



УДК 543

Респираторная нитратредуктаза из *Thiothrix lacustris* AS: очистка, физико-химические свойства и каталитические характеристики

Трубицин И.В.¹, Грабович М.Ю.¹, Тутукина М.Н.²¹ФГБУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж²Институт биофизики клетки РАН, Пущино

Поступила в редакцию 15.03.2014 г.

Аннотация

Методом многостадийной очистки (гель-фильтрация, ионообменная хроматография и препаративный электрофорез) из бактерий *Thiothrix lacustris* AS, выращенных в анаэробных условиях в присутствии нитратов, получен электрофоретически гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы (К.Ф. 1.7.5.1) с удельной активностью 97,7 Е/мг и степенью очистки в 78 раз. Были изучены: температурный и рН оптимумы фермента, термостабильность, влияние типичных ингибиторов, получены величины K_m и V_{max} .

Ключевые слова: респираторная нитратредуктаза, *Thiothrix lacustris* AS, очистка

Respiratory nitrate reductase (E.C. 1.7.5.1) from bacterium *Thiothrix lacustris* AS cultivated under anaerobic conditions in the presence of nitrate was isolated and purified 78-fold using a multistep purification scheme including gel-filtration, ion-exchange chromatography, and preparative electrophoresis. The enzyme was homogenous according to electrophoretic data, with activity of 97,7 U /mg. Kinetic and physical-chemical characteristics of the enzyme (pH and temperature optima, thermostability, effect of different inhibitors on activity) were studied.

Keywords: respiratory nitrate reductase, *Thiothrix lacustris* AS, purification

Введение

Респираторная нитратредуктаза – ключевой фермент процесса денитрификации у прокариот. Это мембраносвязанный фермент, обращенный своим каталитическим центром в цитоплазму. Обычно данная нитратредуктаза состоит из трех субъединиц NarG, NarH и NarI. Субъединица NarI закрепляет весь комплекс на внутренней стороне мембраны. Также некоторые специалисты приписывают ей функцию транспорта электронов. NarG – большая, или α субъединица. Она несёт молибден в виде кофактора, который является активным центром фермента. Субъединица связывает три [4Fe-4S] кластера и один [3Fe-4S] кластер. Таким образом, респираторная нитратредуктаза обычно представляет собой гетеротример состоящий из субъединиц следующей массы: NarG – от 93 до 145 кДа, NarH – от 55 до 64 кДа и NarI – от 13 до 26 кДа. Однако очищенные препараты нитратредуктазы нередко представляют собой гетеродимер NarGH, поскольку субъединица NarI плотно интегрирована в липидный бислой мембраны [1].

В данной работе была изучена дыхательная нитратредуктаза бактерий рода *Thiothrix*. Интересной особенностью данных прокариот является их способность к быстрой смене типа дыхания при переходе от аэробных условий роста к анаэробным в присутствии нитратов, что становится возможным благодаря наличию у этих организмов изучаемого фермента. Как показывают недавние молекулярно-биологические исследования, нитратредуктаза NarGHI широко распространена в пределах рода *Thiothrix* [2]. Целью настоящей работы являлось получение гомогенного препарата респираторной нитратредуктазы *Thiothrix lacustris* с использованием хроматографических методов и изучение физико-химических свойств и кинетических характеристик фермента.

Эксперимент

Объектами исследования служили нитчатые бесцветные серобактерии рода *Thiothrix* - *T. lacustris* AS, выделенные из обрастаний пресноводного ручья в зоне контакта с морской водой на литорали Белого моря.

Состав сред и условия культивирования. Для культивирования бактерий использовали среду Амбрустера [3]. Перед посевом в среду вносили раствор тиосульфата Na в концентрации – 1 г/л, раствор лактата и ацетата Na – по 300 мг/л, набор витаминов и микроэлементов [4]. pH среды 7,5–7,8. Также в среду перед посевом вносили NaCl – 10 г/л.

Для анаэробного культивирования использовали пробирки Хангейта или флаконы емкостью 0,5 литра с прокладками из полибутиловой резины и завинчивающимися металлическими крышками. Флаконы и пробирки заполняли доверху свежeproкипяченной стерильной средой с добавлением NaNO₃ из расчета 0,5 г/л. Бактерии культивировали в диапазоне температур 22–27 °С.

