

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
И ТРАНСФОРМАЦИЯ
ПУРИНОВЫХ
И ПИРИМИДИНОВЫХ
СОЕДИНЕНИЙ
МИКРООРГАНИЗМАМИ

Министерство высшего и среднего специального образования
Латвийской ССР

Латвийский ордена Трудового Красного Знамени
государственный университет имени Петра Стучки

Кафедра физиологии растений и микробиологии

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И
ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Междузюзовский сборник научных трудов

Под общей ред. проф. Х.А.Маурини



Latvijas
Universitātes
BIBLIOTEKA



Латвийский государственный университет им. П. Стучки
Рига 1981

В настоящем межвузовском сборнике научных трудов обобщены экспериментальные данные оригинальных исследований в области биохимии метаболизма нуклеиновых кислот и их гетероциклических компонентов у микроорганизмов. В сборник включены также работы, посвященные проблемам повышения эффективности микробиологического производства при синтезе биологически активных соединений с использованием отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства. Несколько работ касаются проблем повышения эффективности научного эксперимента и разработки методов микробиологических и биохимических исследований.

Сборник предназначен для биохимиков, микробиологов и студентов старших курсов факультетов биологического профиля.

Печатается по решению редакционно-издательского совета
ЛГУ им. П. Стучки от 26 июня 1981 года.

И 21007-122у 35.81.200300000
МВ12(II)-81

© Латвийский государственный
университет им. П. Стучки,
1981

Ивашенко М.Е., Камрадзе А.

ЛГУ им. П. Стучки

Выделение и некоторые свойства внутриклеточных
РНКаз микроскопического гриба *Penicillium lanoso-
viride*

Распространение исследований различных ферментов микробного происхождения связано, с одной стороны, с необходимостью изучения особенностей обмена микроорганизмов, а, с другой стороны, с возможностью использования этих микроорганизмов в качестве источников получения ферментов. Особый интерес исследователей вызывает нуклеазы микроорганизмов, которые очень широко используются для расшифровки первичной структуры нуклеиновых кислот (1,2). Чаще всего для этих целей используют ферменты, выделяемые в среду. Внеклеточные нуклеазы микроскопических грибов, более доступные экспериментаторам, также изучены полнее по сравнению с внутриклеточными (3-5). Необходимость изучения свойств внутриклеточных РНКаз гриба *Penicillium lanoso-viride* возникла в связи с исследованием метаболизма экзогенной поли-А клетками гриба. Задачей исследования являлся подбор факторов, эффективно подавляющих активность суммарной РНКазы клеток гриба *Penicillium lanoso-viride*, конкурирующих с изучаемой нами полиаденазой за субстрат, а также выделение и изучение специфичности отдельных внутриклеточных РНКаз.

Материалы и методы

В работе использовали микроскопический гриб *Penicillium lanoso-viride*, который культивировали в жидкой синтетической среде в колбах и на плотной среде в чашках Петри.

Состав жидкой синтетической среды

K_2HPO_4	- 0,3%
KCl	- 0,25%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 0,025%
$(NH_4)_2SO_4$	- 0,1%
глицерин	- 3 мл/л.

pH среды доводили до 5,6 и автоклавировали при 0,5 атм. (112°C) 20 мин.

Состав плотной среды

Плотная среда состояла из просеянных через мелкое сито пшеничных отрубей увлажненных крановой водой.

На поверхность плотной среды в чашке Петри помещали целлофановый диск для предотвращения смешивания частиц среды с мицелием гриба.

Посевным материалом служила густая суспензия спор 48-часовой культуры гриба, выращенная на сусло-агаре.

Бесклеточный экстракт гриба получали тщательным размельчением гиф гриба с последующей экстракцией 0,1 М калий-фосфатным буфером pH 6,0 и центрифугированием 30 минут при 6000 об/мин., при 0°C.

Активность РНКазы определяли в реакционной смеси следующего состава:

0,1 мл раствора РНК в концентрации 2 мг/мл

0,2 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера pH 6,0 *

0,1 мл исследуемого экстракта гиф гриба,

* При изучении динамики РНКазной активности при различных pH вместо калий-фосфатного буфера использовали ацетатный буфер pH 5,2 и трис-HCl буфер pH 8,4. Смесь инкубировали в термостате при 37° в течение 15 мин (для экстрактов гриба, выращенного в жидкой среде) и 60' (для экстрактов гриба, выращенного на плотной среде).

Реакцию останавливали прибавлением 0,1 мл холодной 25% хлорной кислоты при 0°.

