



УДК 577.152.31\*302.088.5

## НУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens*. I. СРАВНЕНИЕ ПРИРОДНОЙ И РЕКОМБИНАНТНОЙ НУКЛЕАЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭЛЕКТРОСПРЕЙ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 1995 г. Ю. Педерсен, Ж. Андерсен\*, П. Роепсторф\*,  
М. Н. Филимонова\*\*, К. Бидерман

Кафедра биотехнологии Датского технического университета, г. Лингби

\* Кафедра молекулярной биологии Университета г. Оденсе

\*\* Кафедра микробиологии Казанского государственного университета

Поступила в редакцию 26.05.94 г. После доработки 26.08.94 г.

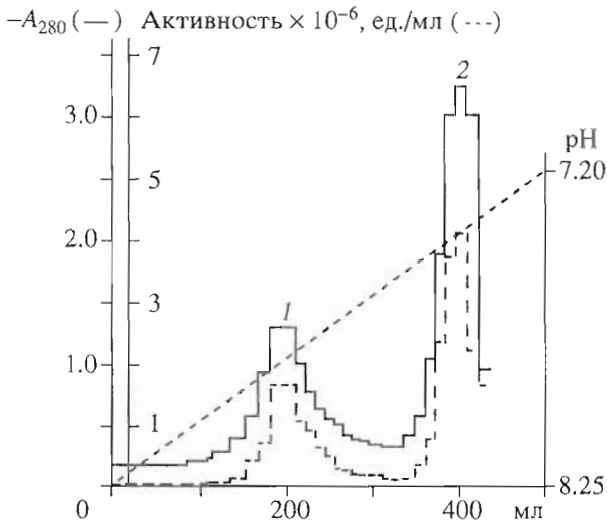
Охарактеризованы по молекулярной массе, определенной электроспрей-масс-спектрометрией, изоформы природной и рекомбинантной нуклеаз *Serratia marcescens*. Природную нуклеазу выделяли из культуральной жидкости бактерии *S. marcescens* В10М1, рекомбинантную получали в результате культивирования клеток *Escherichia coli* МТ102, несущих плазмиду р403-SD2 с геном нуклеазы *nuc*. Первичная структура каждой из изоформ, выделенных из препаратов нуклеаз, была установлена путем сопоставления их молекулярных масс с известной аминокислотной последовательностью, являющейся производной от нуклеотидной последовательности гена *nuc*. Установлено, что оба препарата включали одинаковые варианты нуклеазы с отщеплениями в области N-конца. Однако количество изоформ в природной нуклеазе было значительно больше, чем в рекомбинантной. Структура некоторых изоформ была подтверждена N-концевым анализом.

*Ключевые слова:* нуклеаза; изоформы фермента; электроспрей-масс-спектрометрия; молекулярная масса; *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*.

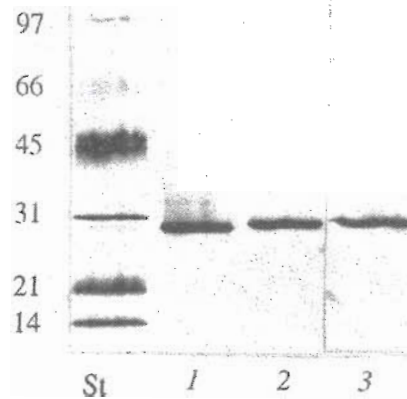
Внеклеточная нуклеаза *Serratia marcescens* (эндонуклеаза, КФ 3.1.30.2), ранее классифицированная как дезоксирибонуклеат (рибонуклеат)-5'-нуклеотидогидролаза [1], секретируется в окружающую среду как природными, так и рекомбинантными штаммами бактерии [1 - 4]. Фермент также может быть синтезирован клетками *E. coli* в случае клонирования и экспрессии в них структурного гена нуклеазы *S. marcescens* [5, 6]. Показано, что и природная, и рекомбинантная нуклеазы представлены несколькими изоформами, различающимися изоэлектрическими точками [7 - 9]. Две изоформы – *Sml* (pI 7.4) и *Sm2* (pI 6.8) – были выделены из культуральной жидкости *S. marcescens* В10М1 и частично охарактеризованы [8, 9]. Установлено высокое сходство их структур и различие в области N-конца. Изоформа, близкая по изоэлектрической точке (pI 6.9) к *Sm2*, также обнаружена как доминирующий компонент в препарате рекомбинантной нуклеазы. Подробно изучены ее свойства [5]. Кроме того, выявлено большое количество вариантов рекомбинантной нуклеазы с pI от 4.5 до 8.0 [7]. Однако сравнительный анализ изоформ природной и рекомбинантной нуклеаз до сих пор никем не проводился, поскольку все попытки выделить и охарактеризовать некоторые варианты рекомбинантной

