nuc) является одним из наиболее изученных ферментов в ряду бактериальных нуклеаз с широкой специфичностью. Показано, что фермент гидролизует ДНК и РНК, образуя ди-, три-, тетра- и олигонуклеотиды. Мононуклеотидная фракция в продуктах гидролиза немногочисленна [1, 2].

Поскольку исследование нуклеазы *S.marcescens*, как и любого другого фермента, сопряжено с постоянным определением ферментативной активности, необходимо тщательно подбирать субстрат, так как эндонуклеаза проявляет чувствительность к вторичной структуре субстрата [3, 4]. В связи с этим перед нами стояла задача провести сравнительный анализ субстратов РНК и ДНК, выделенных из разных источников разными фирмами-изготовителями, и затем оценить нуклеазную активность в отношении сравниваемых субстратов.

1. Материалы и методы

В работе использовали препараты дрожжевой РНК НПО «Вектор» (Новосибирск) и «US Biochemical Corporation» (США), ДНК из молок лосося (тип XIV) и из спермы сельди «Sigma» (США). Нуклеаза *S. marcescens* была пред-

ставлена изоформой Sm2, предварительно выделенной и охарактеризованной, как описано ранее [5, 6]. Концентрация нуклеазы в препарате была 6.567 мкМ.

Активность нуклеазы определяли методами кислоторастворимых фракций и по гиперхромному эффекту. При определении активности нуклеазы методом кислоторастворимых фракций реакционная смесь объемом 3.4 мл содержала 0.01% ДНК или РНК, 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.5, 6 мМ MgSO₄. В реакционную смесь добавляли по 34 мкл исследуемого ферментного раствора. Смесь инкубировали при 25°C, отбирая через 10–600 с аликвоты объемом 190 мкл для последующего анализа. Для остановки ферментативной реакции к аликвотам добавляли по 190 мкл 10%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) при определении содержания кислоторастворимых продуктов в целом или 10%-ной ТХУ, содержащей 0.2% уранилацетата, при определении содержания монопентануклеотидной фракции. Смесь выдерживали 10 мин. на холоде. Осадок отделяли 15 мин. центрифугированием при 8 тыс. об./мин. Количество продуктов гидролиза оценивали по поглощению предварительно разведенного в 10–20 раз супернатанта при 260 нм. Содержание в интактном субстрате кислоторастворимых фрагментов оценивали по аналогичной схеме, добавляя в реакционную смесь вместо нуклеазы дистиллированную воду.

При определении активности нуклеазы по гиперхромному эффекту готовили реакционную смесь объемом 500 мкл, включавшую 0.01% ДНК или РНК, 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.5, 6 мМ MgSO₄. Реакцию гидролиза субстрата инициировали добавлением к реакционной смеси 5 мкл исследуемого ферментного раствора, после чего регистрировали изменение поглощения смеси в кювете с длиной оптического пути 2 мм при 260 нм в течение 10 мин. на 2-х лучевом спектрофотометре λ-35 (“Perkin Elmer” США). Активность определяли как прирост оптической плотности за единицу времени из линейной части кривой прироста A₂₆₀ в результате гидролиза субстрата.

При определении гиперхромного эффекта по ферментативной реакции готовили реакционную смесь объемом 500 мкл, содержащую 0.01% ДНК или РНК, 50 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.5, 6 мМ MgSO₄. Определяли экстинцию ДНК в приготовленной реакционной смеси при 260 нм с помощью 2-х лучевого спектрофотометра λ-35. Затем к реакционной смеси добавляли 5 мкл нуклеазы и проводили гидролиз субстрата до выхода кривой прироста A₂₆₀ на плато (около 10 минут). После этого вновь измеряли оптическую плотность при 260 нм. По разнице между значениями начальной и конечной экстинции раствора определяли величину гиперхромного эффекта в %.

