



УДК 577.154

ИЗУЧЕНИЕ β -1,3-ГЛЮКАНАЗЫ III ИЗ *SPISULA SACHALINENSIS* МЕТОДОМ ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ

Елякова Л. А., Акпаров В. Х.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного научного центра Академии наук СССР,
Владивосток

Методом изоэлектрофокусирования в тонком слое полиакриламидного геля показано наличие множественных форм β -1,3-глюканазы III из *S. sachalinensis*. Отработан способ определения активности ферментов после изоэлектрофокусирования в присутствии амфолинов. Две из множественных форм β -1,3-глюканазы выделены препаративным изоэлектрофокусированием в слое гранулированного геля — сефадекс G-75.

Как сообщалось ранее [1], из моллюска *S. sachalinensis* было выделено 2 β -1,3-глюканазы III и IV. По данным диск-электрофореза образец IV был гомогенен, тогда как препарат III представлял смесь белков, хотя ферментативная активность проявлялась в нем в виде одной полосы [1]. Мы применили метод изоэлектрофокусирования для изучения глюканазы III.

При изоэлектрофокусировании глюканазы III в тонком слое полиакриламидного геля [2] мы столкнулись с трудностью обнаружения фермента. Ферментативную активность на пластинках можно обнаружить с помощью хлористого трифенилтетразолия [3] (как мы это и делали вначале), но этот метод имеет ряд недостатков. Так, нагревание пластинки в щелочи деформирует гель, окрашенные области выглядят размытыми, а близко расположенные зоны сливаются; кроме того, фермент при такой обработке теряет активность. Поэтому в дальнейшем нами была отработана методика, лишенная указанных недостатков. Мы воспользовались для обнаружения β -1,3-глюканазной активности известным глюкозооксидазо-пероксидазным реагентом [4], взаимодействующим с глюкозой, образующейся из ламинарина под действием глюканазы III. На бумажной «реплике», смоченной смесью субстрата с глюкозооксидазо-пероксидазным реагентом и прижатой к пластинке, при инкубации происходило образование красных полос в местах, соответствующих локализации фермента. По этой методике возможно снять с пластинки 2—3 ясные «реплики», а остающийся в слое носителя фермент может быть выделен в активном состоянии или прокрашен как белок [5]. Методика может быть применима для обнаружения после изоэлектрофокусирования в присутствии амфолинов ферментативной активности других глюканаз и глюкозидаз, взаимодействующих с субстратом с образованием глюкозы и проявляющих достаточную каталитическую активность при pH 7,0 (pH буфера глюкозооксидазо-пероксидазного реагента). Так, мы получили удовлетворительный результат при проявлении реагентом β -амилазы на пластинке.