нуклеазы оказывались безуспешными из-за малых количеств вещества. В связи с этим метод электроспрей-масс-спектрометрии (ЭСМС), позволяющий быстро проводить анализ масс пикомольных количеств белков с точностью до 0.01% при молекулярной массе ( $M_r$ ), не превышающей 150000 [10], представлялся весьма перспективным для подобного исследования. С одной стороны, он позволял быстро и точно охарактеризовать изоформы нуклеаз по молекулярным массам, с другой – провести сравнительный анализ по молекулярным массам изоформ природного и рекомбинантного белков. Результаты, полученные при решении этих задач, описаны ниже.

Прежде всего препараты природной и рекомбинантной нуклеаз, полученные ионообменной хроматографией на DEAE- и фосфоцеллюлозе Р-11 [11], подвергали первичному разделению на изоформы анионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-52 (Whatman) [9]. В результате каждый из препаратов нуклеаз был разделен на две большие фракции. В природной нуклеазе обе фракции содержались примерно в равных количествах и были элюированы в отдельных хорошо разделившихся пиках, представленных на хроматограмме (рис. 1). В рекомбинантной нуклеазе одна из фракций была основной и



**Рис. 1.** Хроматография природной нуклеазы на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой DE-52 (Whatman). Элюция проводилась в градиенте рН (8.25 - 7.20) 50 мМ три-НСI-буфера со скоростью 45 мл/ч.



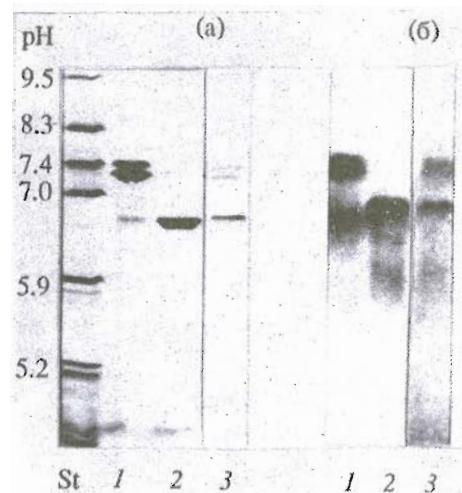
**Рис. 2.** SDS-ПААГ-электрофорез фракций нуклеаз, выделенных хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе. St – маркеры молекулярных масс (приведены *M*, кДа). 1, 2 – образцы природной нуклеазы, соответствующие пикам 1 и 2 хроматограммы (рис. 1); 3 – образец минорной фракции рекомбинантной нуклеазы, выделенной на месте ожидаемого пика 1.

элюировалась единым мощным пиком, позиция которого совпадала с положением пика 2 на хроматограмме нативной нуклеазы, другая составляла незначительную часть препарата и проявлялась лишь слабой нуклеазной активностью в области рН, соответствующей элюции пика 1 (рисунок не приводится).

