



УДК 577.154.072

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРАМИНИДАЗЫ,
ПРОДУЦИРУЕМОЙ НЕАГГЛЮТИНИРУЮЩИМСЯ ВИБРИОНОМ

*Вертнев Ю. В., Езепчук Ю. В., Абрашев И. Р.,
Хорлин А. Я., Краснова И. Н.*

*Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи
Академии медицинских наук СССР*

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шеллякина
Академии наук СССР, Москва*

Описан метод выделения нейраминидазы из культурального фильтрата неvirulentной культуры неагглютинирующего вибриона (НАГ-вибриона). Этапы выделения воспроизводимы и позволяют обработать быстро большое количество материала с выходом фермента в среднем 40%. Полученные препараты нейраминидазы по основным характеристикам (оптимум рН, K_m) не отличаются от нейраминидазы, продуцируемой virulentными штаммами.

Нейраминидаза (мукополисахарид N-ацетилнейраминилгидролаза КФ 3, 2.1.18) была обнаружена [1, 2] в культуральных фильтрах холерного вибриона еще в 1947 г. и с тех пор является объектом пристального внимания исследователей. Это связано с тем, что нейраминидаза является важным инструментом в изучении химии гликопротеинов, гликолипидов и олигосахаридов [3], в терапии некоторых злокачественных опухолей [4—6], а также играет значительную роль в инфекционном процессе как фактор патогенности возбудителя [7—12].

Метод выделения нейраминидазы холерных вибрионов в достаточно очищенном виде разработан Эйдой и соавт. [13], Шраммом и Мором [14]. Он включает в качестве основного этапа адсорбцию фермента на эритроцитах человека и последующую элюцию. Однако, по мнению авторов, метод не всегда позволяет получать воспроизводимые результаты в основном за счет трудности стандартизации эритроцитов, что в свою очередь зависит от их физиологического состояния.

В настоящее время многие исследователи используют в своих работах коммерческие препараты нейраминидазы. В то же время установлено, что эти препараты содержат примеси [15], не позволяющие использовать фермент для биологических, а тем более для химических исследований. И если уже предложен достаточно простой метод для очистки таких препаратов от примесей протеиназ [16], то для удаления сопутствующих O-гликозидгидролаз необходима разработка специальных приемов в каждом конкретном случае. Этим, по-видимому, и объясняется, что такие характеристики, как величина молекулярного веса, наличие или отсутствие четвертичной структуры у этого фермента еще окончательно не установлены [17].

Особое неудобство для производства фермента связано с тем, что в качестве его продуцента используется virulentный штамм *Vibrio cholerae*.

Очистка нейраминидазы холерного вибриона

Этапы очистки	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная активность, ед/мг белка	Общая активность, ед.	Выход по активности, %	Степень очистки по белку
Культуральный фильтрат	10 000			450 000	100	
Высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100% насыщения)	500	48,7	20,05	500 000	111,1	1
Хроматография на DE-32	750	2,06	267,7	415 000	92,2	13,6
Высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50% насыщения)	50	4,4	1727,7	380 000	84,4	84,2
Хроматография на CM-32	30	0,5	13 333,3	200 000	44,4	650,4
Ультрафильтрация через PM-10	5	2,8	13 571,4	190 000	42,2	662,0

Мы поставили перед собой следующие задачи: исследовать возможность использования в качестве продуцента нейраминидазы неvirulentный штамм НАГ-вибрионов, разработать метод выделения высокоочищенных препаратов фермента и изучить его основные свойства.

С целью выбора штамма-продуцента нами было изучено 203 штамма НАГ-вибрионов, из которых наибольшей нейраминидазной активностью обладал штамм, условно обозначенный нами 4616 п. Культивирование штамма в стационарных условиях без дополнительной аэрации позволяет получить достаточно высокий выход фермента, в среднем 50 000 ед. с 1 л культурального фильтрата, что незначительно отличается от уже изученных virulentных штаммов этого микроба [13, 14, 18].

