

## Оценка эффективности фагозависимого синтеза $\beta$ -галактозидазы

Л. Г. Глушакова\*, В. А. Кордюм

---

*В работе приведены различные методические подходы к оценке эффективности системы фагозависимого синтеза  $\beta$ -галактозидазы *Escherichia coli**

---

**Введение.** Современные технологии получения биологически активных соединений, в частности ферментов, нуждаются в количественных оценках. Для фермента основным количественным показателем является его биологическая активность, которая оценивается по эффективности расщепления субстрата. Ферментативные препараты характеризуют также по удельной активности. Этот показатель относительный и зависит от степени очистки препарата. Для оценки эффективности биотехнологических генноинженерных систем необходимо соотнести количество целевого индивидуального белка к общему содержанию микробных клеточных белков. Если целевой белок, который в нашем случае является ферментом, сохраняет нативность и биологическую активность, то исходя из известного значения удельной активности очищенного фермента можно определить его количественное содержание или его выход в системе. В противном случае (то есть когда белок, полученный в такой системе, неактивен или частично активен) этот расчет может оказаться неверным. Ранее [1—3] нами разработана система фагозависимого синтеза  $\beta$ -галактозидазы в *Escherichia coli*. В отличие от традиционно существующих промышленных способов получения этого важного фермента, она имеет значительно большую продуктивность (в 100 раз и более). Кроме того, упомянутому способу получения  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* присущи две особенности. Во-первых, ген фермента (*z*) включен в ДНК фага  $\lambda$ , и в этом отношении мы имеем дело с генноинженерной векторной системой, позволяющей значительно умножить число копий *z*-гена в бактериальной клетке. Во-вторых, этот фермент синтезируется в естественных условиях в *E. coli*, что позволяет обходить многие трудности, связанные с микробным получением чужеродных белков. Часто в наших условиях бывает необходимо оценить эффективность системы фагозависимого синтеза  $\beta$ -галактозидазы как в ферментативных единицах активности, так и определением его содержания в клеточном лизате относительно всех клеточных белков. Это обусловлено двумя задачами: максимально увеличить содержание целевого белка и при этом сохранить его биологическую активность. В данной работе мы попытались установить правомерность использования расчетов количественного содержания  $\beta$ -галактозидазы в клеточном лизате, основанных на определении активности фермента и исходя из известного значения удельной активности очищенного фермента.

---

\*Correspondence address.

**Материалы и методы.** Культуральные среды, штаммы *E. coli* и фага  $\lambda$ , а также способ получения  $\beta$ -галактозидазы подробно приведены в [1—3].

Активность  $\beta$ -галактозидазы в растворе определяли по эффективности расщепления ею синтетического хромогенного субстрата ОНФГ, который освобождает при этом эквимольное количество нитрофенола [4]. Интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически при длине волны 420 нм. Реакцию осуществляли с 1 мл раствора  $\beta$ -галактозидазы в Na-K-фосфатном буфере, рН 7,0, внося 0,2 мл раствора субстрата (4 мг/мл). Реакцию останавливали спустя 15 мин, добавив в реакционную смесь 1 мл 1 М раствора  $\text{NaCO}_3$ .

Единицы оптического поглощения при 420 нм пересчитывали на международные единицы активности (за единицу активности принято такое количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 30 °С) по формуле

$$A \text{ (мкмоль} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}) = (\text{ОП}_{420} \cdot 2,2) / 4,5 t,$$

где  $A$  — активность фермента;  $\text{ОП}_{420}$  — значение оптической плотности при длине волны 420 нм; 2,2 — разведение реакционной смеси в опыте; 4,5 — коэффициент микромолярной экстинкции нитрофенола;  $t$  — время проведения реакции, равное 15 мин.

Количество белка фермента вычисляли, основываясь на том, что удельная активность  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* равна 320 [4]. Затем, определив значение активности  $\beta$ -галактозидазы в опыте, проводили расчет по формуле

$$\beta\text{-галактозидаза (мг/мл)} = A/A_{\text{уд.}}$$

Значение удельной активности  $\beta$ -галактозидазы, очищенной в наших условиях (320 ед/мг белка), соответствует, по литературным данным, активности чистого фермента (300—320 ед/мг белка) [5—6].