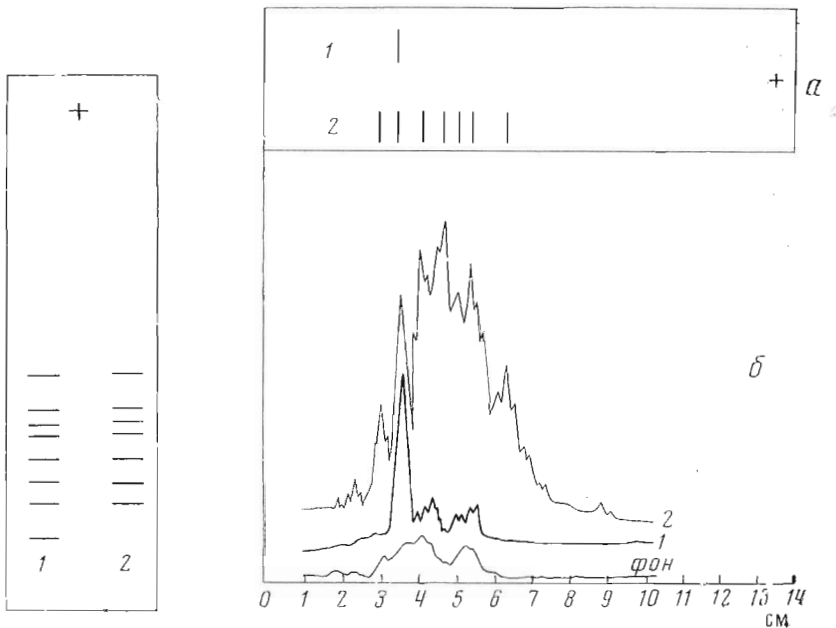


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Изоэлектрофокусирование в тонком слое полиакриламидного геля (7%) исходного гомогената кристаллического стебелька моллюска *S. sachalinensis* (1), β -1,3-глюканазы III (2). Обнаружение активности глюкозооксидазо-пероксидазным способом

Рис. 2. Изоэлектрофокусирование в тонком слое полиакриламидного геля: а — обнаружение активности глюкозооксидазо-пероксидазным способом; б — запись «решетки» с помощью двухлучевого регистрирующего сканирующего спектрофотометра одной из выделенных множественных форм β -1,3-глюканазы III с рI 6,2 (1), β -1,3-глюканазы III (2)

При изоэлектрофокусировании глюканазы III в тонком слое полиакриламидного геля с использованием новой методики локализации активности было обнаружено несколько множественных форм фермента с рI от 5,6 до 7,4 (рис. 1). Контроль (проявление пластинки реагентом, но без ламинарина) доказал отсутствие ложных пятен на фореграмме фермента. Как оказалось, множественные формы не являются артефактами метода выделения, так как они обнаруживаются уже в свежем сыром исходном препарате фермента (рис. 1). Для исключения возможности артефактов метода изоэлектрофокусирования, связанных с абсорбцией амфолинов белками [6], пробовали после установления градиента pH наносить образцы фермента с двух сторон — в кислой и щелочной областях пластинки геля; однако картины проявления были одинаковы и совпадали с приведенной на рис. 1, следовательно, возможность артефактов по этой причине отпадает.

Известно несколько причин образования множественных форм: различия в первичной структуре фермента, вызванные мутациями соответствующего гена, в результате чего происходит замена одной или нескольких аминокислот [7]; частичный протеолиз белка (при выделении) под действием протеаз объекта [8]; частичный гидролиз глутамила и аспарагина до глутаминовой и аспарагиновой кислот [9, 10]; различия в углеводной части молекулы, когда фермент является гликопротеином [7, 11, 12]; субъединичная природа белка [13] и т. д.

Вопрос о природе множественных форм глюканазы III требует дальнейшего исследования. Пока известно только, что в источнике фермента — кристаллическом стебельке *S. sachalinensis* — отсутствуют протеиназы [14], которые могли бы вызвать частичный протеолиз молекулы глюканазы.

Маловероятным кажется такое изобилие ошибок в первичной структуре для относительно низкомолекулярного белка ($M \sim 23\ 000$).

Для выделения нескольких множественных форм фермента был использован метод препаративного изоэлектрофокусирования белков в слое гранулированного геля [15]. При изоэлектрофокусировании глюканазы III в слое сефадекса G-75 (амфолины pH 3—10) было выделено 2 формы с изоэлектрическими точками 6,2 и 5,6, диск-электрофорез которых с окрашиванием белка и активности подтвердил их гомогенность. Повторным изоэлектрофокусированием в тонком слое полиакриламидного геля для одной из форм (с pI 6,2) была показана гомогенность по ферментативной активности (рис. 2). Ранее наличие множественных форм было описано для β -1,3-глюканаза из *Rhizopus arrhizus* [8, 16] и из *Bacillus circulans*, причем из последнего источника одна из форм была выделена в гомогенном по данным диск-электрофореза состоянии [18].