Разработанный метод включает четыре этапа: высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, проведение ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, повторное высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и последующая ионообменная хроматография на CM-целлюлозе. Результаты всех этапов очистки представлены в табл. 1. На стадии высаливания препарата $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ достигается концентрация исходного материала в среднем в 20 раз, а удаление балластных азотистых компонентов составляет 85%. Очистка фермента происходит в 6—7 раз с повышением суммарной нейраминидазной активности на 10—30% по отношению к активности исходной культуральной жидкости.

Согласно данным Эйда и соавт. [13], наибольшая потеря активности нейраминидазы наблюдалась при высаливании нейраминидазы $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 50% насыщения. Однако в наших опытах прием высаливания полностью оправдал себя, особенно при использовании его на первом этапе. Можно предположить, что увеличение выхода фермента по активности на этой стадии в наших опытах связано с частичным, а возможным, и с полным удалением альдозазы нейраминовой кислоты (N-ацетилнейраминатлиазы, КФ 4.1.3.3), которая присутствует в культуральной жидкости [7] и расщепляет свободные сиаловые кислоты до N-ацетилманнозамина и пирувата и тем самым занижает результаты определения истинной нейраминидазной активности в культуральной жидкости. Другим объяснением может служить предположение о стабилизации белковых молекул фермента в более концентрированных растворах. С последним обстоятельством, по-видимому, связан феномен спонтанного увеличения активности в 1,5—2 раза, которое иногда наблюдается при хранении препаратов, полученных после высаливания.

Наиболее существенным этапом очистки является хроматография фермента на DEAE-целлюлозе. При этом достигается очистка препарата в 30 раз по отношению к исходному этапу. Удельная активность выделенного препарата составляет 250—300 ед/мг белка.

Следует отметить, что на этапе ионообменной хроматографии полученные препараты инактивируются при лиофилизации и плохо хранятся в

разбавленном состоянии. Это, возможно, связано со значительным удалением компонентов среды, стабилизирующих фермент, как это описано для галактозидазы *E. coli* [19].

Для концентрации получаемых препаратов нами был использован метод высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при pH 5,0 (насыщение 50%). Как показывают опыты, помимо концентрации при проведении этой процедуры наблюдается также значительная очистка (см. табл. 1).

На последующем этапе в результате проведения хроматографии на СМ-целлюлозе удается очистить фермент по крайней мере в 2000—2500 раз



Рис. 1

Рис. 1. Диск-электрофорез очищенной нейраминидазы холерного вибриона

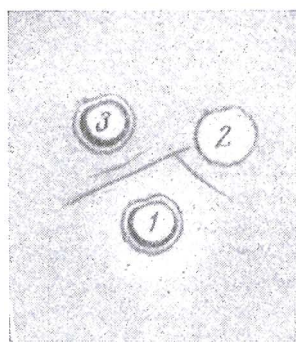


Рис. 2

Рис. 2. Двойная диффузия в геле препаратов нейраминидазы после хроматографии на DEAE-целлюлозе (3) и СМ-целлюлозе (2), 1 — антисыворотка

по отношению к исходному материалу. При этом выход нейраминидазы по активности составляет в среднем 40%.

Анализ выделенного препарата методами диск-электрофореза в полвакриламидном геле (рис. 1) и двойной диффузии в геле (рис. 2) показывает, что он содержит один компонент.

Ультрафильтрация через фильтр РМ-10 показала, что этот прием достаточно удобен для концентрирования препаратов нейраминидазы на последнем этапе выделения и свидетельствует, что молекулярный вес фермента выше 45 000. Значительной очистки при этом не происходит.

В целом предлагаемый метод позволяет быстро обработать большое количество материала и выделить достаточно очищенные препараты нейраминидазы со значительным выходом по активности (40—45%). Поскольку мы впервые использовали в качестве источника нейраминидазы неvirulentный штамм холерного вибриона, было необходимо изучить свойства выделенного фермента в сравнении с нейраминидазой из вирулентных штаммов.