Количество кислоторастворимых продуктов в надосадочной фракции после центрифугирования определяли спектрофотометрически по поглощению раствора при 260 нм (6). За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает изменения поглощения на 0,1 оптическую единицу в пересчете на 1 мл исследуемого экстракта за 1 час инкубации. Субстратом для определения РНКазной активности служила суммарная дрожжевая РНК (Новосибирск, СКТБ БАН). Для исследования субстратной специфичности вместо РНК в инкубационную смесь добавляли

соответствующие субстраты: поли-А, поли-АУ (9:1) поли-АУ (4:6), поли У, поли-Ц, (Реакал, Венгрия) поли-И (Новосибирск СКТБ БАВ), -тРНК, ДНК (СКТБ БАВ)

При расчете РНКазной активности для различных субстратов использовали коэффициенты пересчета: (с учетом разницы молекулярного веса и молярной экстинкции этих субстратов относительно РНК):

поли-А	- 0,84
поли АУ (4:6)	- 1,07
поли АУ (9:1)	- 0,87
поли У	- 1,30
поли Ц	- 0,93
ДНК	- 1,02
тРНК	- 1,00
РНК	- 1,00

Для изучения влияния различных факторов на активность внутриклеточных РНКаз использовали: I предварительную обработку экстракта гриба сульфатом стрептомицина (0,15 мл 10%-ного р-ра на мл экстракта) и бентонитом (25 мг/мл);

2. Добавление в инкубационную смесь 0,02 мл $MgCl_2$ и 0,04 мл ЭДТА.

3. Добавление в среду культивирования актиномицина Д (50 мг/мл).

Для выделения из грубого экстракта РНКазы осаждали сульфатом аммония до 80%-ного насыщения при 0°(8). Осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 6000 об/мин, 0°С. Полученный таким образом осадок растворяли в минимальном объеме 0,05 М калий-фосфатного буфера рН 6,0 и диализовали против того же буфера.

На следующем этапе проводили разделение и очистку РНКаз на колонке (1,5 x 17 см), заполненной Дауэксом Ix8 ("Serva") уравновешенным 0,05 М калий-фосфатным буфером рН 6,0. Объем ферментного раствора, нанесенного на колонку - 10 мл с содержанием белка 3-5 мг/мл. Элюцию ферментативной активности проводили непрерывным градиентом концентрации хлористого натрия в 0,05 М калий-фосфатном буфере со скоростью 20 мл/час. Фракции, объемом 2 мл, собирали на автоматическом коллекторе

"Ультрарак" (КВ, Швеция) и определяли в них содержание белка (поглощение при 280) и РНКазную активность.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования динамики накопления суммарной РНКазной активности показывают, что в процессе роста гриба в жидкой питательной среде имеется два максимума активности как при кислом рН = 5,2, так и при щелочном рН = 8,4 (рис.1). Первый пик активности наблюдается во второй половине лог-фазы, второй - во время стационарной фазы развития. При выращивании гриба на плотной среде также установлено два пика активности РНКаз: Первый пик - в первой половине лог-фазы, а второй - во второй половине лог-фазы при рН 8,4 и в стационарной фазе при рН 5,2 (рис.2). Суммарная активность РНКаз определенная при рН 5,2 как в плотной, так и жидкой среде выше активности, определенной при рН 8,4.

Результаты исследования влияния различной предварительной обработки экстракта или присутствия в инкубационной смеси различных веществ на суммарную активность внутриклеточных РНКаз показаны на рис.3.

Оказывается, проявление РНКазной активности существенно ингибируется обработкой экстракта сульфатом стрептомицина (на 69,9% по сравнению с необработанным экстрактом), бентонитом (на 62,5%), а также после выращивания гриба в среде с актиномицином Д (на 71,2%). В присутствии ионов магния в инкубационной смеси активность РНКазы снижается на 50% по сравнению с контролем. Присутствие ЭДТА в инкубационной смеси способствует повышению активности суммарной РНКазы на 62,5%. Сопоставляя свойства 3*РНКаз и 5*РНКаз, Шапот (7) обнаружил, что ионы магния являются ингибиторами 3*РНКаз - трансфераз, т.к. они стабилизируют вторичную структуру их субстратов, и наоборот, они необходимы для действия 5*РНКаз-гидролаз. Автор полагает, что в присутствии ЭДТА, связывающего ионы магния, можно дифференцировать 3*РНКазы и 5*РНКазы в их смеси. Интерпретируя наши данные о влиянии ионов магния и ЭДТА на активность суммарных РНКаз можно заключить, что исследуемая