Получение клеточной суспензии и ферментных препаратов. Клеточную суспензию получали путем центрифугирования культур микроорганизмов при 12000 g и 4 °С в течение 15 мин. Клетки отмывали 0,1 М Tris-HCl-буфером (pH 7,5) и осаждали при тех же режимах центрифугирования в течение 10 минут.

Клеточные экстракты (гомогенат) получали в результате разрушения бактериальных клеток с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН–2Т при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2 мин. на ледяной бане.

Супернатант получали в результате центрифугирования гомогената при 20000 g и 4 °С в течение 30 мин.

Определение активности нитратредуктазы. Активность нитратредуктазы определяли в 0,2 М натрий-фосфатном буфере pH 7,3. К 800 мкл буфера с 0,01 М NaNO₃ приливали 5 мкл пробы. В качестве донора электронов для нитратредуктазы использовали 1 мМ метилвиологен. Реакцию инициировали внесением в реакционную среду 0,1 М дитионита натрия. Продолжительность экспозиции – 10 минут [5]. Об активности фермента судили по концентрации образовавшихся нитритов. Активность фермента выражали Е/мг белка (мкмоль/мин/мг белка)

Определение белка. Концентрация белка была определена с использованием реактива Брэдфорд (Sigma) в соответствии с рекомендациями производителя [6]. В качестве стандарта использовали БСА. Целые клетки предварительно подвергали щелочному гидролизу в 1 М NaOH в течение 10 минут при 90 °С.

Очистку респираторной нитратредуктазы из бесклеточного экстракта *Thiothrix lacustris* AS проводили с использованием следующих методов:

Гель-фильтрация на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Препарат фильтровали с использованием фильтров Whatman GD/X, (диаметр пор 0,2 мкм) и наносили на колонку, предварительно уравновешенную рабочим буфером: 50 mM Трис-HCl pH 7,35; 100 mM NaCl (далее – буфер А). В качестве элюэнта использовался этот же буфер. Скорость потока 1 мл/мин. Активные фракции объединялись и использовались для дальнейшей очистки.

Анионообменная хроматография [7]. Препарат белка наносили на колонку Mono Q HR 16/10 (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А без NaCl. Затем через колонку пропускали четырёхкратный объём буфера А без NaCl для удаления белков и прочих примесей, не связанных носителем. Нитратредуктазу элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (150 – 350 mM).

Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле с градиентом концентрации 4-10 % в системе для кислых белков: 4-10 % акриламид-метиленабисакриламид; 0,375 M Трис-HCl pH 8,8; 0,025 % ТЕМЕД; 0,025 % персульфат аммония. Режим электрофореза: 120 В, 45 мА, 30 Вт, стабилизация по току. Локализацию нитратредуктазы в пластинке геля определяли с помощью специфического окрашивания: пластинку геля выдерживали в реакционной смеси (0,2 M натрий-фосфатный буфер pH 7,3; 0,01 M NaNO₃; 0,01M метилвиологен) 7 – 15 мин при 60 °С до появления бесцветной полосы на синем фоне. Участок геля, содержащий фермент, вырезали, измельчали механически, смешивали с 50 мл буфера А без NaCl и экспонировали 18 часов при 4 °С для перехода белка в раствор.

Повторная анионообменная хроматография. Раствор белка в буфере А после препаративного электрофореза повторно наносили на колонку monoQ, предварительно уравновешенную тем же буфером. Фермент элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl 0 - 1 M. При этом был получен гомогенный препарат белка в концентрации, достаточной для изучения физико-химических и кинетических свойств.

Определение молекулярной массы очищенного фермента и отдельных субъединиц. Для определения молекулярной массы очищенного белка проводили нативный электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с градиентом концентрации 4-10 %. Для нанесения образцов использовали следующий буфер: 0,06 M Трис HCl pH 6,8, 10 % глицерин, 0,001 % бромфеноловый синий. В качестве белковых маркеров использовали набор High Molecular Weight Native Marker Kit (GE Healthcare), содержащий тироглобулин (669 кДа), ферритин (440 кДа), каталазу (232 кДа), лактатдегидрогеназу (140 кДа) и БСА (66 кДа).

Окрашивание проводили с помощью красителя Serva Blue R, инкубируя гель в водном растворе, содержащем 0,05 % красителя, 25 % изопропанола, 10 % уксусной кислоты на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Фон отмывали 200 мл 10 % уксусной кислоты на водяной бане.