При определении гиперхромного эффекта по тепловой денатурации нуклеиновых кислот РНК или ДНК растворяли в дистиллированной воде. Определяли экстинцию растворов при 260 нм с помощью 2-х лучевого спектрофотометра λ-35. Полученные растворы прогревали на кипящей водяной бане 10 мин., после чего мгновенно остужали на ледяной бане и вновь определяли их экстинцию. Разница в процентах между полученными значениями конечной и начальной экстинции соответствовала величине гиперхромного эффекта. За 100% принимали начальную экстинцию раствора.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием подпрограммы статистического анализа графической программы Sigma Plot.

Проводили выбраковку данных, находили новые значения среднего арифметического и стандартного отклонения во вновь установленном доверительном интервале 95%.

Определение достоверности разницы проводили с помощью критерия Стьюдента, используя значения среднеарифметического и стандартного отклонений, полученные после выбраковки.

2. Результаты и обсуждение

Характеристику субстратов ДНК и РНК проводили, оценивая степень их полимерности по величине гиперхромного эффекта и длине полинуклеотидных звеньев. Последнее устанавливали, определяя в препарате фракцию, растворимую в ТХУ, представленную смесью моно- и олигонуклеотидов. Величину гиперхромного эффекта определили после тепловой денатурации, а также после полного гидролиза нуклеиновой кислоты с помощью эндонуклеазы. Результаты представлены в табл. 1.

Табл. 1

Характеристика использованных субстратов

Субстрат	Содержание, моно- и олигонуклеотидов, %*	Гиперхромный эффект, %		Активность, оп. ед./мл · ч ⁻¹ , ×100
		Ферментативный гидролиз	термоденатурация	
ДНК из молок лосося	54.8 ± 27	19.6 ± 3.5	15.6 ± 3.3	864 ± 132
ДНК спермы сельди	90 ± 18	4.1 ± 3.1	14.2 ± 1.1	48 ± 114
РНК фирмы «Вектор»	69 ± 9.7	16 ± 1.4	13.9 ± 2.0	636 ± 66
РНК фирмы «US BC»	90 ± 37	9.8 ± 4	14.3 ± 2.8	606 ± 60

*За 100% принимали поглощение исходного субстрата.

Как видно из таблицы, наименьшее содержание моноолигонуклеотидов было выявлено в препарате ДНК, полученном из молок лосося, наибольшее – в препарате ДНК из спермы сельди. Фракциями кислоторастворимых фрагментов было представлено, соответственно, около 55% и 90% сравниваемых препаратов. Результат 90% позволяет заключить, что препарат ДНК из спермы сельди содержит преимущественно короткие полинуклеотидные цепочки. При этом различие в полимерности обоих препаратов ДНК, очевидно, отсутствовало, так как наблюдавшаяся разность величин гиперхромного эффекта после тепловой денатурации оказалась недостоверной. Однако гиперхромный эффект гидролиза ДНК из спермы сельди был достоверно меньше гиперхромного эффекта гидролиза ДНК из молок лосося, а также меньше гиперхромного эффекта, установленного в результате тепловой денатурации. Известно, что при тепловой денатурации гиперхромный эффект обусловлен преимущественно нарушением двуспиральной структуры нуклеиновых кислот, а при нуклеодеполимеризационной реакции – в основном нарушением стэкинг-взаимодействия между смежными парами оснований при гидролизе фосфодиэфирных связей и частично образованием односпиральных продуктов [7]. В связи с этим мы полагаем, что низкое значение гиперхромного эффекта гидролиза ДНК из спермы

сельди могло быть обусловлено меньшей длиной молекул и, соответственно, меньшим количеством разрывов в цепочке.

Как видно из таблицы, сравниваемые препараты РНК практически не различались по величине гиперхромного эффекта при термоденатурации и имели слабое различие в отношении нуклеазной активности. Более того, различие препаратов по гиперхромному эффекту гидролиза и содержанию кислоторастворимых фракций, как показал статистический анализ, оказалось недостоверным. В связи с этим можно было заключить, что оба препарата РНК тождественны по содержанию олигонуклеотидной фракции и величине нуклеотидных фрагментов, а также по степени полимерности, т. е. доле двуспиральных участков. Следует отметить, что величины гиперхромных эффектов нуклеазной реакции и тепловой денатурации обоих препаратов РНК также достоверно не отличались от аналогичных показателей препарата ДНК из молок лосося.