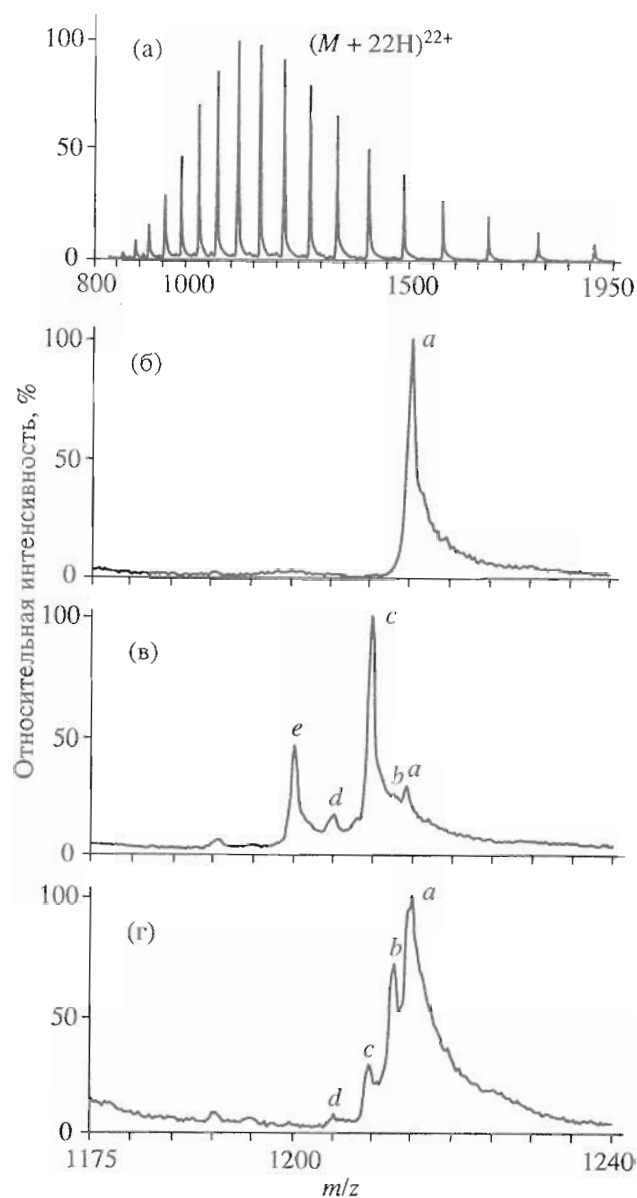
SDS-ПААГ-электрофорез показал гомогенность каждой из фракций по молекулярной массе белкового компонента. Так, все белковые составляющие каждой из фракций локализовались в одной четко очерченной полосе, позиция которой соответствовала относительной молекулярной массе около 30000 (рис. 2). Однако небольшие различия в относительной подвижности белков свидетельствовали о разнице в молекулярных массах белковых компонентов, входящих в состав различных фракций.

Изоэлектрофокусирование в комбинации с анализом энзимограмм подтвердило гомогенность фракции природной нуклеазы (рис. 3а, б, колонка 2), выделившейся в пике 2, и основной фракции рекомбинантного фермента (рисунок не показан). Обе фракции содержали единственный белковый компонент, характеризующийся изоэлектрической точкой 6.8. Ранее подобная изоэлектрическая точка была определена для изоформы *Sm2* природной нуклеазы [9], а также для рекомбинантной формы фермента, представляющей собой зрелый белок [5], т.е. белок, полностью соответствующий по первичной структуре нуклеотидной последовательности структурного гена нуклеазы [2]. Таким образом, становилось очевидно, что все четыре нуклеазы (изоформа *Sm2* природной нуклеазы [9], “зрелая” форма рекомбинантной нуклеазы [5], основная фракция

рекомбинантной нуклеазы и одна из двух фракций природной нуклеазы, выделенные при проведении данного исследования) представляли собой один и тот же белок с *pI* 6.8 и молекулярной массой 26705.8. Данный вывод был подтвержден результатами электроспрей-масс-спектрометрического анализа, показавшего идентичность полносканового и подсканового спектров двух сравниваемых компонентов рекомбинантной (рисунок не приводится) и природной нуклеазы (рис. 4а, б) и позволившего рассчитать массы этих компонентов (*pI* 6.8) с точностью до 0.0015%. Полноскановый спектр (рис. 4а) состоял из единственной серии



**Рис. 3.** Изоэлектрофокусирование (а) и энзимограммы (б) фракций нуклеаз, выделенных хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе. St – *pI*-маркерные белки; 1 - 3 – см. рис. 2.