Денатурирующий диск-электрофорез очищенной нитратредуктазы проводили по методу Laemmli [8] с 0,1 % SDS в 10 % полиакриламидном геле.

Режим электрофореза: 120 В, 20-40 мА, 30 Вт, стабилизация по току. Пробы, содержавшие белок, перед нанесением смешивали с двумя объемами буфера для нанесения (0,0625 M Трис-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 10 % глицерин; 5 % β-меркаптоэтанол; 0,001 % бромфеноловый синий) и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Окрашивание проводили с помощью нитрата серебра по стандартной методике [9]. Молекулярная масса субъединиц денатурированного белка определялась с помощью Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas), содержавшего β-галактозидазу (120 kDa), бычий сывороточный альбумин (БСА) (85

kDa), овальбумин (50 kDa), карбоангидразу (35 kDa), β -лактоглобулин (25 kDa), лизоцим (20 kDa) и Broad Range Marker (2-212 kDa, New England Biolabs). Молекулярную массу белков рассчитывали по калибровочной кривой, выражавшей зависимость между логарифмом молекулярной массы и относительной электрофоретической подвижностью (R_f) белков-стандартов [10].

Обсуждение результатов

Получение гомогенного препарата респираторной нитратредуктазы. В ходе проведения четырёхстадийной очистки был получен гомогенный препарат респираторной нитратредуктазы. Набор и последовательность стадий очистки подбирались экспериментально с учетом следующих обстоятельств: экстракция этанолом и другими органическими растворителями неприменима по причине необратимой потери 60 % - 75 % активности ферментом в ходе выполнения данных опытов; предварительное измерение термостабильности фермента показало возможность использования препаративного электрофореза и колоночной хроматографии при температуре 20 - 22 °С. Таким образом, для очистки респираторной нитратредуктазы использовали следующую последовательность этапов: ультразвуковая дезинтеграция биомассы, получение супернатанта, гель-фильтрация на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare), анионообменная хроматография на колонке Mono Q HR 16/10 (GE Healthcare), препаративный электрофорез в градиентном полиакриламидном геле. В качестве конечной стадии очистки повторно использовали анионообменную хроматографию на колонке Mono Q HR 16/10 в широком градиенте NaCl, что позволило дополнительно сконцентрировать препарат белка для дальнейших исследований. Удельная активность фермента составила 97,7 Е/мг со степенью очистки в 78 раз (табл. 1).

Таблица 1. Очистка респираторной нитратредуктазы из *T. lacustris* AS, n=3, P ≤ 0,05

Стадия очистки	Общий объём (мл)	Белок, мг	Общая активность (Е)	Удельная активность (Е/мг)	Выход %	Степень очистки
Лизат	18	626.4	780.84	1.24	100	1
Гель-фильтрация на Superdex G200	29	200.1	538.82	2.69	69	2.2
Анионообменная хроматография на MonoQ	3	25.2	195.78	7.76	25	6.3
Препаративный электрофорез в полиакриламидном геле	21	2.1	86.94	41.4	11	33.4
Анионообменная хроматография на MonoQ	1.5	0.56	16.94	97.75	2	78.3

pH оптимум нитратредуктазы. Эксперимент проводили в диапазоне pH 6 – 10. В качестве донора электронов использовали метилвиологен, бензилвиологен и бромфеноловый синий. Для восстановления донора электронов использовали дитионит натрия. По итогам эксперимента был рассчитан pH оптимум для нитратредуктазы с каждым из доноров электронов. Он составил 7,2 – 7,3 с

использованием метилвиологена, 6,0 – 6,2 с бензилвиологеном и 8,4 – 8,6 с бромфеноловым синим (рис. 1).