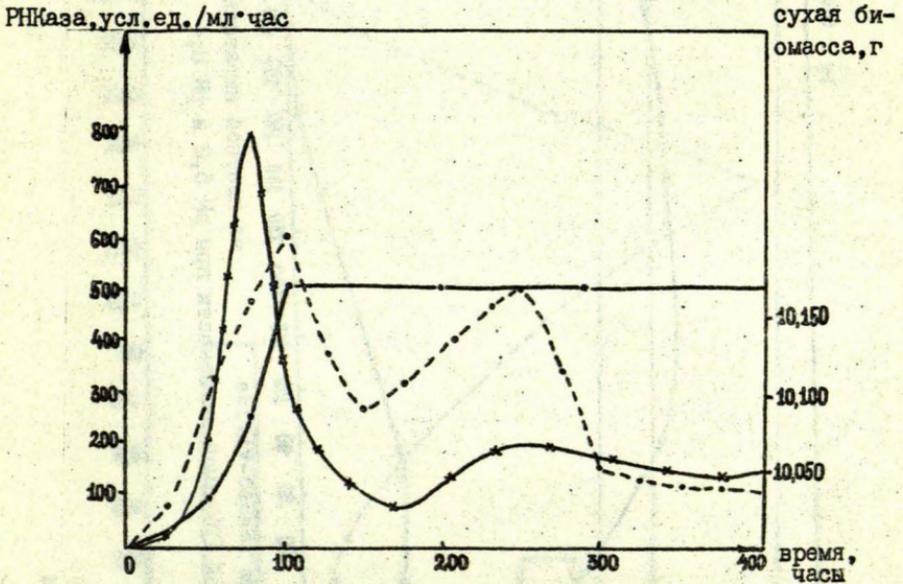


Рис. I. Рост гриба *Penicillium lanoso-viride* в жидкой питательной среде и динамика РНКаза в бесклеточном экстракте гриба при рН 5,2 и рН 8,4

- сухая биомасса
- - -○- РНКаза при рН 5,2
- ×— РНКаза при рН 8,4

Акт. РНКазы

lg биомассы

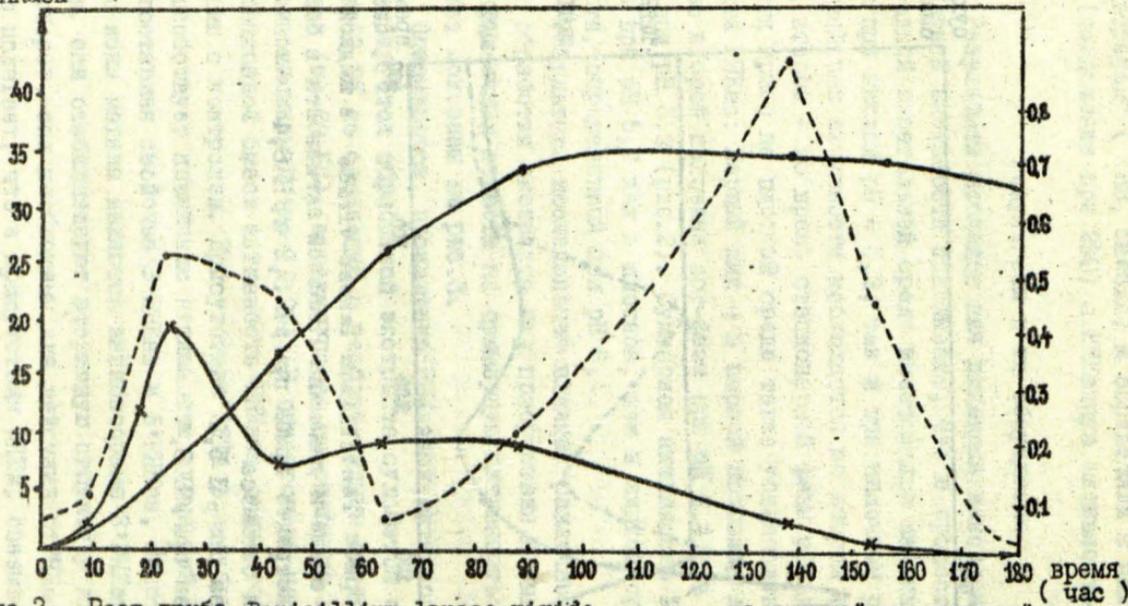


Рис.2. Рост гриба *Penicillium lanoso-viride* на плотной питательной среде и изменение внутриклеточной РНКазной активности при рН 5,2 и рН 8,4