**Рис. 4.** Электроспрей-масс-спектры изоформ природной и рекомбинантной нуклеазы: а – полноскановый масс-спектр компонента природной нуклеазы, выделенного во фракции из пика 2 (рис. 1); б – г – подскановые масс-спектры высокомолекулярных ионов  $(M + 22H)^{22+}$ : б – компонент природной нуклеазы, выделенный из фракции пика 2 (рис. 1); в – фракция природной нуклеазы, выделенная в пике 1 (рис. 1); г – минорная фракция рекомбинантной нуклеазы. Пики: а – “зрелая” форма нуклеазы; б – вариант нуклеазы с  $M_r$  на 42 а. е. м. меньше, чем молекулярная масса “зрелого” белка; с – е – изоформы с недостающими одним, двумя, тремя N-концевыми аминокислотными остатками. Показанные спектры являются средними из 30 сканирований.

многозарядных ионов с зарядом от 14+ до 31+. Подскановый профиль иона с зарядом 22+ при массовом числе ( $m/z$ ) 1175 - 1240 (рис. 4б) содержал один пик (а). Молекулярная масса нуклеаз с  $pI$  6.8 составляла 26706.2 - 26708.2 Да.

Две другие фракции, минорная (рекомбинантной нуклеазы) и выделенная в пике 1 (природной нуклеазы), оказались гетерогенными. Изоэлектрофокусирование вместе с анализом энзимграмм показало, что минорная фракция рекомбинантной нуклеазы (рис. 3а, б, колонка 3) и фракция из пика 1 природного фермента (рис. 3а, б, колонка 1) включали в себя три компонента, характеризующиеся изоэлектрическими точками 6.8, 7.3 и 7.4. Интересно, что во фракции природного фермента компоненты с  $pI$  7.3 и 7.4 были главными, а компонент с  $pI$  6.8 – дополнительным к ним. Напротив, в минорной фракции рекомбинантной нуклеазы главным был компонент с  $pI$  6.8, а компоненты с  $pI$  7.4 и 7.3 – дополнительными к нему. Аналогичная картина была выявлена для обеих изучаемых фракций методом электроспрей-масс-спектрометрии. Полноскановые спектры обеих изучаемых фракций содержали несколько серий пиков, что свидетельствовало о гетерогенности препаратов. Подскановые профили высокомолекулярных ионов с зарядом 22+, выявили пять компонентов (а - е) в случае природной нуклеазы (рис. 4в) и четыре компонента (а - д) при исследовании минорной фракции рекомбинантного фермента (рис. 4г), причем в первом случае главными были компоненты с, е, тогда как во втором – компонент а, соответствующий “зрелой” форме нуклеазы с  $pI$  6.8.

Молекулярные массы компонентов а - е, выявленные с помощью ЭСМС (таблица), позволили предположить, что компоненты с, d и е – N-концевые варианты “зрелой” формы нуклеазы, образованные за счет отщепления N-концевых аминокислотных остатков Asp, Asp-Thr и Asp-Thr-Leu соответственно. Определение N-концевой аминокислотной последовательности некоторых из компонентов подтвердило это предположение. Показано, что один из преобладающих компонентов (вариант с) начинался с Thr, соответствующего аминокислоте в позиции 2, другой (вариант е) – с Glu, соответствующего позиции 4. Таким образом, компонент е соответствовал изоформе Sml природной нуклеазы, ранее частично охарактеризованной [9]. Компоненты с и d ранее не характеризовались. Два минорных компонента (b и d) не могли быть охарактеризованы по N-концевой аминокислотной последовательности из-за их малого количества. Заключение об отсутствии в компоненте d двух N-концевых аминокислотных остатков сделано на основании данных о молекулярной массе данного компонента, определенной ЭСМС. Компонент b с молекулярной массой примерно на 42 а. е. м. меньше, чем у “зрелого” белка нуклеазы (компонент а), далее не идентифицировался. Отличие по массе могло быть вызвано мутацией в структурном гене белка, приводящей к ошибке в трансляции гена и, как следствие, к замене одного аминокислотного

остатка типа Leu/Asp/Asp на Ala, вызывающей изменение в молекулярной массе на 42/44/43 а. е. м. соответственно.