**Количественное определение клеточных белков с помощью биуретовой реакции.** К аликвоте клеточной суспензии объемом 1 мл добавляли 3 мл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Смесь помещали на кипящую водяную баню на 20 мин. Пробу охлаждали при комнатной температуре, преципитат осаждали низкоскоростным центрифугированием. К осадку добавляли 1 мл 1 н. раствора NaOH, встряхивали в течение 30 мин при 20 °С. Пробу центрифугировали, к супернатанту добавляли по 4 мл биуретового реактива, пробирки встряхивали и оставляли на 30 мин при 28 °С для развития окраски. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре СФ-4А при 540 нм. В качестве контроля использовали смесь 1 мл 1 н. раствора NaOH и 4 мл биуретового реактива, предварительно проинкубированную в течение 30 мин при 28 °С.

**Приготовление биуретового реактива.** 1,5 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 6 г  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  растворяли в 0,5 л воды, добавляли 300 мл 15 %-го раствора NaOH, приготовленного на прокипяченной дистиллированной воде. Полученный раствор отстаивали в течение 2 дней и затем фильтровали. Для предотвращения самопроизвольного окисления добавляли 2 г KI. Приготовленный раствор доводили бидистиллированной водой до объема 2 л и хранили в темной посуде.

**Построение калибровочной кривой.** Для построения калибровочной кривой использовали коммерческий сывороточный альбумин фирмы «Reanal» (Венгрия). Навеску альбумина растворяли в дистиллированной воде и производили ряд серийных разведений. В отдельные пробирки отбирали по 1 мл каждого разведения, добавляли по 3 мл 0,3 М раствора

ТХУ кислоты и далее следовали приведенной выше методике. Каждая точка кривой является средним арифметическим значением 4—5 экспериментов.

Количественное определение белков по методу Бредфорд осуществляли по методике, изложенной в [7].

*Определение сухой биомассы культуры E. coli.* Культуру *E. coli* выращивали в жидкой питательной среде [1—3] объемом 100 мл. На 100 мл среды вносили 5—7 мл ночной культуры. После инкубирования в течение 20 ч клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием, среду декантировали, осадок ресуспендировали в небольшом объеме дистиллированной воды (7—10 мл), переносили в химический стакан объемом 25 мл. Предварительно вымытый и высушенный стакан помещали в эксикатор с хлористым кальцием. Непосредственно перед внесением ресуспендированного клеточного осадка стакан взвешивали на аналитических весах до четвертого знака после запятой. Осадок высушивали в течение ночи при 105 °С. Не охлаждая, переносили в эксикатор, содержащий сухой хлористый кальций, далее (после охлаждения) стакан с высушенным осадком взвешивали на аналитических весах. Сухая биомасса равна разности двух этих величин. Считается, что 50 % сухой биомассы составляют клеточные белки.

Белковый азот в препаратах определяли по методу Кьельдаля [7].

*Электрофорез белков. Приготовление реактивов и сред для электрофореза.* Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу, предложенному Леммли [8]. Верхний концентрирующий гель содержал 5 %-й ПААГ, 0,25 %-й (по массе) N, N-бис-метиленакриламид, 0,125 М трис-HCl (рН 6,8) и 0,1 %-й DS-Na. Гель полимеризовали добавлением 0,025 %-го (по объему) тетраметилэтилендиамина (ТЭМЭД) и персульфата аммония.

Рабочий, или разделяющий, гель содержал 9—10 %-й ПААГ, 0,25 %-й N, N-бис-метиленакриламид, 0,375 М трис-HCl (рН 8,8) и 0,1 %-й DS-Na. Полимеризацию проводили так же, как и для концентрирующего геля. Электродный буфер (рН 8,3) содержал 0,025 М трис-HCl, 0,192 М глицин, 0,1 %-й DS-Na.

*Подготовка образцов для электрофореза.* Образцы культуры в объеме 1 мл подвергали низкоскоростному центрифугированию (3000—5000 об/мин, 15 мин), надосадок декантировали, клеточный осадок ресуспендировали в 0,2—0,3 мл лизирующего буфера Леммли. Конечные концентрации реагентов в буфере составляют: 0,0625 М трис-HCl (рН 6,8), 2 %-й DS-Na, 10 %-й глицерин, 5 %-й 2-меркаптоэтанол и 0,001 %-й лидирующий краситель бромфеноловый синий. Перед нанесением на поверхность геля образцы кипятили 1,5—5 мин.