Исследование оптимума pH нейраминидазы ПАГ-вибриона показало, что максимальная активность фермента при использовании в качестве суб-

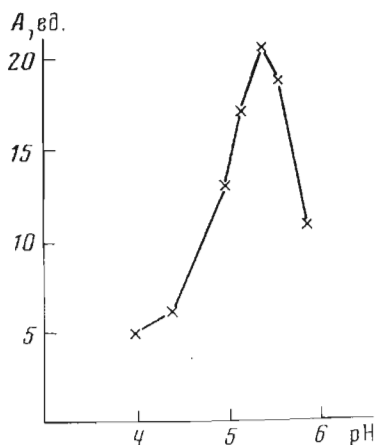


Рис. 3

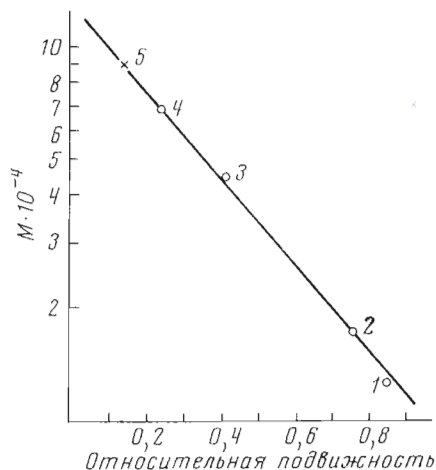


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость активности (A) нейраминидазы холерного вибриона от рН

Рис. 4. Определение молекулярного веса нейраминидазы (5) методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Белки-маркеры: цитохром с — 1, миоглобин — 2, бычий альбумин — 4, нейраминидаза — 5

стра та гликопротеинов лошадиной сыворотки наблюдалась при рН 5,4 (рис. 3).

Константа Михаэлиса K_m нейраминидазы по отношению к N-ацетилнейраминзиллактозе составляла $1,5 \cdot 10^{-3}$ M.

Величины оптимума рН и K_m , которыми характеризуется выделенный нами фермент, практически не отличаются от тех, которые получены для нейраминидазы вирулентных штаммов [13, 20].

Опыты по испытанию влияния двухвалентных катионов и некоторых детергентов (табл. 2) показали, что нейраминидаза активируется ионами Ca^{2+} , Ba^{2+} и Co^{2+} соответственно на 60, 50 и 40%, а ионами Mn^{2+} и Mg^{2+} — в среднем на 10%. Из испытанных солей только ионы Fe^{2+} ингибировали ферментативную активность на 55%. Ингибирующий эффект наблюдался также в присутствии ЭДТА. Из испытанных детергентов только додецилсульфат натрия оказывал незначительный ингибирующий эффект. Следует отметить, что в некоторых сериях опытов при использовании детергентов наблюдалось увеличение активности в 1,5—2 раза, однако ни в одном случае не наблюдалось подавления активности.

Известно, что нейраминидаза холерного вибриона аналогично полученному нами ферменту активируется ионами Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} и ингибируется ионами Fe^{2+} [18]. В отношении эффекта активации нейраминидазы ионами Ba^{2+} изучаемый нами фермент похож на нейраминидазу дифтерийного микроба [21].

Таким образом, выделенный нами фермент практически не отличается от коммерческих препаратов, полученных с использованием вирулентных штаммов *V. cholerae*.

Опыты по определению молекулярного веса нейраминидазы показывают, что при проведении диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия фермент мигрирует медленнее бычьего альбумина. Расчет по электрофоретической подвижности показывает, что молекулярный вес нейраминидазы равен 90 000 (рис. 4). Аналогичный результат (94 000) был получен также методом гель-фильтрации через сефадекс G-150.