Образование изоформ нуклеазы не ограничивается двумя штаммами бактерий, использованными в настоящем исследовании. Изоэлектрофокусирование лизатов целых клеток (рис. 5) и культуральных жидкостей (рисунок не показан), полученных в результате культивирования клеток штаммов *E. coli* и *S. marcescens*, несущих ген *nuc*, показало, что как внутри, так и вне бактериальных клеток содержатся те же изоформы нуклеазы, что и варианты фермента, охарактеризованные в настоящей работе.

Таким образом, с помощью электроспрей-масс-спектрометрии охарактеризованы изоформы природной и рекомбинантной нуклеаз. Сравнительный анализ природной и рекомбинантной нуклеаз, проведенный с использованием электрофоретических и масс-спектрометрического метода исследования, показал полную идентичность изоформ природного и рекомбинантного ферментов. Выявлены новые варианты белка, отличающиеся от известных изоформ *Sm1* и *Sm2* отсутствием одного и двух N-концевых аминокислотных остатков. Причиной множественности изоформ, как было установлено, является N-концевая деградация "зрелого" белка нуклеазы. Степень деградации и количественное соотношение изоформ находятся в прямой зависимости от вида и штамма продуцирующего микроорганизма. Предполагается, что вышеназванная деградация происходит во время процессинга белков в клетке, поскольку изоформы были найдены как внутри клетки, так и вне ее.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Продуцирование нуклеазы.** Клетки природного продуцента нуклеазы *S. marcescens* B10M1 выращивали на среде, содержащей пептон и кукурузный экстракт в качестве питательных компонентов, как описано Ясновой и Пучковой [4].

Продуцирование рекомбинантной нуклеазы клетками *E. coli* MT102, несущими плазмиду p403-SD2, кодирующую нуклеазу *S. marcescens* W225, осуществлялось в условиях, описанных в работе [7]. Очищенный фермент обессоливали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25 сверхтонким (SMART System, 3.2 × 100 мм, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Швеция).

Клетки *S. marcescens* W280 и *E. coli* штаммов MT102, W3110, CH30 и CSH50 [12], несущие плазмиду p403-SD2, выращивали на обогащенной минимальной среде [5], отделяли от питательной среды центрифугированием, дважды промывали 10 мМ трис-HCl-буфером, pH 8.3, содержащим 10<sup>-7</sup> М пестатин и 10<sup>-3</sup> М фенилметилсульфо-

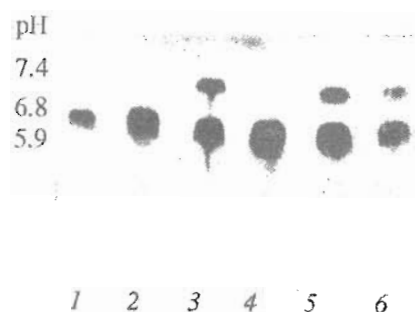


Рис. 5. Изоэлектрическое фокусирование нуклеаз, выявленных методом энзимогрaмм в клетках рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих плазмиду p403-SD2 (полосы 1 - 4), в клетках *S. marcescens* W 280 (5) и *S. marcescens* W 280, несущих плазмиду p403-SD2 (6).

нилфторид. Перед нанесением на гель клетки предварительно обрабатывали 30 мин лизоцимом (0.6 мг/мл клеточной суспензии). Питательную среду концентрировали диализом против 20% полиэтиленгликоля ( $M_r$  20000).