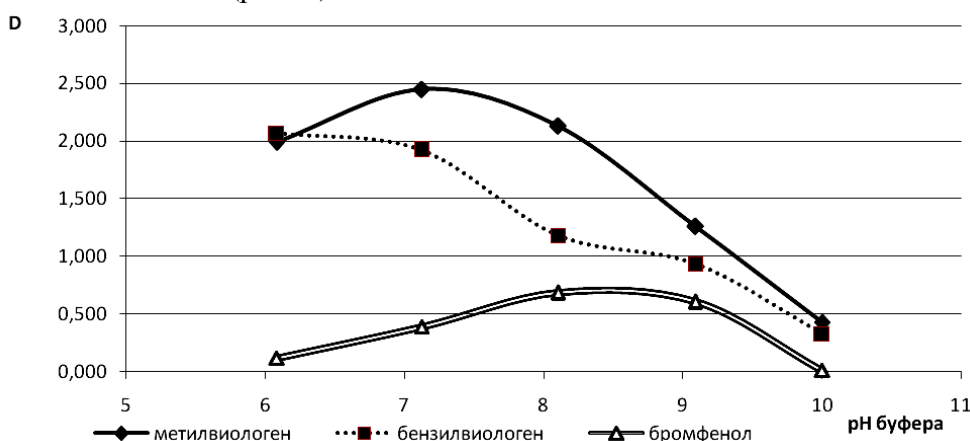


Рис. 1. pH оптимум респираторной нитратредуктазы

Температурный оптимум нитратредуктазы. Эксперимент проводили в температурном диапазоне от +5 до +100 °С с шагом от 4 до 8 градусов. Длительность экспозиции с каждой из выбранных температур составляла 10 минут. В качестве донора электронов использовали метилвиологен, pH реакционной среды – 7,3. Показано, что температурный оптимум фермента лежит в пределах от +63 °С до +65 °С (Рис 2). При этом в температурных границах от +5 °С до +25 °С, в которых и живёт *Thiothrix lacustris* AS активность нитратредуктазы составила менее 2% от максимальной.

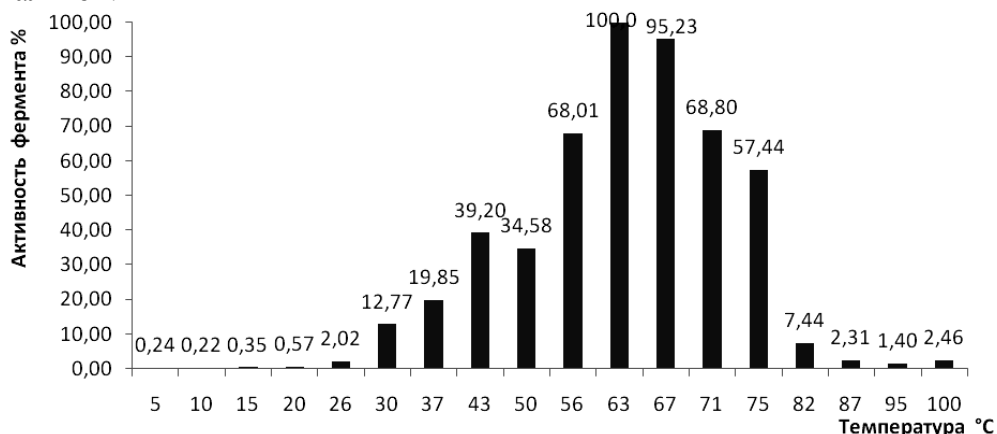


Рис. 2. Температурный оптимум респираторной нитратредуктазы

Термостабильность. Для изучения термостабильности был проведён ряд экспериментов, в которых пробы с ферментом экспонировались при температурах +50 °С в течении 4 часов и +60 °С в течение полутора часов. Измерение активности проводились при температуре реакционной смеси +60 °С. pH реакционной смеси - 7,3, в качестве донора электронов использовали метилвиологен (рис. 3).

При +50 °С фермент терял 50 % начальной активности за 2 часа. При повышении температуры на десять градусов (до +60 °С) происходило снижение активности до 30 % от начального уровня в течение 1 часа экспозиции.

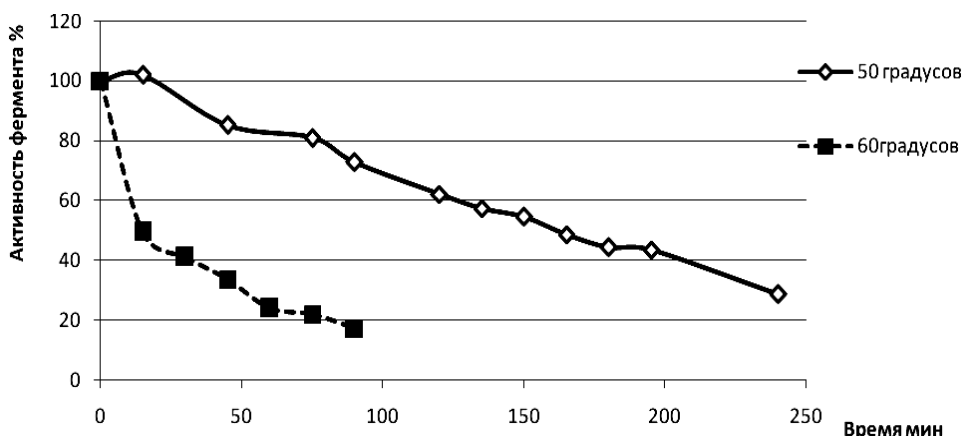


Рис. 3. Термостабильность респираторной нитратредуктазы при температуре реакционной смеси +50°C и +60°C