Таким образом, можно заключить, что по доле двуспиральных участков все исследованные препараты ДНК и РНК не имели существенных различий. По величине нуклеотидных фрагментов, очевидно, все исследуемые препараты можно было разделить на две группы. К первой группе препаратов, у которых длина нуклеотидных фрагментов была, очевидно, больше, чем в препаратах второй группы, можно было отнести ДНК из молок лосося и РНК фирмы «Вектор». Ко второй, по-видимому, принадлежали препараты ДНК из спермы сельди и РНК фирмы «US Biochemical Corporation». Такое разделение препаратов на две группы в сочетании с анализом гидролитической активности нуклеазы в отношении рассматриваемых субстратов выявило тенденцию изменения активности в соответствии с изменением величины нуклеотидного фрагмента. Кроме этого, необъяснимым оставался факт значительного различия в проявлении активности нуклеазы в отношении препаратов второй группы, существенно не отличавшихся друг от друга ни по содержанию моно-олигонуклеотидов, ни по величине нуклеотидных фрагментов, ни по содержанию двуспиральных участков.

Поскольку нуклеаза *S. marcescens* представляет группу родственных ферментов, некоторые из которых обладают эндо-эксонуклеолитическим характером гидролиза субстратов, далее определяли динамику накопления продуктов гидролиза, растворимых в кислоте в отсутствие и присутствии уранилацетата.

Известно, что в присутствии 0.1%-ного уранилацетата кислоторастворимая фракция содержит моно-пентануклеотиды, а в его отсутствие число нуклеотидов в кислоторастворимых фрагментах возрастает до девяти и более [8]. В связи с этим метод обнаружения экзонуклеолитической активности основан на параллельном наблюдении динамики накопления продуктов гидролиза, растворимых в 5%-ной ТХУ в присутствии и отсутствии уранилацетата. При экзонуклеолитическом типе гидролиза картина накопления продуктов гидролиза идентична, независимо от присутствия уранилацетата. В случае экзонуклеолитического расщепления накопление кислоторастворимых продуктов в присутствии уранилацетата происходит значительно медленнее, чем в его отсутствие [9].

Исследование показало, что лишь при использовании ДНК из молок лосося нуклеаза осуществляла строго экзонуклеолитический гидролиз данного суб-

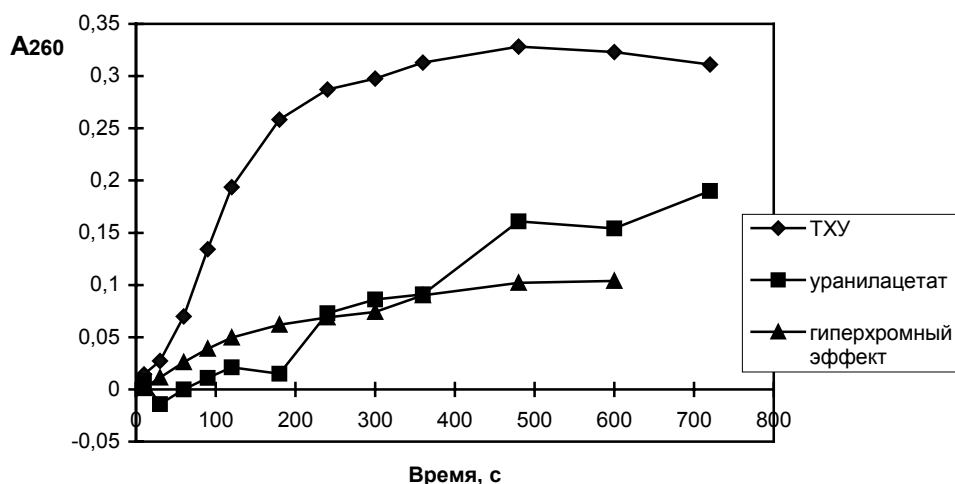


Рис. 1. Динамика оптического поглощения раствора и накопления кислоторастворимых продуктов в ходе гидролиза нуклеазой ДНК из молок лосося. Здесь и далее опыты проведены не менее чем в 5 повторностях. Разница значений достоверна

страта, в пользу чего свидетельствовала картина изменения оптического поглощения раствора ДНК в ходе гидролиза нуклеазой (рис. 1).

