

І. П. Токовенко, Л. П. Маліновська,  
член-кореспондент НАН України І. Г. Скрипаль

## Позаклітинна фруктозобісфосфатаза збудника блідо-зеленої карликовості зернових: молекулярно-біологічні та серологічні властивості

Досліджено молекулярно-біологічні та серологічні властивості позаклітинної фруктозобісфосфатази (ФБФази) збудника блідо-зеленої карликовості зернових *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118. Застосування субстратспецифічної хроматографії під час очищення цього ферменту дало можливість одержати білок з високим ступенем чистоти (176,4). Визначено молекулярну масу позаклітинної ФБФази в нативному (230 000 Да) та денатурованому (56 600 Да) станах. Встановлено, що ФБФаза складається з чотирьох однакових субодиниць (по 56 600 Да кожна). Виявлено подібність, але не ідентичність позаклітинної ФБФази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 з одноіменним ферментом *Bacillus subtilis* 668 у серологічному відношенні.

Відомо, що найважливішими системами ферментів організмів і мікроорганізмів є системи, які забезпечують процеси глікогенезу і глюконеогенезу. Фруктозобісфосфатаза (ФБФаза) [1–5] як ключовий фермент глюконеогенезу каталізує перетворення фруктозо-1,6-бісфосфату у вкрай необхідний для мікроорганізмів фруктозо-6-фосфат. Внутрішньоклітинні ФБФази відіграють головну роль у процесах гліколізу та глюконеогенезу, тоді як природа, призначення та функції позаклітинних ФБФаз у мікроорганізмів до цього часу ще не з'ясовані.

Метою проведеного нами дослідження було визначення молекулярної маси, субодиничного складу позаклітинної ФБФази збудника блідо-зеленої карликовості зернових *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118, а також порівняльне вивчення серологічних властивостей ФБФаз *A. laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 і *Bacillus subtilis* 668, оскільки бактерії роду *Bacillus* вважаються філогенетичними предками молікутів, у тому числі і роду *Acholeplasma* [6].

Об'єктом досліджень була фітопатогенна ахолеплазма *A. laidlawii* var. *granulatum* шт. 118, яку вирощували в 900 мл рідкого поживного середовища СМ ІМВ-72 протягом 48 год [7].

Для можливості дослідження молекулярно-біологічних властивостей позаклітинної ФБФази *A. laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 необхідно було одержати препарат цього ферменту в чистому вигляді. Очищення ФБФази досліджуваної фітопатогенної ахолеплазми проводили в декілька етапів: 1 — осадження білків з культуральної рідини *A. laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 1,6 М сульфатом амонію (СА) (40% насичення), у результаті застосування якого вдалося звільнитися від білків, що не мали ФБФазної активності; 2 — фракціонування культуральної рідини, переосадженої 40% СА на гідрофобній колонці з тойоперлом НВ-60 (висота колонки ( $h$ ) 10,0 см; діаметр ( $d$ ) 5,0 см; об'єм колонки ( $v$ ) 100 мл); 3 — переосадження білків 2,8 М (70% насичення) СА; 4 — десальтування на молекулярному ситі на іонно-обмінній колонці із сефадексом G-10 ( $h = 12,0$  см;  $d = 4,0$  см;  $v = 100$  мл); 5 — субстратспецифічна хроматографія на КМ-сефарозі ( $h = 22,0$  см;  $d = 1,0$  см;  $v = 34,5$  см<sup>3</sup>).

На кожному етапі очищення досліджуваного ферменту, використовуючи колонки з різними наповнювачами, виконували таку процедуру: колонку з певним наповнювачем (тойперлом HW-60, сефадексом G-10, КМ-сефарозою) урівноважували відповідним буфером (забуферений фізіологічний розчин (ЗФР) з 1,6 М СА — для тойперлу HW-60; ЗФР без СА — для сефадексу G-10 та ЗФР з 0,02 М NaCl — для КМ-сефарози) і наносили на неї препарат, після чого колонку ретельно відмивали тим самим буфером (відповідно до наповнювача) до зникнення слідів білка на виході колонки. Елюцію відповідним елююючим буфером розпочинали після виходу вільного об'єму колонки.