Следует сказать, что данные о молекулярном весе нейраминидазы, полученные разными исследователями, колеблются от 10 000 и меньше [14, 18] до 67 000 и 90 000 [22, 23]. В наших опытах при определении молеку-

Влияние солей, детергентов и ЭДТА на активность нейраминидазы

Испытуемый реагент	Нейраминидазная активность		Испытуемый реагент	Нейраминидазная активность	
	ед.	%		ед.	%
Контроль	41,2	100	FeSO ₄ *	5	44,6
CaCl ₂ *	18,0	160,7	ЭДТА*	3	26,8
BaCl ₂ *	17,0	151,7	Додецилсульфат натрия**	10	89,3
MnCl ₂ *	12,3	109,8	Тритон X-100**	11,0	98,21
MgCl ₂ *	12,3	109,8	Твин 80**	11,2	100
CoSO ₄ *	15,5	138,4			

* Концентрация 10 мМ.

** Концентрация 1%.

лярного веса методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в некоторых случаях наблюдались два дополнительные минорные компонента, обладающие нейраминидазной активностью с *M* 52 000 и 58 000. Не исключено, что подобные различия в молекулярном весе связаны с неидентичностью штаммов-продуцентов фермента, с одной стороны, и с условиями культивирования и хранения выделенных препаратов — с другой. Феномен появления более низкомолекулярных форм фермента в зависимости от времени культивирования для нейраминидазы *Pasteurella multocida*, а также случаи частичной деградации ферментов при хранении под действием примесей протеаз описаны в работах [23—25].

Экспериментальная часть

В качестве продуцента нейраминидазы был использован штамм НАГ-вибрионов, выделенный от больного энтеритом и условно обозначенный нами как 4616 *n*. Морфология штамма типичная: обладает активной подвижностью, образует оксидазу, декарбоксилирует лизин и орнитин, не разлагает аргинин, относится к I группе Хейберга (разлагает до кислоты сахарозу и маннозу, не разлагает арабинозу); разлагает крахмал, дает положительную нитрозоиндоловую реакцию, не гемолизует эритроциты барана, не агглютинируется холерными O- и RO-сыворотками даже после кипячения в течение 2 ч; не лизируется холерными фагами. Агглютинируется до титра 1 : 1600 специфической O-сывороткой серотипа 2.

Для выделения и очистки фермента штамм выращивали в 3-литровых бутылках, содержащих 2,5 л бульона Хоттингера (рН 7,5). Среду заражали 18-часовой культурой штамма, выросшего на той же среде, из расчета 4 мл/л среды и культивировали при 37° в стационарных условиях без дополнительной аэрации в течение 36 ч.

Для получения антинейраминидазной сыворотки использовали материал первого пика после гель-фильтрации через сефадекс G-75 ферментного препарата после 2-го этапа очистки (см. таблицу 1), которым иммунизировали кроликов по следующей схеме [26]: в подушечки лапок кроликов вводили 0,2 мл препарата с адьювантом Фрейнда (общее количество белка — 2 мг); через два месяца вводили по 2 мг белка каждый день внутримышечно, подкожно и внутривенно: через 7 сут последнюю процедуру повторяли и брали кровь через 7—10 сут после последней инъекции.

В качестве субстратов были использованы N-ацетилнейраминозиллактоза («Sigma», тип II) и гликопротеины лошадиной сыворотки [27]. Последний субстрат использовали с таким расчетом, чтобы в пробе содержалось в среднем 0,5 мкмоль связанных сиаловых кислот.

Инкубационная смесь содержала 0,2 мл субстрата (0,5 мкмоль связанных сиаловых кислот) в 0,2 М ацетатном буфере, рН 5,5; 0,2 мл того же

буфера, содержащего 10^{-3} М CaCl_2 ; 0,1 мл фермента (15—25 ед). Время инкубации составляло 15 мин при 37° . За ходом реакции наблюдали по количеству отщепляющейся N-ацетилнейраминовой кислоты (Ac Neu), концентрацию которой определяли тиобарбитуровым методом [28].