Влияние ингибиторов на активность фермента. Эксперимент проводили при температуре реакционной смеси +60 °С, рН - 7,3, в качестве донора электронов использовали метилвиологен. Концентрации веществ-ингибиторов брали в диапазоне от 0,01мМ до 10 мМ. Меркаптоэтанол и азид натрия существенно ингибировали фермент, в то время как ЭДТА, диэтилдитиокарбамид натрия и фенантролин не оказывали никакого влияния на активность нитратредуктазы (рис. 4).

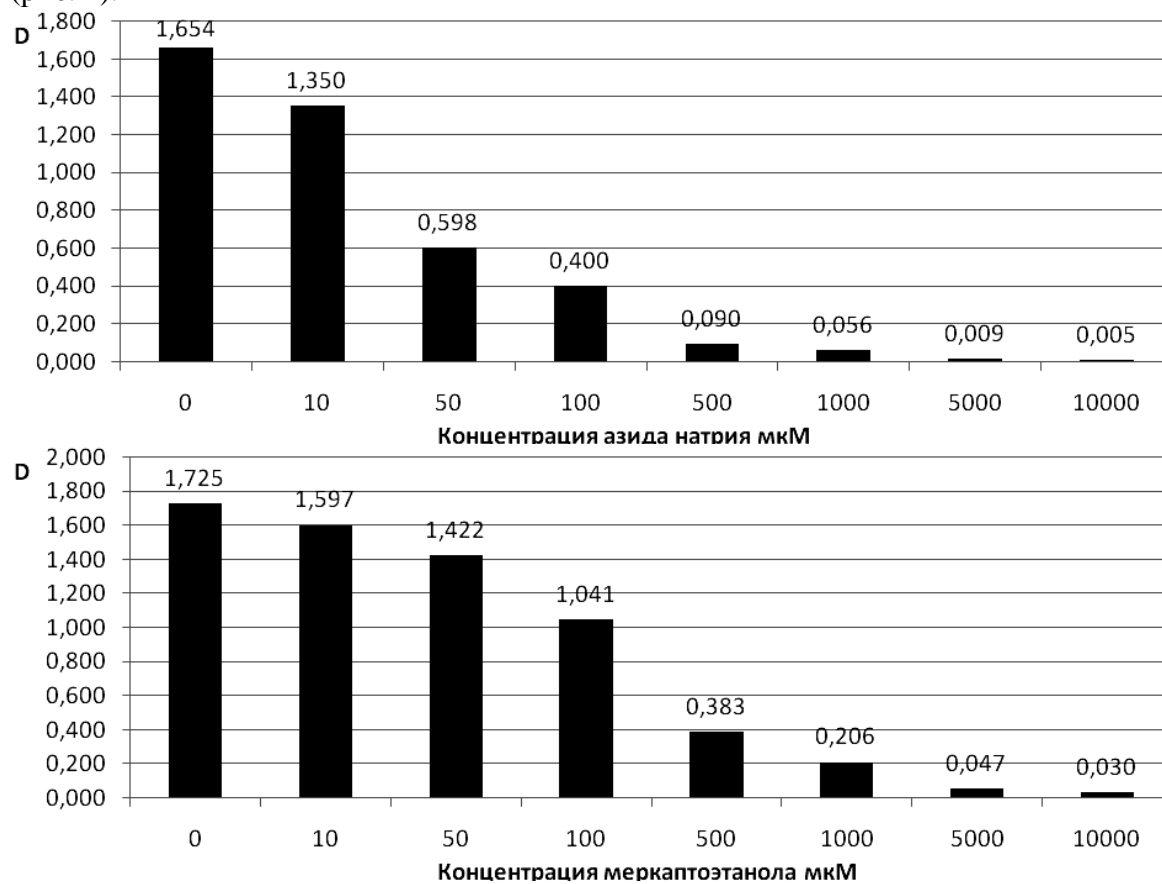


Рис. 4. Влияние ингибиторов (А - азид натрия, Б - меркаптоэтанол) на активность респираторной нитратредуктазы, выраженное через зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации ингибитора