*Проведение электрофореза.* Для электрофореза белков использовали пластины длиной 14 и шириной 12,5 см. Полимеризацию акриламида и электрофорез вели в форме, образованной двумя пластинами зеркального стекла, толщина формы (и геля) 2 мм. Условия ведения электрофореза: сила тока 40—50 мА, напряжение 120 В, время проведения электрофореза 6—7 ч. Для вхождения красителя в гель (15—20 мин) использовали вдвое меньшие значения силы тока и напряжения.

*Окраска гелей.* Гели фиксировали в 10 %-м растворе ТХУ в течение 20 мин, окрашивали красителем амидочерным (растворяли до концентрации 1 % в 7 %-м растворе ТХУ) или кумасси ярко-голубым R-250 фирмы «Serva» (ФРГ) (растворяли до конечной концентрации 0,25—0,5 % в 9—10 %-м растворе ТХУ и 40—45 %-м растворе метанола по объему). Окрашивание проводили в течение 20 мин. Гели отмывали от несвязавшегося с белками красителя, вымачивая в 7 %-м растворе уксусной кислоты. Гели обезвоживали в 50 %-м растворе этанола в течение 1—2 сут.

**Денситометрия.** Денситометрирование электрофореграмм осуществляли на лазерном денситометре «LKB Ultrosan XL» (Швеция).

**Результаты и обсуждение.** Для решения поставленной задачи необходимо было сравнить две группы данных о содержании  $\beta$ -галактозидазы в клеточных лизатах. В первом случае содержание  $\beta$ -галактозидазы вычисляли исходя из значения ферментативной активности клеточных лизатов и известной удельной активности очищенного фермента; во втором — определяли тотальное содержание белков и на основании процентного вклада  $\beta$ -галактозидазы (денситометрируя белковые электрофореграммы лизатов) устанавливали ее количественное содержание в препаратах. Тотальное содержание белков в клеточных лизатах мы определяли с помощью различных методов: колориметрических, метода Кьельдаля, а также на основании вычисления значения сухой биомассы культуры (белки составляют 50 % биомассы). Значительные разночтения в количественных оценках тотального белка получены при использовании колориметрических методов: Бредфорда и биуретовой реакции (табл. 1). На возможность подобных разночтений указывали Кондакова с соавт. [9]. Колориметрические методы определения белков являются самыми распространенными и высокочувствительными. Например, метод Бредфорда, основанный на взаимодействии белков с Кумасси бриллиантовым голубым R-250, позволяет определить до 0,5 мкг белка в пробе (а в некоторых модификациях и до 0,1 мкг). Однако при расчетах концентраций белков в растворах (как индивидуальных, так и клеточных экстрактах) для построения калибровочных кривых обычно используют навески сывороточного альбумина (так же, как и в нашем случае). Авторы показали, что использование калибровочных кривых по альбумину приводит иногда к значительным искажениям количественных оценок. Так, для некоторых белков количественные оценки по методу Бредфорда отклоняются в ту или другую сторону в 2—5 раз, биуретовая реакция дает отклонения в 1,5—2 раза.

Учитывая вышесказанное мы остановились на классическом методе Кьельдаля в модификации Барштейна, основанном на количественном определении общего и белкового (после осаждения белка и отделения его от растворимых азотсодержащих веществ) азота. Кроме того, содержание белков оценивали, как 50 % сухой биомассы (табл. 2).

**Таблица 1**  
Оценка содержания тотальных клеточных белков в системе колориметрическими методами (мг/мл)\*

Штамм фага	Определение по методу Бредфорда	Биуретовая реакция
1	2±0,1	8±0,5
2	2,4±0,1	8,5±0,6

**Примечание.** Здесь и в табл. 2 штаммы 1 и 2 —  $Q^+ R^-$  и  $N^+ N^-$  — производные фага  $\lambda$  *prlac5* (см. [1—3]). \*Приведены средние данные четырех независимых определений.