В отношении остальных исследованных субстратов результаты были неоднозначны, а иногда и труднообъяснимы, как, например, при использовании в качестве субстрата ДНК из спермы сельди.

Гидролиз обоих препаратов РНК (рис. 2, 3) на начальных этапах – первые 30–60 с – соответствовал эндонуклеолитическому типу: наблюдались прирост фракции, растворимой в ТХУ, и отсутствие прироста фракции, растворимой в ТХУ и содержащей уранилацетат. Затем картина изменялась. Прирост обеих фракций происходил одновременно и почти одинаково, и практически прекращался с замедлением прироста гиперхромности.

Таким образом, проведенное исследование показало, что препараты РНК, выделенные из одного и того же источника разными фирмами-изготовителями, незначительно отличаются друг от друга по степени полимерности и величине нуклеотидных фрагментов. Напротив, препараты ДНК, выделенные одной и той же фирмой из разных источников, существенно различались по величине нуклеотидных фрагментов, и, как следствие, упаковке полинуклеотидной цепи. Активность нуклеазы *S. marcescens* в отношении сравниваемых субстратов, за исключением ДНК из спермы сельди, практически не различалась. Результаты, полученные двумя методами (гиперхромного эффекта и метода кислоторастворимых фракций) коррелировали друг с другом, т. е. в зависимости от задач можно использовать любой из этих методов. Подтвержден ранее установленный факт эндонуклеолитического типа гидролиза высокомолекулярной ДНК. Установлен эндонуклеолитический тип гидролиза РНК на начальном этапе, вероятно, далее изменяющийся на эндо-экзонуклеолитический.

Работа поддержана Фондом НИОКР Республики Татарстан (проект № 07-7.3-272), за что авторы выражают искреннюю благодарность.

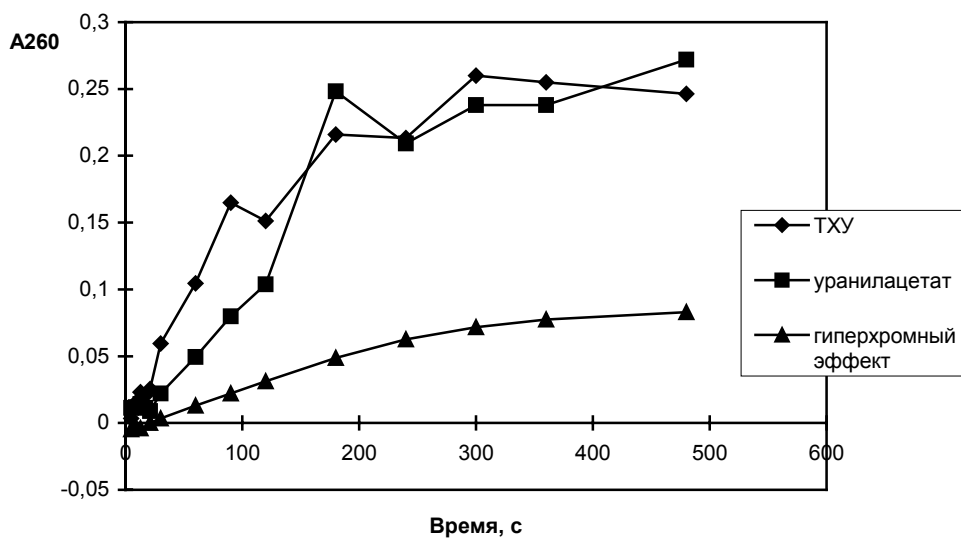


Рис. 2. Динамика оптического поглощения раствора и накопления кислоторастворимых продуктов в ходе гидролиза нуклеазой РНК фирмы «Вектор»