**Электроспрей-масс-спектрометрия** проводилась на одноквадрупольном масс-спектрометре Vestec, модель 201 (Vestec Corporation, США). Интерфейс электроспрея был описан ранее [13]. Отражающее напряжение 13 В. Температура в камере 65°C, источника температуры – 250°C. Образцы нуклеазы растворяли в смеси уксусная кислота–метанол–вода (1 : 50 : 49, по объему) до концентрации 0.5 мкг/мкл. Образец вносили в

Значения молекулярных масс ( $M_r$ ) и изоэлектрических точек (pI) изоформ природной и рекомбинантной нуклеаз *S. marcescens*, полученных культивированием клеток *S. marcescens* и *E. coli* соответственно, выявленных в пиках a - e ЭСМС-спектров, представленных на рис. 4

Пики	$M_r$			pI*
	<i>S. marcescens</i> *	<i>E. coli</i> *	Вычисленные <sup>2*</sup>	
a <sup>3*</sup>	26706.2	26708.2	26705.8	6.8
b <sup>4*</sup>	26663.9	26666.2		
c (-D) <sup>5*</sup>	26591.8	26594.8	26590.7	7.3
d (-D-T) <sup>5*</sup>	26489.1	26489.0	26489.6	
e (-D-T-L) <sup>5*</sup>	26376.4		26377.2	7.4

\* Значения, полученные экспериментальным путем.

<sup>2\*</sup> Подсчитано из аминокислотной последовательности [2, 5] как среднее значение, основанное на естественном множестве изотопов.

<sup>3\*</sup> "Зрелая" форма белка.

<sup>4\*</sup> Вариант с  $M$  на 42 а. е. м. меньше, чем  $M$  "зрелой" нуклеазы.

<sup>5\*</sup> Изоформы с отсутствующими N-концевыми аминокислотными остатками D, T и L (Asp, Thr и Leu).

камеру с помощью шприцевого насоса (Orion Research, США) (скорость 0.5 мкл/мин). Полноскановые спектры ( $m/z$  800 - 1950) получали при положительном заряде ионов с помощью системы Teknivent Vector 2 (США). Молекулярную массу определяли, используя систему Vector 2 (США). Результаты даны как средняя молекулярная масса, являющаяся производным из величины  $m/z$  для нескольких многозарядных пиков ионов. Молекулярные массы даны как средние значения, основанные на усредненных атомных массах элементов.

**N-Концевой анализ** проводили автоматической деградацией по Эдману с использованием секвенатора (Knauer, model 810), последовательно соединенного с системой для обращенно-фазовой ВЭЖХ (Knauer, Германия) [14]. Образцы белка растворяли в 0.1% трифторуксусной кислоте или 70% муравьиной кислоте и помещали на покрытые полибренном поли(дифторвиниловые) мембраны (Sigma, Aldrich, США). Фенилтиогидантоины аминокислот элюировали с колонки в линейном градиенте буферов, описанных Хункапиллером с соавт. [15].

**Изоэлектрофокусирование** проводили так, как описано Бидерман и Нильсеном [7], на приборе "Мультифор II" (Pharmacia, LKB), используя 1% агарозные гели (0.3 мм, марки IEF, Pharmacia, LKB, Allergod, Дания). Для установления рН-градиента вносили амфолины – Сервалиты (Serva, Германия), рН 4 - 6 и 3 - 10 – в пропорции 1 : 3. Изучаемые белки перед нанесением на гель обессоливали диализом против дистиллированной воды. рН в геле определяли с помощью смеси рI-маркерных тест-белков № 9 (Serva). Локализацию белковых полос осуществляли окрашиванием ку-масси синим.

**Энзимогаммы** получали переносом белковых полос капиллярным блоттингом на нитроцеллюлозные мембраны (Schleicher und Schüll, Германия) [16]. Блот инкубировали 25 мин (37°C) на агаре, содержащем субстрат ДНК (Difco Laboratories, США). Локализацию нуклеазы определяли после преципитации негидролизованной ДНК 1 М HCl по зонам просветления, образованным за счет расщепления субстрата под воздействием нуклеазы.

**SDS-гель-электрофорез** выполняли с использованием горизонтального аппарата LKB Multiphor II (Pharmacia Biosystem A/S) по методу Леммли [17]. Белки выявляли окрашиванием се-ребром.