**Таблица 2**  
Содержание тотальных клеточных белков в системе суперсинтеза  $\beta$ -галактозидазы (г/л)

Штамм фага	Определение по методу Барштейна	50 % сухой биомассы
1	3,1±0,1	3,2±0,1
2	3,4±0,2	3,2±0,2

1 2 3 4 5 6 7 8 9

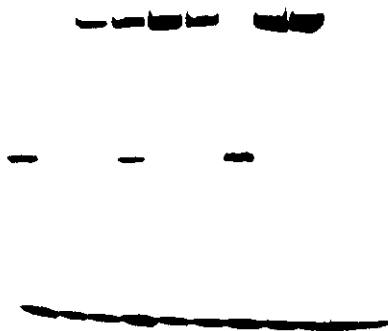


Рис. 1. Белковые электрофореграммы лизатов клеток, инфицированных фагом  $\lambda$ plac5N7N53: 1, 7 — контроль незараженных клеток; 2 — множественность инфекции 1—2 корп/кл, выход  $\beta$ -галактозидазы около 100 мг/л; 3, 4, 5 — множественность инфекции менее 10 корп/кл, выход  $\beta$ -галактозидазы 600—800 мг/л; 6 — множественность инфекции 10 корп/кл, выход  $\beta$ -галактозидазы 1 г/л; 8, 9 — множественность инфекции 15—20 корп/кл, выход  $\beta$ -галактозидазы 1,15 г/л

Данные, представленные в табл. 2 и полученные двумя независимыми методами, полностью совпадают. Процентное содержание  $\beta$ -галактозидазы в клеточных лизатах определяли, денситометрируя электрофореграммы соответствующих лизатов. На рис. 1 представлены электрофореграммы клеточных лизатов, содержащих  $\beta$ -галактозидазу. Подробно процесс получения  $\beta$ -галактозидазы описан в [1—3]. Здесь лишь отметим, что на выход фермента оказывает большое влияние множественность фаговой инфекции. На рис. 1 приведены электрофореграммы лизатов клеток, исходно инфицированных с различной множественностью так, что содержания главных пиков, соответствующих  $\beta$ -галактозидазе *E. coli*, различаются между собой. В лизатах, аликвоты которых наносили на гель, определяли ферментативную активность и исходя из значения удельной активности вычисляли количества  $\beta$ -галактозидазы по формуле, приведенной в «Материалах и методах». На рис. 2, 3 представлены денситограммы электрофореграмм клеточных лизатов, содержащих  $\beta$ -галактозидазу (треки 9 и 5, рис 1). Ниже для каждого отдельного случая приведен расчет количества  $\beta$ -галактозидазы

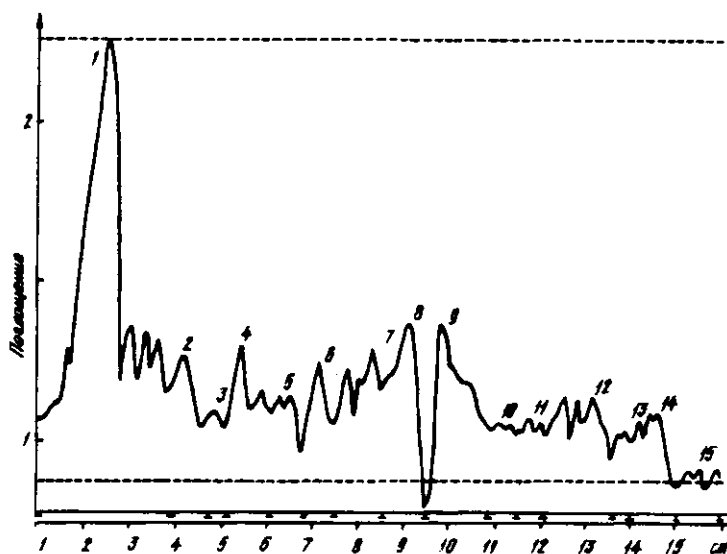


Рис. 2. Денситограмма электрофореграммы, представленной на рис. 1, 9-й трек: относительные площади пиков (%) по данным денситометрии (1 — 36,2; 2 — 5,8; 3 — 2,1; 4 — 6,3; 5 — 4,1; 6 — 4,4; 7 — 7,5; 8 — 7,4; 9 — 9,0; 10 — 2,7; 11 — 2,5; 12 — 6,9; 13 — 1,5; 14 — 3,2; 15 — 0,4)