- биомасса
- - -●- РНКазы при рН 5,2
- ×— РНКазы при рН 8,4

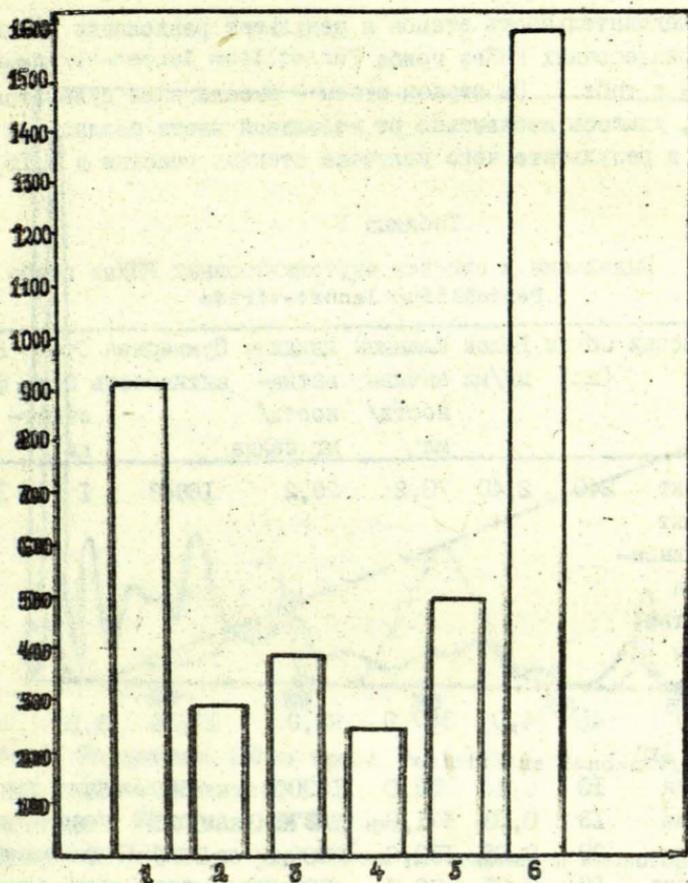


Рис. 3. Влияние различной обработки экстракта на суммарную активность внутриклеточных РНКаз гриба *Penicillium*

Penicillium - viride

1- необработанный экстракт; 2- обработанный сульфатом стрептомицина экстракт; 3- обработанный бентонитом экстракт; 4- экстракт гриба, выращенного в среде с актиномицином Д; 5- в присутствии Mg^{++} ; 6- в присутствии ЭДТА

активность проявляет свойства, характерные для 3'РНКаз, расщепляющих РНК, с образованием продуктов с 3'фосфатной группой на конце.

Последовательность этапов и результат разделения и очистки внутриклеточных РНКаз гриба *Penicillium lanoso-viride* показаны в табл. I. На первом этапе - высаливании сульфатом аммония, удалось избавиться от небольшой части балластных белков, в результате чего получена степень очистки в 3,15 раз.

Таблица I

Выделение и очистка внутриклеточных РНКаз гриба
Penicillium lanoso-viride

Этап очистки	Объем (мл)	Белок мг/мл	Единицы активности/мл	Единицы активности/мг белка	Суммарная активность	Степень очистки	Выход ферм.
1. Экстракт	240	2,40	70,2	29,2	16848	I	I00
2. Экстракт после высаливания сульфатом аммония (диализованный)	40	4,0	367,9	92,0	17716	3,15	87
3. Дауэкс Ix8							
I фракция	10	0,45	759,0	1690,0	7590	58	В сум-
II фракция	13	0,03	671,0	22370,0	8723	766	ме
III фракция	29	0,05	130,0	2600,0	3770	89	I22
IV фракция	17	0,05	86,0	4300,0	602	I47	

В результате хроматографического разделения РНКаз на колонке с дауэксом Ix8 было получено 4 различных фракций активности (рис. 4). Первый пик активности, который не связывался с анионообменником, очищен в 58 раз. Следующие три пика активности получены с увеличением в элюирующем буферном растворе кон-