Выполнение данной работы стало возможным благодаря поддержке Центра биотехнологичес-

ких процессов при Департаменте биотехнологии Технического университета Дании. Авторы работы выражают искреннюю благодарность Петеру Хойрепу за определение N-концевых аминокислотных последовательностей, Метте Б. Эгед за высококвалифицированную техническую помощь, Николаю Филимонову за техническую помощь, оказанную в процессе оформления статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лецинская И.Б., Балабан Н.П., Егорова Г.С., Таянишин В.И., Третьяк Т.М. // Биохимия. 1974. Т. 39. С. 116 - 122.
2. Ball T.K., Saurugger P.N., Benedik M.J. // Gene. 1987. V. 57. P. 183 - 192.
3. Ball T.K., Wasmuth C.R., Braunagel S.C., Benedik M.J. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 342 - 349.
4. Яснова Л.Н., Пучкова Л.И. // Микробиология. 1976. Т. 45. С. 976 - 983.
5. Biedermann K., Jepsen P.K., Riise E., Svendsen I. // Carlsberg. Res. Commun. 1989. V. 54. P. 17 - 27.
6. Biedermann K., Fiedler H., Larsen B.S., Riise E., Emborg C., Jepsen P.K. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 1833 - 1838.
7. Biedermann K., Nielsen B.R. // Pharmaceut. Technol. Int. 1990. V. 2. P. 37 - 41.
8. Bannikova G.E., Blagova E.V., Dementiev A.A., Morgunova E.Yu., Mikchailov A.M., Shlyapnikov S.V., Varlamov V.P., Vainshtein B.K. // Biochem. Int. 1991. V. 24. P. 813 - 822.
9. Филимонова М., Деметьев А., Лецинская И., Бакулина Г., Шляпников С. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 508 - 513.
10. Smith R.D., Loo J.A., Ogorzalek-Loo R.R., Busman M., Udseth H.R. // Mass Spectrom. Rev. 1991. V. 10. P. 356 - 451.
11. Филимонова М., Балабан Н., Шарипова Ф., Лецинская И. // Биохимия. 1980. Т. 45. С. 2096 - 2103.
12. Jepsen P.K., Riise E., Biedermann K., Kristensen P.C., Emborg C. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 2593 - 2596.
13. Allan M.H., Vestal M.L. // J. Amer. Soc. Mass Spectrom. 1992. V. 3. P. 18 - 26.
14. Wittman-Liebold A. // Methods of Protein Microcharacterization / Ed. Shively J.E. Totowa, NJ: Humana Press, 1986. P. 249 - 277.
15. Hunkapiller M.W., Lujan E., Ostrander F., Hood L.E. // Methods Enzymol. 1983. V. 91. P. 227 - 237.
16. Andrews A.T. Electrophoresis. Oxford: Clarendon Press, 1986. P. 59 - 74.
17. Laemmli U.K. Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.

***Serratia marcescens* Nucleases.**  
**Part I: Comparison of Natural and Recombinant Nucleases**  
**by Electrospray Mass Spectrometry**

**J. Pedersen, G. Andersen\*, P. Roepstorff\*,  
M. N. Filimonova\*\*, and K. Bidermann**

*Department of Biotechnology, Danish Technical University, Lyngby, Denmark*

*\* Department of Molecular Biology, Odense University, Odense, Denmark*

*\*\* Department of Microbiology, Kazan' State University, ul. Lenina 18, Kazan', 420008 Tatarstan, Russia*

**Abstract** – Isoforms of the natural and recombinant nucleases of *Serratia marcescens* were characterized by their molecular mass, which was determined by electrospray mass spectrometry. The natural nuclease was isolated from the *S. marcescens* B10M1 culture, whereas the recombinant nuclease was obtained from *Escherichia coli* MT102 cells carrying plasmid p403-SD2 with the nuclease gene *nuc*. The primary structure for each of the isoforms isolated from the nuclease preparations was determined by comparing its molecular mass with that of known amino acid sequence, which was determined from the nucleotide sequence of the *nuc* gene. Both preparations included identical nuclease variants with N-terminal amino acid residues removed. The number of isoforms in the natural nuclease was, however, significantly greater than in the recombinant nuclease. The structures of some of the isoforms were confirmed by N-terminal analysis.

*Key words: nuclease, enzyme isoforms, electrospray mass spectrometry, molecular mass, Serratia marcescens, Escherichia coli.*