Кинетические характеристики фермента были определены с нитратом натрия в качестве субстрата в стандартной реакционной смеси (смесь 1): 0,2 М натрий_фосфатный буфер рН 7,3; 0,01М NaNO₃; 0,01М метилвеологен; 0,1 М дитионит натрия для инициации реакции. Температура реакционной смеси +60 °С. Величина Km составила 0,234 mM; Vmax - 0,945 Е/мг.

Молекулярная масса и субъединичный состав. На очищенном препарате белка была определена молекулярная масса респираторной нитратредуктазы. Для этого был проведен нативный электрофорез в полиакриламидном геле. Для установления локализации белка в пластине геля было произведено специфическое окрашивание геля на нитратредуктазную активность с использованием смеси 1 (рис. 5а).

Было показано, что полученная нитратредуктаза представляет собой гетеродимер с массой субъединиц 100кДа и 80кДа (рис. 5б), что соответствует субъединицам NarG и NarH. Субъединицы NarI в составе белка обнаружено не было, что может быть объяснено локализацией NarI в плазматической мембране и её отрывом при механической обработке клеток в процессе выделения нитратредуктазы.

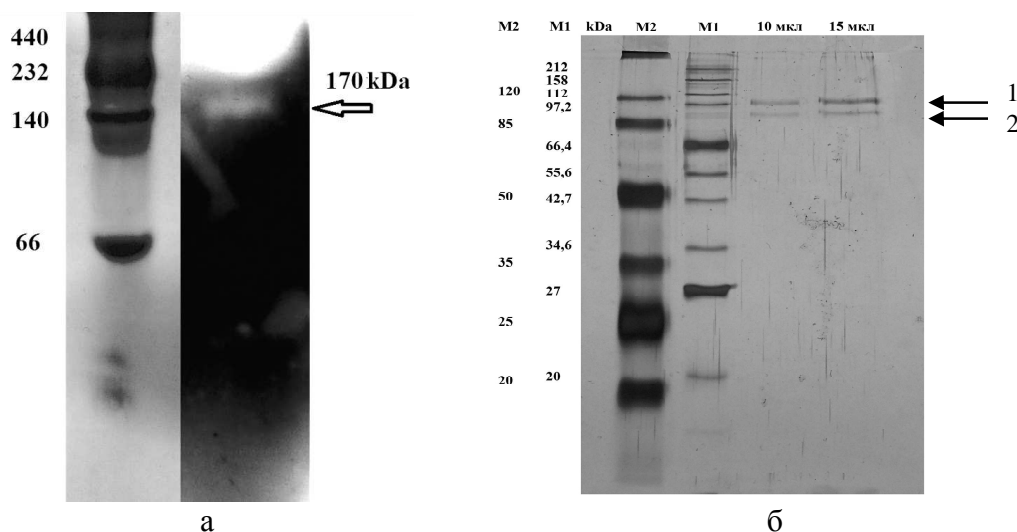


Рис. 5.а - специфическое окрашивание препарата нитратредуктазы на активность, б – денатурирующий электрофорез в ПААГ, демонстрирующий наличие двух субъединиц – NarG (1) и NarH (2) - в полученном препарате.

Заключение

Применяемая схема многостадийной очистки позволила получить ферментный препарат респираторной нитратредуктазы в электрофоретически гомогенном состоянии из бактерий *T. lacustris* AS с удельной активностью 97,7 Е/мг белка. Были исследованы физико-химические свойства и кинетические характеристики фермента, выделенного из бактерий, культивируемых в анаэробных условиях.

На сегодняшний день охарактеризовано несколько десятков респираторных нитратредуктаз прокариот [11], что позволяет сравнить полученные нами данные с имеющимися (табл. 2).

Применяя вышеуказанную схему очистки, на выходе мы получили гетеродимер NarGH с молекулярной массой 170кДа. Аналогичные параметры имеют нитратредуктазы бактерий рода *Pseudomonas*.