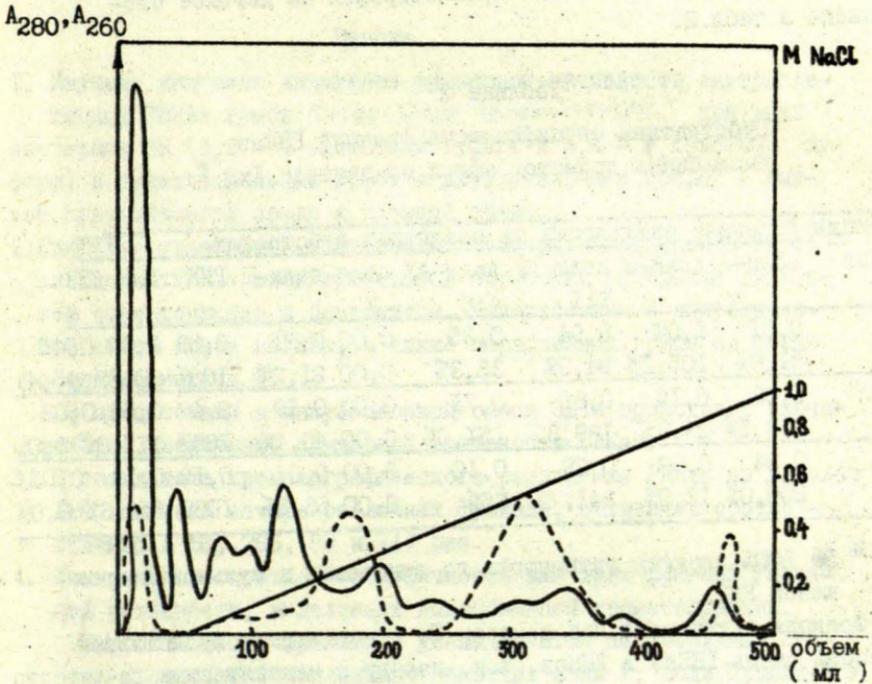


Рис.4. Разделение РНКаз гриба *Penicillium lanoso-viride* на колонне дауэкса 1x8

— абсорбция в УФ лучах при 280 нм

- - - активность РНКаз по увеличению поглощения в кислоторастворимой фракции при 260 нм

Наклонная прямая — прирост концентрации соли в элюирующем буфере.

центрации хлористого натрия соответственно до 0,50; 0,60 и 0,98 М. Степень очистки этих фракций РНКаз соответственно 760, 89 и 147.

Субстратная специфичность первых трех фракций РНКазной активности, выделенных после хроматографии на дауэксе отображена в табл.2.

Таблица 2

Субстратная специфичность фракций РНКаз выделенных хроматографией на дауэксе Ix8 *

Фракция РНКаз	РНКазная активность на различных субстратах								
	поли-А	поли-И	поли-АУ	поли-АУ	поли-поли-Ц	РНК	тРНК	ДНК	
			9:1	4:6	-У				
I	0,81	1,04	0,94	0,35	0,00	0,21	0,99	0,60	0,45
	81,8%	105,1%	94,9%	35,3%	0,00	21,2%	100%	60,6%	45,4%
II	0,68	0,14	0,85	0,71	0,00	0,19	0,47	0,52	0,03
	144,5%	29,8%	189,3%	151,0%	0,00	40,4%	100%	111,0%	6,0%
III	0,24	0,02	0,29	0,10	0,00	0,07	0,12	0,19	0,01
	200,0%	17,0%	241,7%	85%	0,00	58,3%	100%	158,3%	8,0%

* За 100% принята активность по отношению к суммарной дрожжевой РНК.

Фракция активности под номером I, по-видимому, представляет собой смесь РНКаз и ДНКаз, т.к. наряду с одонитевыми гомо-и гетерополимерами расщепляет также и ДНК, хотя проявляет при этом более низкую активность.

Фракции II и III являются собственно РНКазами, т.к. незначительное количество деградированной ДНК находится в пределах ошибки определения. Эти фракции деградируют поли-А с активностью в 1,4 - 2 раза превышающую активность деградации суммарной дрожжевой РНК. Гетерополимеры поли-АУ расщепляются всеми исследованными фракциями менее активно по мере убывания в них доли аденилового компонента. Поли-И деполимеризуется РНКазами II и III с очень низкой активностью, а транспортная РНК с активностью, в 1,1 и 1,6 раз соответственно превышающей де-

градацию суммарной дрожжевой РНК. Деполимеризация поли-Ц происходит всеми изученными РНКазами, но с небольшой активностью, а поли-У не пригоден в качестве субстрата для этих РНКаз.

Выводы

1. Изучена динамика изменения суммарной активности внутриклеточных РНКаз гриба *Penicillium lanoso-viride* при двух значениях pH (5,2 - в ацетатном буфере и 8,4 - в трис-НС буфере) и культивировании гриба в двух различных средах - жидкой синтетической среде и плотной среде.

2. Показано угнетающее действие на суммарную активность внутриклеточных РНКаз предварительной обработки экстракта сульфатом стрептомицина и бентонитом, присутствием в инкубационной смеси ионов магния, а также выращивания гриба на среде с актиномицином Д.

В присутствии в инкубационной смеси ЭДТА происходит значительное увеличение суммарной активности РНКаз.

3. В результате хроматографического разделения РНКаз на лауэксе Ix8 получено четыре различных фракции, очищенных соответственно в 58, 766, 89 и 147 раз.

4. Показана субстратная специфичность для трех фракций РНКазной активности, выделенных ионообменной хроматографией.