За единицу активности принимали такое количество фермента, которое отщепляет 1 мкг Ac Neu за 15 мин в стандартных условиях.

K_m определяли по методу Лайпуивера — Берка с N-ацетилнейраминозиллактозой в качестве субстрата.

При выделении фермента в препаратах определяли белок [29] и азот с реактивом Несслера [30]. Анализ выделенных препаратов нейраминидазы проводили методами двойной диффузии в геле [31] и диск-электрофореза в полиакриламидном геле [32].

Молекулярный вес нейраминидазы определяли методами диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [33] и гель-фильтрации [34] через ссфадекс G-150. В качестве свидетелей были использованы бычий сывороточный альбумин, яичный альбумин, миоглобин и цитохром с с молекулярным весом соответственно 68 000, 45 000, 18 700 и 12 400 («Merc», ФРГ).

В качестве исходного материала для выделения нейраминидазы использовали культуральную жидкость 36-часовой культуры вибриона. Микробную массу осаждали добавлением CaCl_2 до конечной концентрации 0,5% при pH 6,0 и оставляли на 18 ч при 4° . Надосадочную прозрачную жидкость декантировали. Осадок в объеме 1 л от 10 л культуральной жидкости центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин для полного осаждения микробов и надосадочную жидкость соединяли с декантированной жидкостью.

Для концентрации и первичной очистки нейраминидазы применяли метод высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 100% насыщения (500 г/л). Через 18 ч материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяли в минимальном объеме физиологического раствора и диализовали против проточной воды до полного исчезновения ионов SO_4^{2-} и затем в течение 24 ч при 4° против 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,5).

К полученному материалу в объеме 500 мл добавляли 500 г (влажный вес) DEAE-целлюлозы («Whatman», Англия), уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,5), и оставляли при постоянном перемешивании на 2 ч при 4° . Затем целлюлозу переносили на бюхнеровскую воронку и промывали 2 л 0,01 М фосфатного буфера (pH 7,5) для удаления несорбированных белков. Отфильтрованную целлюлозу смешивали с 500 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,5) и после перемешивания в течение 1 ч смесь фильтровали; процедуру повторяли еще раз. Фильтраты собирали, насыщали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 50% насыщения при pH 5,0 и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Осадок растворяли в минимальном объеме физиологического раствора и диализовали до полного исчезновения ионов SO_4^{2+} .

К полученному материалу добавляли 30 г (влажный вес) CM-целлюлозы (CM-32, «Whatman», Англия) и оставляли при перемешивании на 1 ч. После промывания 500 мл 0,01 М ацетатного буфера (pH 5,5) элюцию проводили 0,6 М NaCl в том же буфере. Концентрацию фермента проводили ультрафильтрацией через фильтр PM-10 («Amicon», Голландия).

ЛИТЕРАТУРА

1. Burnet F. M., McCrea J. F., Stone J. D. (1946) Brit. J. Exp. Pathol., 27, 228—238.
2. Burnet F. M., Stone J. D. (1947) Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci., 25, 227—233.
3. Gottschalk A., Drzeniek R. (1972) in Glycoproteins, their Composition, Structure and Function, 2nd edition (ed. A. Gottschalk), Elsevier, Amsterdam — London — New York, Part A, 381—402.
4. Currie G. A., Bashaw K. D. (1969) Brit. J. Cancer, XXIII, 141—149.
5. Simmons R. D., Rios A. (1972) Surgery, 4, 556—564.