Экспериментальная часть

β -1,3-Глюканаза III (β -1,3-эндоглюкан глюканогидролаза (КФ 3.2.1.6)) была выделена из кристаллического стебелька морского моллюска *S. sachalinensis* по методу [1]. Полученный препарат дополнительно концентрировали на SE-сефадексе и обессоливали на сефадексе G-25. Субстрат — ламинарин (β -1,3-глюкан) был выделен из морской водоросли *Laminaria sutcharioides* [1]. Глюкозооксидазо-пероксидазный реактив [4] — набор ТСМ-1 фирмы «Boehringer» (ФРГ) для определения глюкозы в крови. При изоэлектрофокусировании использовали амфолины фирмы «LKB» (Швеция) pH 3—10. Для диск-электрофореза использовали соответствующий набор реактивов фирмы «Reanal» (Венгрия).

Диск-электрофорез проводили по методу [16]. Белок обнаруживали, окрашивая гели красителем кумасси. Ферментативную активность определяли с помощью хлористого трифенилтетразолия [3] (1 ч инкубировали гели с 0,4%-ным раствором ламинарина в 0,05 М сукцинатном буфере, pH 5,2; затем переносили гели в 0,1%-ный раствор хлористого трифенилтетразолия в 0,05 М NaOH и кипятили 5 мин).

Изоэлектрофокусирование в тонком слое полиакриламидного геля проводили по методу [2]. Для приготовления геля использовали следующие растворы: № 1—30 г акриламида и 0,8 г N,N'-метиленисакриламида в 100 мл воды, № 2—7 мг рибофлавина и 0,5 мл N,N,N'-тетраметилэтилендиамина в 100 мл воды. К 4 мл раствора № 1 приливали 1,2 мл раствора № 2, 1 мл 40%-ного раствора амфолинов и 13,8 мл воды. Раствор дегазировали 1 мин и заливали в форму для получения пластинки $13 \times 18 \times 0,1$ см. Полимеризация протекала при солнечном свете в течение 30 мин. Конечная концентрация амфолинов 2%. Обессоленные образцы белка (20—40 мкл 0,1—5%-ного раствора) наносили на кусочки фильтровальной бумаги и затем прикладывали их к гелю. Пластинку геля накладывали на платиновые электроды прибора, смоченные 10%-ным раствором этилендиамина (—) и 10%-ной фосфорной кислотой (+). Начальное напряжение 200 В, ток 8—10 мА, конечное напряжение 300 В, ток 0,1 мА. Время изоэлектрофокусирования — 18 ч, процесс проводился при 4°.

Изоэлектрофокусирование в слое гранулированного геля проводили по методу [16]. К 7 г сухого сефадекса G-75 (сверхмелкого) приливали 100 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 40% амфолинов и добавляли 10 мг лизина для стабилизации щелочной части градиента. На пластинку 13×18 см наносили 30 мл суспензии. Слой геля подсушивали до образования матовой поверхности и появления мелких трещин по краям слоя. Обессоленные растворы фермента или вносили непосредственно в гель при изготовлении суспензии, или наносили на кусочки фильтровальной бумаги и затем прикладывали их к гелю. В качестве электродных буферов использовали 0,1 М NaOH и 0,1 М H₂SO₄. Контакт пластинки с электродными буферами осу-

щественляли с помощью бумажных мостиков. Режим фокусирования: 4°; первые 2 ч 200 В, затем 7 ч 600 В.

Обнаружение β -1,3-глюканазной активности с применением глюкозооксидазо-пероксидазного реагента. Лист хроматографической бумаги FN1 размером с пластинку пропитывали 1—2%-ным раствором ламинарина в растворе № 4 набора ТСМ-1 для определения глюкозы глюкозооксидазным методом [4], накладывали нагель, избегая образования пузырьков воздуха между гелем и «репликой», накрывали сверху чистой стеклянной пластинкой, помещали в полиэтиленовый пакет (для предотвращения испарения воды) и инкубировали 20—60 мин при 37°. В местах локализации фермента наблюдали красные полосы.