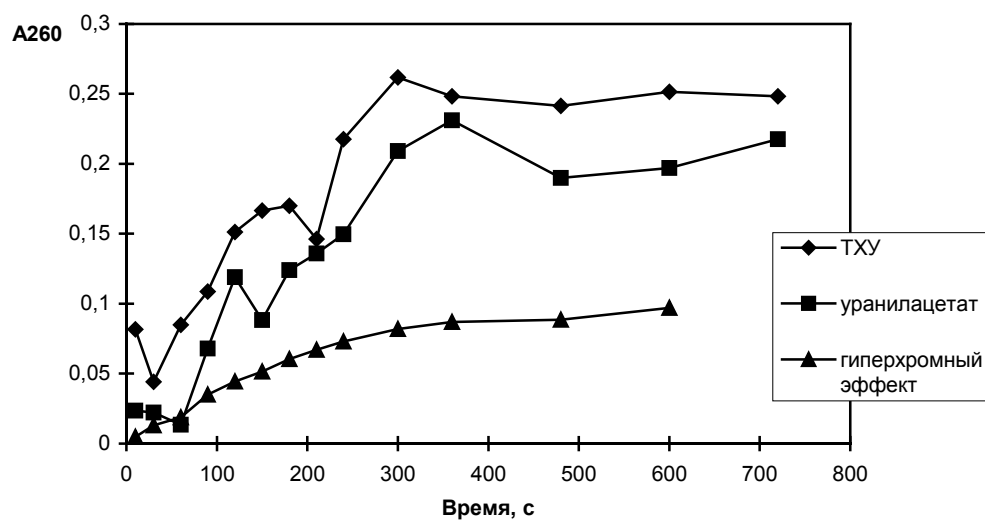


Рис. 3. Динамика оптического поглощения раствора и накопления кислоторастворимых продуктов в ходе гидролиза нуклеазой РНК фирмы «US Biochemical Corporation»

Summary

J.D. Shabaeva, M.N. Filimonova. Comparative analysis of substrates towards the activity of endonuclease from bacterium *Serratia marcescens*.

DNA and RNA isolated from different sources by different companies as well the activity of *Serratia marcescens* nuclease towards these substrates were analyzed. The RNA preparations isolated by different companies from similar sources were shown to be similar

polymerous and distinguished insignificantly by the length of nucleotide fragments. On the contrary, DNA preparations isolated from different sources by the same company differed by the size of nucleotide fragments and, as a result, by the packing of polynucleotide chains. The nuclease activity did not differ against the compared substrates, excluding herring sperm DNA. The results obtained with two different methods, by the hyperchromic effect or the acid precipitation fractions, correlated to each other. The endonucleolytic type of hydrolysis of high-polymerized DNA, found previously, was confirmed. RNA was revealed to be cleaved endonucleolytically at the initial stage of hydrolysis that further changed to the endo-exonucleolytic type.

Литература

1. Nestle M., Roberts W. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of enzyme // J. Biol. Chem. – 1969. – V. 244. – P. 5213–5218.
2. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Таняшин В.И., Третьяк Т.М. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1974. – Т. 39, Вып. 1. – С. 116–122.
3. 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.
4. 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. – С. 1148–1154.
5. Филимонова М.Н., Дементьев А.А., Лецинская И.Б., Бакулина Г.Ю., Шляпников С.В. Выделение и характеристика изоформ внеклеточной нуклеазы *Serratia marcescens* // Биохимия. – 1991. – Т. 56, № 3. – С. 508–520.
6. Педерсен Ю., Филимонова М., Роенсторф П., Бидерманн К. Характеристика изоформ нуклеазы *Serratia marcescens* электроспрей масс-спектрометрией // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 3. – С. 450–461.
7. Waters T.R., Connolly B.A. Continuous spectrophotometric assay for restriction endonucleases using synthetic oligodeoxynucleotides and based on hyperchromic effect // Analytical Biochem. – 1992. – V. 204. – P. 204–209.
8. Лецинская И.Б. Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1980. – 117 с.
9. Berry S.A., Campbell J.M. The extracellular nuclease activity of *Micrococcus sodonensis*. 1. Isolation and purification // Biochim. Biophys. Acta. – 1967. – V. 132. – P. 78–83.

Поступила в редакцию
19.06.05

Шабаета Юлиа Джафаровна – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

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