(Так активность фракции I увеличивается на различных субстратах в следующей последовательности: поли У; поли Ц; поли-А:У (4:6); ДНК, тРНК, поли А, поли А:У (9:1); РНК, поли И.

Для фракции II эта последовательность имеет следующий характер: поли-У; поли-И; ДНК; поли-Ц; РНК; тРНК; поли-А; поли - А:У(4:6); поли-А:У (9:1); а для фракции III - поли-У; ДНК, поли-И, поли-Ц, поли-А:У (4:6), РНК, тРНК, поли-А, поли-А:У (9:1).

Литература

1. Egami F., Nakagamura R. *Microbiol. ribonucleases*. М.-У., Berlin: Springer - Verlag, 1969.
2. Uchida T., Egami F. *The Enzymes*, 4(VII), 205, 1971.

3. Безбородова С.И., Бородаева Л.И., Панкова Л.И. - Микробиол., № 37(I), с.10-14, 1968.
4. Безбородова С.И., Бородаева Л.И., Иванова Г.С., Морозова В.Г. - Биохим. № 34 (6), с.1129-1136, 1969.
5. Безбородова С.И., Ильина Т.В., Крупянко В.И. - Докл. АН СССР 196 (6), с.1460-1462, 1971.
6. Anfinsen C.B., Redfild R.R. et al. J. Biol. Chem., 207, 201, 1954.
7. Шапот В.С. Нуклеазы. - М. Медицина, 1968.
8. Броновицкая З.С., Горетов В.П. - Прикл. биохим. и микробиол. № 3(6), с.707, 1967.

Знаменская Л.В., Красноперова И.А.
Михайлова Л.А.
КГУ им.В.И.Ульянова-Ленина /Казань/

Образование щелочной внеклеточной РНКазы и рост *Bacillus intermedius* на разных средах

Щелочная внеклеточная рибонуклеаза *Bac. intermedius* 7Р благодаря интересным биохимическим свойствам привлекла внимание ряда исследователей, изучающих противовирусное и противоопухолевое действие ферментов /1/, а также молекулярных биологов /2/. В связи с этим возникла необходимость получения РНКазы в препаративных количествах. Начальным этапом при этом является подбор состава среды.

В настоящей работе предпринято изучение влияния широкого спектра источников углерода и азота на биосинтез щелочной внеклеточной РНКазы и рост *Bac. intermedius* 7Р.

Материалы и методы

Штамм *Bac. intermedius* 7Р был выделен из образца почвы Татарии и отобран по признаку максимальной РНКазной активности методом посева /3/. Культуру выращивали в колбах емкостью 750 мл на качалке при температуре $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

В качестве исходной была использована питательная среда, предложенная Накай с соавторами для *Bac. subtilis* /4/, в которой соевый экстракт был заменен пептоном семипалатинского производства, дорогостоящий трис исключен. Среда имела следующий состав (в %): пептон - 2,0, лактат Na - 1,5, CaCl_2 - 0,01, $\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,03, NaCl - 0,3, MnSO_4 - 0,01, pH среды перед стерилизацией доводили раствором NaOH до 8,3. Засев опытных колб со 100 мл питательной среды проводили 1 об.% 24-часовой культуры.

Источники углерода добавляли в среду в концентрациях, адекватных содержанию углерода в 1%-ном растворе глюкозы. Источники азота вносили в среду в концентрации 2%, кроме куку-

рузного экстракта, который вносили в концентрации 3%, исходя из того, что среда с 3% кукурузного экстракта содержала такое же количество аминного азота, как среда с 2% семипалатинского пептона.

РНКазную активность в культуральной жидкости определяли по количеству кислоторастворимых продуктов, образующихся в результате гидролиза РНК. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающее увеличение оптической плотности на единицу шкалы спектрофотометра (A_{260}) в пересчете на 1 мл ферментного раствора за 1 час инкубации - опт.ед./мл/час /5/. В качестве субстрата использовали препарат суммарной дрожжевой РНК отечественного производства. Прирост биомассы определяли нефелометрически на ФЭК - 56М со светофильтром № 9, за единицу биомассы принимали поглощение в 1 см кювете, равное единице.

Концентрацию фосфата определяли по методу Куттнера /6/, аминный азот - по методу Поуп и Стивенс /7/.

Результаты и обсуждение

С целью подбора оптимального источника углерода для биосинтеза РНКазы *Vac.intermedius* 7P исследовали глюкозу, фруктозу, сахарозу, маннит, мальтозу, лактат, лактозу, глицерин и сорбит. Сравнение проводили со средой, не содержащей дополнительных источников углерода. Пептон в этой среде служил источником азота и углерода одновременно.