З кожної колонки фракції збирали однакою об'ємом: по 10 мл — при використанні колонки з тойперлом HW-60; по 5 мл — під час елюції з колонки із сефадексом G-10 та по 1,5 мл — при зборі фракцій з КМ-сефарози.

На всіх етапах у кожній фракції визначали активність ФБФази та концентрацію білка. Активні за цими показниками фракції об'єднували і використовували для очищення в подальших етапах.

Активність ФБФази визначали за методом Фіске-Суббароу [8, 9] за наявною кількістю неорганічного фосфору ( $\Phi_n$ , мг/л) у пробах, яку встановлювали за допомогою фотоколориметра КФК-2 при  $A_{660\text{нм}}$ .

За одиницю активності ФБФази приймали ту її кількість, яка забезпечувала вивільнення 1,0 мкМ  $\Phi_n$  за 1 хв. Питому активність виражали кількістю одиниць ФБФази на 1,0 мг білка.

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда [10].

Молекулярну масу позаклітинної ФБФази спочатку визначали в нативних умовах на колонці із сефадексом G-200 ("Pharmacia", Швеція), для чого використовували препарат ФБФази, одержаний під час останнього етапу очищення — субстратзалежної елюції з колонки з КМ-сефарозою. Колонку із сефадексом G-200 ( $h = 370$  мм;  $d = 35$  мм;  $v = 203,5$  см<sup>3</sup>; вільний об'єм — 90 мл) урівноважували тим самим буфером, який використовували для елюції ферменту з колонки з КМ-сефарозою.

Для калібрування колонки використовували такі маркерні білки, як хімотрипсиноген А (мол. маса 25 000), овальбумін (мол. маса 43 000), бичачий сироватковий альбумін (БСА) (мол. маса 67 000), альдолаза (мол. маса 158 000) та каталаза (мол. маса 232 000).

Визначення молекулярної маси досліджуваного ферменту в денатурованих умовах проводили, застосовуючи метод електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (ПААГ) з 0,1% додецилсульфатом натрію, який був денатураційним фактором у цій системі. При цьому використовували препарати ФБФази, одержані після елюції з КМ-сефарози та осажені ацетоном і висушені ефіром. Маркерними білками в цій системі були: фосфорилаза В (мол. маса 94 000), БСА (мол. маса 67 000), овальбумін (мол. маса 43 000), карбоангідраза (мол. маса 30 000) та інгібітор трипсину (мол. маса 20 000). Електрофорез проводили при напрузі 150 В і силі струму 40 мА протягом 4 год, після чого гель забарвлювали 0,5%-м розчином Кумасі R-250, потім його відмивали від залишків барвника та денситометрували на спектрофотометрі фірми "Beckman" при довжині хвилі 552 нм, що відповідає максимуму поглинання барвника Кумасі R-250. Точний вимір шляху пробігу (в мм) кожного з білків визначали за піком поглинання кожної із забарвлених білкових смуг.

Серологічні властивості ФБФаз збудника блідо-зеленої карликовості зернових *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *B. subtilis* 668 вивчали в порівняльному аспекті за допомогою реакції подвійної дифузії в гелі за Оухтерлоні, яка є високоефективним аналітичним засобом для розподілу складних антигенних систем і вивчення їх антигенного складу [11].