Таблица 2. Некоторые характеристики респираторной нитратредуктазы *Thiothrix lacustris* в сравнении с ранее описанными ферментами

Свойства фермента	Виды бактерий				
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Bacillus halodenitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Thiothrix lacustris</i>
Молекулярная масса	176	172	220	160	170
Масса субъединиц	118. 64	112. 70	145. 58. 23	127. 61. 21	100. 80
Km для NO ₃ ⁻ (mM)	0.3	3.8	2.7	0.3	0.23
pH оптимум	6–7	7.2	8–8.2	7.5	7.2–7.3

pH оптимум респираторной нитратредуктазы *Thiothrix lacustris* также совпадают с имеющимися данными. Температурный оптимум фермента составил +63 °С +65 °С, что значительно превышает таковой параметр других бактериальных нитратредуктаз [12]. Было показано, что респираторная нитратредуктаза *Thiothrix lacustris* является одним из наиболее термостабильных ферментов среди всех диссимиляционных нитратредуктаз, описанных на сегодняшний день [12]. Это позволило использовать для очистки фермента препаративный электрофорез и колоночную хроматографию без дополнительного охлаждения до +4 °С. Величина Km по нитрату для изучаемого фермента составила 0,23 мМ, что существенно ниже таковой для дыхательной нитратредуктазы других организмов [11]. В целом, описанная в настоящей работе респираторная нитратредуктаза, впервые выделенная и охарактеризованная для бактерий рода *Thiothrix* соответствует основным параметрам ферментов данной группы, но, в то же время, имеет ряд индивидуальных особенностей, чем представляет особый интерес для дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Blasco F., Iobbi C., Giordano G. et al. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: completion of the nucleotide sequence of the *nar* operon and reassessment of the role of the a and b subunits in iron binding and electron transfer // Mol. Gen. Genet. 1989. V. 218. P. 249-256.
2. Трубицын И.В., Андреевских Ж.Г., Юревич Л.И. и др. Способность к нитратному дыханию как новый аспект метаболизма нитчатых серобактерий рода *Thiothrix* // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 19-26.
3. Armbruster E.H. Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus* // Appl. Microbiol. 1969. V. 17. P. 320-321.
4. Pfennig N.D., Lippert K.D. Uber das vitamin B12 – bedurfuisphototropher Schwefelbakterien // Arch. Microbiol. 1966. V. 55. № 1. P. 245–256.
5. Murillo F.M., Gugliuzzo T., Senco J. et al. A heme C containing enzyme complex that exhibits nitrate and nitrite reductase activity from the dissimilatory iron_reducing

bacterium *Geobacter metallireducens* // Arch. Microbiol. 1999. V. 172. P. 313-320.

6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochem. 1976. V. 72. P. 248-254.

7. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж. Водолей.2004. 528 с.

8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.

9. Покусаева В.О., Антипов С.С., Швырева У.С. и др. Суперпродукция, выделение и очистка функционально активного бактериоферритина Dps *E.coli* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2012. Т.12. №6. С.1011-1017.

10. Рудакова Л.В., Селеменев В.Ф. Контроль качества и подлинности фармацевтической продукции с использованием цифровых технологий. В кн. «Проблемы аналитической химии» Т. 16. «Фармацевтический анализ» - М.: Аргамак. Медиа. 2013. С. 269-308.

11. Zumft W.G. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification // Microbiology and molecular biology reviews. 1997. V. 61, № 4. P. 533-616.

12. Antipov A.N., Morozkina E.V., Sorokin D.Y. et al.Characterization of Molybdenum-Free Nitrate Reductase from Haloalkalophilic Bacterium Halomonas sp. Strain AGJ 1-3 // Biochemistry (Moscow). 2005. V. 70. № 7. P. 799-803.

Трубицин Иван Васильевич — аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Грабович Маргарита Юрьевна – д.б.н., профессор кафедры биохимии и физиологии клетки биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета, Воронеж

Тутукина Мария Николаевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН, Пущино

Trubitsin Ivan V. — PhD student, Voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh; e-mail: tru.ivan@mail.ru

Grabovich Margarita Yu. – Doctor of Biology, professor, Voronezh State University, the Biology Department, Division of Cell Biochemistry and Physiology, Voronezh e-mail: margarita_grabov@mail.ru

Tutukina Maria N. – PhD in Molecular biology, senior research scientist in the laboratory of Functional genomics and cellular stress, Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, maria@icb.psn.ru