Для обнаружения β -1,3-глюканазы III при препаративном изоэлектрофокусировании в слое гранулированного геля с геля снимали «реплику» с помощью хроматографической бумаги ватман 3; затем к этой реплике прикладывали лист бумаги FN1, пропитанный проявляющим раствором (см. выше). Плотно сложенные листы бумаги зажимали между двумя стеклянными пластинками и инкубировали до появления пятен. После проявления реплику подкладывали снизу под пластинку с гелем и собирали участки геля, содержащие фермент. Отделение от амфолинов проводили на колонке с биогелем Р-4 в воде. С пластинки полиакриламидного геля и бумажных «реплек» делали запись с помощью двухлучевого сканирующего спектрофотометра «Scanner» фирмы «Schimadzu» (Япония) для количественной характеристики распределения белковых и ферментных зон на пластинках.

Для измерения градиента рН участки геля посредине пластинки площадью 0,5—1 см² переносили в пробирки с 1 мл 0,1 М КСl и оставляли на ночь на холоду. рН растворов замеряли при температуре изоэлектрофокусирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сова В. В. (1971) Изучение β -1,3-глюканаз морских беспозвоночных, канд. дис., Владивосток; Sova V. V., Elyakova L. A., Vaskovsky V. V. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **212**, 111—115.
2. Leaback H., Rutter A. C. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **32**, 447—453.
3. Gabriel O., Shu Fong Wang (1969) *Anal. Biochem.*, **27**, 545—554.
4. Keston A. (1956) *Abstr. Paper 129 Meeting Amer. Chem. Soc.*, S 31 c.
5. Malik N., Berrie A. (1972) *Analyt. Biochem.*, **49**, 173—176.
6. Illingworth J. A. (1972) *Biochem. J.*, **129**, 1125—1130.
7. Salnikow I., Moore S., Stein W. H. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 5685—5690.
8. Marshall J. J., Buckland B. A. (1973) *Abstr. Paper 9 International Congress of Biochem.*, 2p 19, Sec. 2.
9. Cozzone P., Pasero L., Beaupoil B., Marchis-Mouren G. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **207**, 490—504.
10. Jacobsen N. (1973) *Comp. Biochem. and Physiol.*, **44B**, 157—161.
11. Beutler E., Kuhl W. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7195—7200.
12. Ohtsuru M., Hata T. (1972) *Agr. and Biol. Chem.*, **36**, 2495—2503.
13. Contaxis C. C., Reither F. I. (1971) *Biochem. J.*, **124**, 623—632.
14. Koslovskaya E. P., Vaskovsky V. E. (1970) *Comp. Biochem. and Physiol.*, **34**, 147—142.
15. Radola B. I. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **194**, 335—338.
16. Marshall J. I. (1974) *Carbohydr. Res.*, **34**, 289—305.
17. Tanaka H., Kobayashi Y., Ogasawara N. (1974) *Agr. and Biol. Chem.*, **38**, 967—972.
18. Kobayashi Y., Tanaka H., Ogasawara N. (1974) *Agr. and Biol. Chem.*, **38**, 973—987.
19. Davis B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404—427.

Поступила в редакцию
25.III.1975

ISOELECTRIC FOCUSING STUDY OF β -1,3-GLUCANASE III FROM *SPISULA SACHALINENSIS*

ELYAKOVA L. A., AKPAROV V. H.

*Pasific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Scientific Centre, Academy
of Sciences of the USSR, Vladivostok*

The presence of multiple forms of β -1,3-glycanase III from *S. sachalinensis* was shown by isoelectric focusing in a thin layer of polyacrylamide gel. A technique was developed for estimating the enzyme activity after isoelectrofocusing in the presence of ampholytes. Two of the multiple forms were isolated by large-scale isoelectrofocusing in a layer of Sephadex G-75.