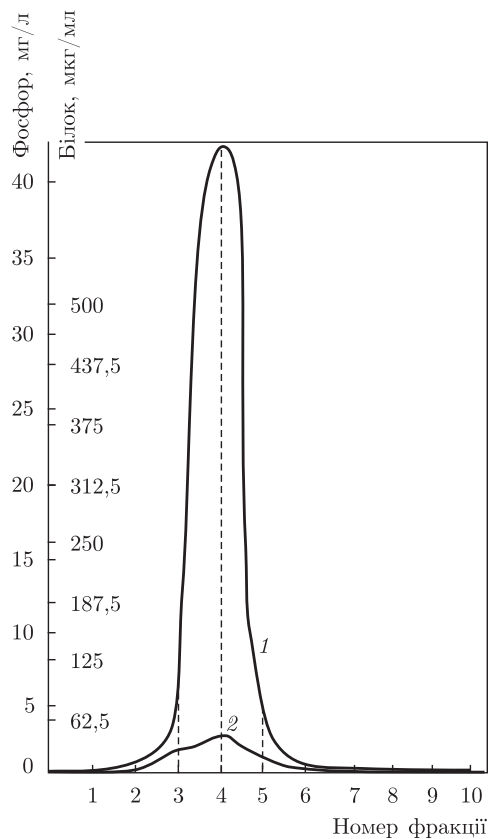


Рис. 1. Субстратзалежна хроматографія ФБФази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 на колонці з КМ-сефарозою: 1 — фосфор, 2 — білок

При використанні субстратспецифічної хроматографії на КМ-сефарозі для очищення позаклітинної ФБФази виявлено найбільшу ФБФазну активність у її фракції (вміст фосфору — 43 мг/л; вміст білка — 27 мкг/мл). Вміст фосфору в 3-й та 5-й фракціях становив 6 і 5 мг/л відповідно. Вміст білка при цьому дорівнював 31 мкг/мл у 3-й фракції та 15 мкг/мл — у 5-й (рис. 1). Отже, на цьому етапі очищення було одержано препарат позаклітинної ФБФази загальним об'ємом 3,0 мл і сумарною активністю 54 мг/л. Вміст білка в препараті дорівнював 336 мкг/мл.

Таким чином, у результаті запропонованого методу очищення позаклітинної ФБФази збудника блідо-зеленої карликовості зернових *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 було виділено білок з високим ступенем чистоти (176,4), що дало змогу дослідити його молекулярно-біологічні властивості.

При дослідженні молекулярно-біологічних властивостей ФБФази *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 було встановлено молекулярну масу нативної позаклітинної ФБФази досліджуваної ахолеплазми —  $(230\,000 \pm 5\,000)$  Да (рис. 2).

При вивченні субодиночного складу та молекулярної маси субодиноць ферменту методом електрофорезу в 10%-му ПААГ на доріжці, на яку було нанесено препарат ФБФази, виявлено лише одну лінію, яка була локалізована між БСА та овальбуміном (рис. 3). З урахуванням шляху пробігу білка ФБФази визначено його молекулярну масу, що дорівнювала 56 600 Да.

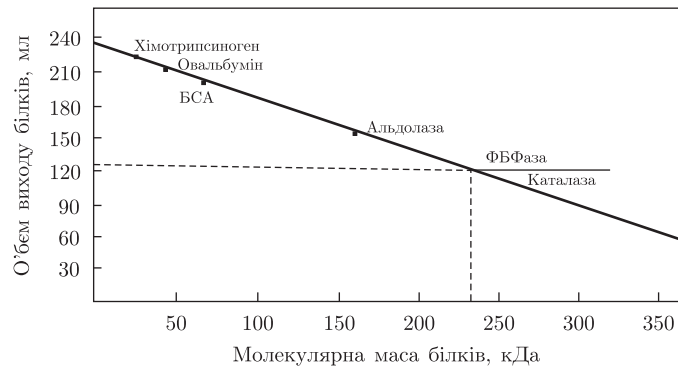


Рис. 2. Визначення молекулярної маси ФБФази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 в нативному стані за допомогою її гель-фільтрації на колонії із сефадексом-200

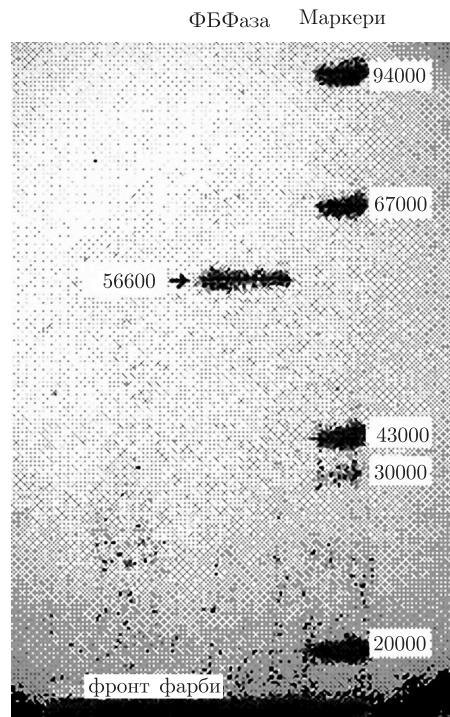


Рис. 3. Електрофорез ФБФази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 в 10%-му ПААГ з додецилсульфатом натрію