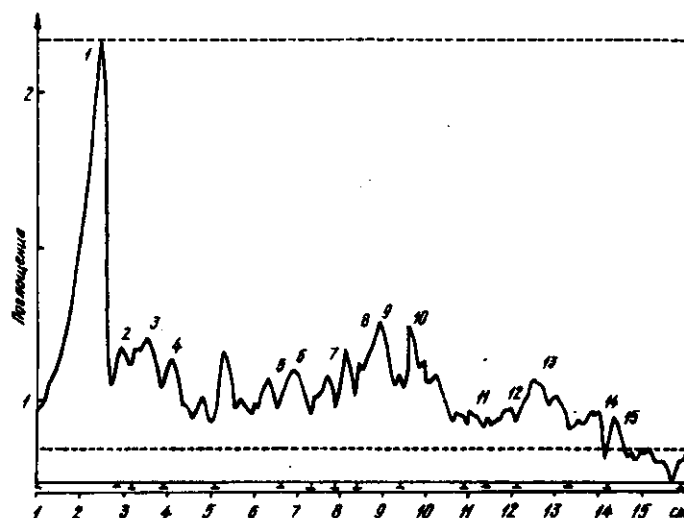


Рис. 3. Денситограмма электрофореграммы, представленной на рис. 1, 5-й трек: относительные площади пиков (%) по данным денситометрии (1 — 30; 2 — 3,5; 3 — 7,0; 4 — 6,4; 5 — 8,3; 6 — 4,7; 7 — 3,5; 8 — 4,0; 9 — 9,3; 10 — 10,1; 11 — 1,9; 12 — 2,4; 13 — 5,8; 14 — 2,4; 15 — 0)

в г/л по уже упомянутой формуле. Содержание  $\beta$ -галактозидазы в образце 5 составило 1 г/л, в образце 8 — 1,15 г/л. На основе этих значений рассчитывали общее содержание клеточных белков в пробах, принимая его за 100 % :

$$\text{трек 9: } (100 \% \cdot 1,15) / 36,2 = 3,18 \text{ г/л;}$$

$$\text{трек 5: } (100 \% \cdot 1) / 30 = 3,3 \text{ г/л.}$$

Эти величины хорошо согласуются с данными, полученными двумя другими независимыми методами (табл. 2).

Результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что в препаратах, полученных нашим способом, сохраняется нативность  $\beta$ -галактозидазы. Поэтому мы имеем возможность рассчитывать примерное содержание индивидуального белка  $\beta$ -галактозидазы в неочищенных клеточных лизатах исходя из экспериментальных значений ферментативной активности  $\beta$ -галактозидазы.

*Л. Г. Глушакова, В. А. Кордюм*

Оцінка ефективності системи фагозалежного синтезу  $\beta$ -галактозидази

Резюме

*У роботі наведено різні методичні підходи до оцінки ефективності системи фагозалежного синтезу  $\beta$ -галактозидази Escherichia coli.*

*L. G. Glushakova, V. A. Kordium*

Estimate of efficiency of  $\beta$ -galactosidase system depending on phage  $\lambda$  developing

Summary

*Different methodical approaches have been done to estimate the efficiency of  $\beta$ -galactosidase system depending on phage  $\lambda$  developing.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Черных С. И., Глушакова Л. Г., Кордюм В. А. Исследование фагозависимого синтеза  $\beta$ -галактозидазы клетками *Escherichia coli* // Микробиол. журн.—1979.—41, N 5.—С. 479—483.
2. Кордюм В. А., Глушакова Л. Г., Черных С. И. Использование N-производных фага *plac5* для суперсинтеза  $\beta$ -галактозидазы // Докл. АН СССР.—1980.—225, N 3.—С. 760—762.
3. Глушакова Л. Г., Черных С. И., Стельмашенко Л. Н., Кордюм В. А. Суперсинтез  $\beta$ -галактозидазы, индуцированный некоторыми амбер-мутантами фага *plac5c1857* // Молекуляр. биология. — Киев: Наук. думка, 1982.—Вып. 30.—С. 56—59.
4. Миллер Дж. Определение ферментов лактозного оперона // Эксперименты в молекуляр. генетике.—М.: Мир, 1976.—С. 324—327.
5. Graven G. R., Steers E., Anfinsen C. B. Purification, composition and molecular weight of the  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* K-12 // J. Biol. Chem.—1965.—240.—P. 2468—2477.
6. Steers E., Cuatrecasas P., Pollard M. The purification of  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by affinity chromatography // J. Biol. Chem.—1971.—246, N 1.—P. 279—283.
7. Филипович Ю. Б., Угороа Т. А., Севастьянова Г. А. Количественное определение белков // Практикум по общ. биохимии.—М: Просвещение, 1982.—С. 67—80.
8. Laemmli U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 680—685.
9. Кондакова Н. В., Божко Г. В., Коржова Л. П. Оценка различных количественных методов определения белков, нативных и обработанных формальдегидом // Вопросы мед. химии.—1983.—29, N 2.—С. 134—140.