6. Sanford B. H. (1974) Behring Inst. Mitt., 55, 306—309.
7. Gottschalk A. (1960) The chemistry and biology of sialic acids and related substances, Cambridge University Press, London.
8. Gottschalk A., Bhargava A. S. (1971) in The Enzymes (Paul D. Boyer ed.), vol. 5, 321—342, Academic Press, New York—London.
9. Müller H. E. (1970) Z. Immun. Forsch., 140, 417—423.
10. Езенчук Ю. В., Вертнев Ю. В., Костюкова Н. Н. (1972) Бюлл. эксперим. биол. мед., 2, 63—65.
11. Вертнев Ю. В., Езенчук Ю. В. (1973) Вестн. Акад. мед. наук СССР, 12, 56—61.
12. Kelly R., Greiff D. (1970) Infect. Immun., 2, 115—117.
13. Ada G. L., French E. L. (1961) J. Gen. Microbiol., 24, 409—421.
14. Schramm G., Mohr E. (1960) Z. Naturforsch., 15b, 568—547.
15. Kraemer P. M. (1968) Biochim. et biophys. acta, 167, 205—208.
16. Hatton M. W. S., Regoezi E. (1973) Biochim. et biophys. acta, 327, 114—120.
17. Laver W. G., Pye J., Ada G. L. (1964) Biochim. and biophys. acta, 81, 177—180.
18. Rosenberg A., Binnie B., Chargaff E. (1960) J. Amer. Chem. Soc., 82, 4113—4114.
19. Pye J., Curtain C. C. (1962) J. Gen. Microbiol., 24, 423—425.
20. Contaxis C. C., Reithe F. J. (1974) Arch. Biochem. and Biophys., 160, 588—594.
21. Jagielski M. (1969) Exp. Med. Microbiol., XXI, 97—110.
22. Drzeniek R. (1972) in Current Topics in Microbiology and Immunology, 59, 35—74, Springer-Verlag, Heidelberg.
23. Müller H. E. (1971) Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. A. 217, 326—344.
24. Diezel W., Nissler K., Heilmann W., Kopperschlager G., Hoffmann E. (1972) FEBS Lett., 27, 195—197.
25. Traniello S., Melloni E., Pontremolis S., Sia C. L., Horecker B. L. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 149, 222—234.
26. Avrameas S., Ternynck T. R. (1969) Immunochemistry, 6, 53—66.
27. Vertiev Yu. V., Ezepchuk Yu. V. (1972) Folia Microbiol., 17, 269—273.
28. Warren L. (1959) J. Biol. Chem., 234, 1971—1975.
29. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265—275.
30. Гриценко В. Д. (1962) Лабор. дело, 1, 36—38.
31. Cuchterlony O. (1950) Acta med. scand., 438, 76—84.
32. Davis B. D. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427.
33. Weber K., Osborn M. (1969) J. Biol. Chem., 224, 4406—4412.
34. Дегерманн Г. (1970) Гель-хроматография, М., 158—178.

Поступила в редакцию
19.III.1975

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEURAMINIDASE PRODUCED BY NAG-VIBRIO

VERTIEV Yu. V., EZEPCHEK Yu. V., ABRASHEV I. R., KHORLIN A. Ya.,
KRASNOVA I. N.

*N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology
and Microbiology, Academy of Medical Sciences of the USSR
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

It was shown that non-virulent culture of non-agglutinable vibrio may be used for the production of the neuraminidase. A method was elaborated for the purification of neuraminidase which involves four steps: saturation with ammonium sulphate (100%) absorption-elution on DEAE-cellulose, saturation with ammonium sulphate (50%) and absorption-elution on CM-cellulose. The degree of purification was 660-fold and the neuraminidase preparation was found to be homogeneous by antigenic properties and disc-electrophoresis in polyacrylamide gel. pII-Optimum is 5.4. With N-acetylneuraminosyl-lactose as substrate, a value $1.5 \times 10^{-3}M$ was obtained for the Michaelis constant. The molecular weight of neuraminidase was determined by sodium dodecyl sulphate disc-electrophoresis in polyacrylamide gel and gel filtration as 90 000 and 94 000, respectively.