Оскільки молекулярна маса білка нативного ферменту становила  $(230\,000 \pm 5\,000)$  Да, а в денатурованих умовах — 56 600 Да, то шляхом ділення встановлено, що позаклітинна ФБФаза *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 складається з чотирьох однакових субодиниць. Отже, за своїми молекулярно-біологічними властивостями позаклітинна ФБФаза досліджуваної ахолеплазми займає проміжне положення серед ФБФаз інших мікроорганізмів як за молекулярною масою, так і за субодиничним складом. Так, її молекулярна маса в нативному стані більш ніж у два рази вища за молекулярну масу ФБФази *Candida utilis* (мол. маса 100 000 Да) [12] і більш ніж у два рази менша від однойменних ферментів *B. subtilis* і *B. licheniformis* [13, 14].

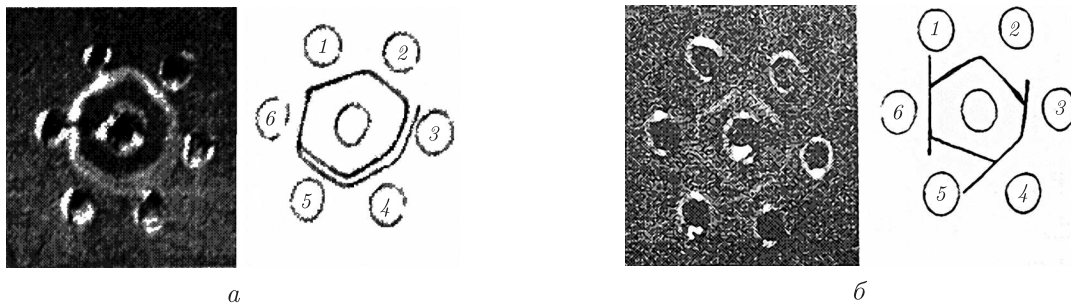


Рис. 4. Порівняння серологічної спорідненості досліджуваних ФБФаз:  
 а — преципітація в гелі антисироватки до позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 з гомологічною ФБФазою (лунки 1, 2 і 6) та з ФБФазою *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 (лунки 3, 4 і 5);  
 б — перехресна реакція подвійної дифузії в агарі: центральна лунка — ФБФаза *B. subtilis* 668; лунки 1, 2, 5 — антисироватка до ФБФази *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118; 3, 4, 6 — антисироватка до ФБФази *B. subtilis* 668

Таким чином, позаклітинна ФБФаза *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 у нативному стані має молекулярну масу  $(230\ 000 \pm 5\ 000)$  Да, а в денатурованому —  $56\ 600$  Да, тобто фермент у нативному стані складається з чотирьох однакових субодиниць.

У результаті вивчення серологічних властивостей ФБФаз *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *B. subtilis* 668 у порівняльному аспекті встановлено, що у кожного з цих організмів внутрішньоклітинний і позаклітинний ферменти представлені однаковими молекулами, що складаються з двох антигенів, один з яких є спільним для обох мікроорганізмів, а інший має часткову ідентичність, бо реагує з антитілами в гетерологічних системах з утворенням лінії преципітації у вигляді “шпори” (рис. 4). Даний факт вказує на те, що в антисироватках до цих ферментів наявні антитіла як до загальних (спільних) детермінант антигенів, що порівнюються (у даному випадку — ФБФази), так і до детермінанти, відсутньої в одного з них. На підставі одержаних результатів ми робимо висновок, що ФБФаза *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 подібна в серологічному відношенні до однойменного ферменту *B. subtilis* 668, але не ідентична йому.