Динамика накопления РНКазы в средах с разными источниками азота представлена на рис. I. Как видно из рисунка, лучшим источником углерода оказалась глюкоза, в среде с которой активность фермента к 24 часу роста более чем в 2 раза превышает активность в среде, не содержащей дополнительного источника углерода. РНКазная активность на среде с глюкозой на 24-й час культивирования принята за 100%. Близкие значения РНКазной активности отмечены на средах с фруктозой, сахарозой, мальтозой и маннитом. Продолжение культивирования бактерий до 38 часов приводит лишь к незначительному увеличению накопления

РНКазы, %

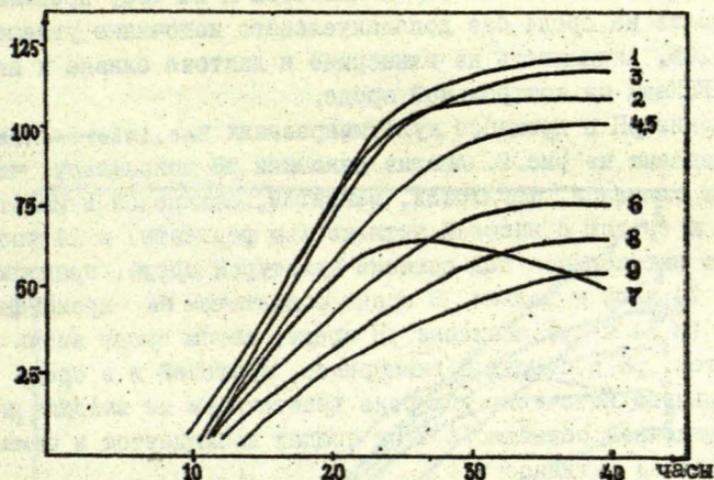


Рис.1. Активность РНКазы при росте *Bacillus intermedius* 7P на средах с разными источниками углерода

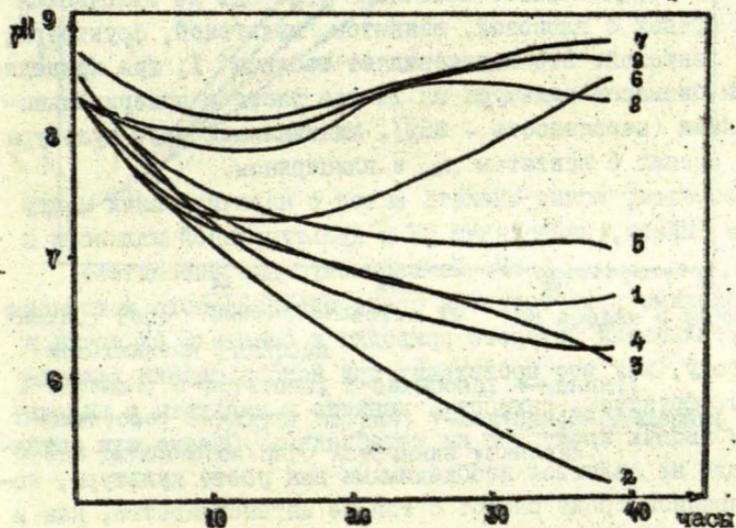


Рис.2. pH культуральной жидкости при росте *Bacillus intermedius* 7P на средах с разными источниками углерода

РНказы в культуральной жидкости (\approx на 15%). Активность РНказы в средах с лактатом Na и лактозой к 24 часу превышает активность на среде без дополнительного источника углерода на 15-20%. Активность на глицерине и лактозе близка к активности РНказы на контрольной среде.

Изменение рН в процессе культивирования *Vac.intermedius* 7Р представлено на рис.2. Анализ динамики рН показывает, что в средах с глюкозой, фруктозой, маннитом, сахарозой и мальтозой (т.е. в средах с высокой активностью фермента) к 14 часу происходит интенсивное подкисление культурой среды, продолжающееся до 24 часа и дальше. В среде с лактатом Na происходит начальное (к 14 часу) снижение рН среды, затем среда вновь защелачивается. рН в средах с глицерином, лактозой и в среде без дополнительного источника углерода практически не выходит из пределов щелочной области. В этих средах наблюдается и самая низкая РНказная активность.

В то же время анализ накопления биомассы на этих средах (рис.3) показывает, что в экспоненциальной фазе рост культуры в среде без дополнительного источника углерода не отличается от роста в средах с глюкозой, маннитом, мальтозой, фруктозой, сахарозой, лактозой. Это подтверждает таблица I, где приведены значения биомассы культуры на 24 час роста с доверительными интервалами (вероятность - 95%). Минимальный рост культуры отмечен на средах с лактатом Na и глицерином.