Отже, на фенотипічному рівні при вивченні ФБФаз *B. subtilis* 668 і *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118, як і при вивченні 16S рРНК цієї бактерії та молекула *A. laidlawii* [15], доведено, що *B. subtilis* є вірогідним предком *A. laidlawii*, а ФБФаза останньої є еволюційно дещо зміненим нащадком ФБФази *B. subtilis* у серологічному відношенні. Проте, крім серологічної спорідненості обох ФБФаз, у них є інші спільні характеристики: це надзвичайно стійкі до протеолізу глікополімери, які здатні виходити в позаклітинний простір і функціонувати там без контролю з боку клітинних систем материнських мікроорганізмів.

Таким чином, у результаті проведених досліджень вперше визначено молекулярну масу позаклітинної ФБФази збудника “жовтяниць” рослин *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 у нативному і денатурованому станах, встановлено субодиничний склад досліджуваного ферменту, а також показано подібність, але не ідентичність позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 з однойменним ферментом *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118.

1. Bishop R. Regulatory characteristics of a fructose-1,6-bisphosphatase from the blue-green bacterium *Anacystis nidulans* // Arch. Biochem. and Biophys. – 1979. – **196**, No 1. – P. 295–300.
2. Francois J., Van Schaftingen E., Hers H.-G. On the mechanism of inhibition of neutral liver fructose-1,6-bisphosphatase by fructose-2,6-bisphosphate // Eur. J. Biochem. – 1983. – **134**, No 3. – P. 269–273.

3. Fujita Y., Yoshida R.-I., Miwa Y. et al. Identification and expression of the *Bacillus subtilis* fructose-1,6-bisphosphatase gene (fbp) // J. Bacteriol. – 1998. – **180**, No 16. – P. 4309–4313.
4. Giroux E., Williams M. K., Kantrowitz E. R. Shared active sites of fructose-1,6-bisphosphatase // J. Biol. Chem. – 1994. – **269**, No 50. – P. 31404–31409.
5. Babul J., Guixe V. Fructose bisphosphatase from *Escherichia coli*. Purification and characterization // Arch. Biochem. and Biophys. – 1983. – **225**, No 2. – P. 944–949.
6. Weisburg W. G., Tully J. G., Rose D. L. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification // J. Bacteriol. – 1989. – **171**. – P. 6455–6467.
7. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. – 1984. – **46**, № 2. – С. 71–75.
8. Лурье Ю. Ю. Метод Фиске–Суббароу // Унифицированные методы анализа вод. – Москва: Химия, 1985. – С. 206–208.
9. Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. – 1925. – **66**, No 2. – P. 375–400.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **71**, No 2. – P. 248–254.
11. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis // Progr. in Allergy. – 1958. – **5**. – P. 1–78.
12. Rosen O. M., Rosen S. M., Horecker B. L. Fructose-1,6-diphosphatase *Candida utilis* // Methods in enzymology. Carbohydrate metabolism. – London; New York: Acad. Press, 1966. – P. 632–636.
13. Opheim D. J., Bernlohr B. C. Purification and regulation of fructose-1,6-bisphosphatase from *Bacillus licheniformis* // J. Biol. Chem. – 1975. – **250**, No 8. – P. 3024–3033.
14. Pontremoli S., Horecker B. L. Fructose-1,6-diphosphatases // Enzymes. – 1971. – **4**, No 4. – P. 611–646.
15. Woese C. R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. – 1987. – **51**. – P. 221–271.

Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшло до редакції 12.08.2009

**I. P. Tokovenko, L. P. Malinovska,**

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **I. G. Skripal'**

### **Extracellular fructosobisphosphatase of the agent of pale-green dwarfness of cereals: molecular-biological and serological properties**

*Molecular-biological and serological properties of the extracellular fructosobisphosphatase of *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* strain 118 – pale-green dwarfness of cereals are investigated. Using substrate-specific chromatography, the highly purified protein was obtained (176.4-fold purification). The molecular weight of the both native and denaturated FBFases are found to be 230000 Da and 56600 Da, respectively, which clearly indicates that the enzyme consists of 4 identical subunits (56600 Da each). It is shown that extracellular FBFase of *Bacillus subtilis* 668 is rather similar than identical, in the serological aspect, to the enzyme *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* st. 118 of the same name.*