Таким образом, можно сделать вывод о наличии связи между биосинтезом РНказы, изменением рН в культуральной жидкости и ростом *Vac.intermedius* 7Р. По-видимому, для биосинтеза РНказы необходимо присутствие в среде определенного источника углерода, утилизация которого приводит к смещению рН среды в кислую сторону, как это происходит при использовании культурой глюкозы, фруктозы, сахарозы, маннита и мальтозы и выделении в среду кислых продуктов их метаболизма. Однако эти источники углерода не являются необходимыми для роста культуры, которая в пептонной среде растет с той же интенсивностью, как и при внесении в нее дополнительно вышеперечисленных источников углерода.

Биомасса,
опт.ед.

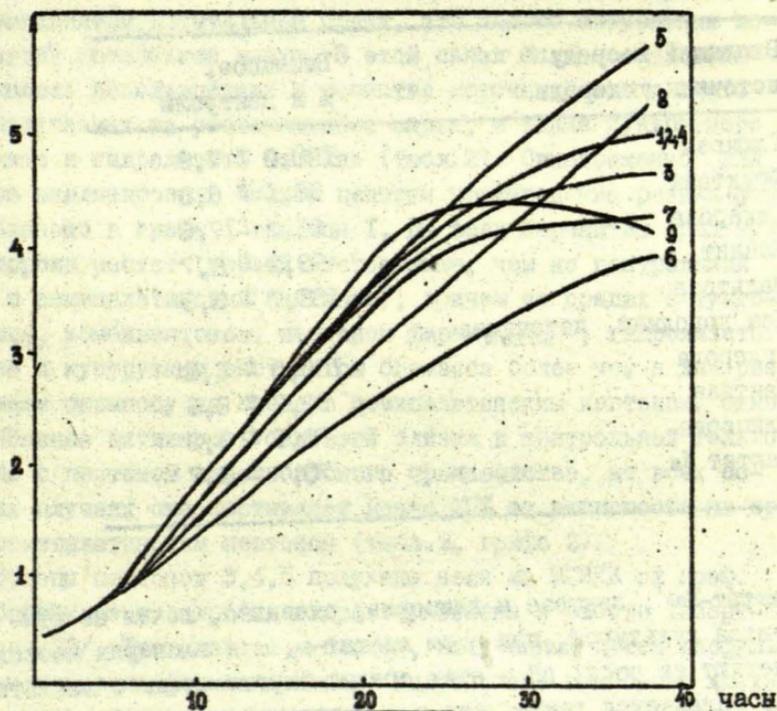


Рис.3. Рост *Bac.intermedius 7P* на средах с разными источниками углерода

- 1-глюкоза; 2-фруктоза; 3-сахароза; 4-маннит;
5-мальтоза; 6-лактат натрия; 7-лактоза; 8-глицерин;
9-без дополнительного источника углерода

Таблица I

Влияние источников углерода на рост
Vas.intermedius 7P
 (24-й час культивирования)

Входящий в среду источник углерода	Биомасса, % к контролю
Глюкоза	100,0 ± 7,9
Фруктоза	96,1 ± 6,0
Сахароза	97,2 ± 7,6
Маннит	99,2 ± 8,7
Мальтоза	103,7 ± 3,0
Без дополнит. источника углерода	100,5 ± 6,1
Лактоза	92,7 ± 6,6
Глицерин	78,1 ± 3,2
Лактат Na	70,7 ± 3,7

Лактат-Na, лактоза и глицерин, очевидно, почти не утилизируются культурой, при этом лактат-Na и глицерин несколько угнетают ее рост; pH в этих средах (кроме среды с лактатом - Na) изменяется также, как и в пептонной среде. Однако, в среде с лактозой и лактатом - Na образуется больше РНКазы, чем в среде, не содержащей дополнительного источника углерода.

Очевидно, со всеми источниками углерода в той или иной степени вносится какой-то эффектор, активирующий процесс биосинтеза РНКазы.

Изучение влияния различных источников азота на биосинтез РНКазы проводили в среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу в концентрации 1%. Ранее было показано /3/,

что культура *Bac.intermedius* 7P плохо растет и не образует внеклеточную щелочную рибонуклеазу на средах с минеральными источниками азота. В среде, содержащей в качестве источника азота пептон семипалатинского производства, получены удовлетворительные результаты /8,9/. Однако, пептон, производимый из дорогостоящего пищевого сырья, не может считаться перспективным компонентом питательной среды, что делает актуальным поиск других источников азота. В этой связи была исследована возможность использования в качестве источника азота пептонов, получаемых из растительного сырья, а также кукурузного экстракта и гидролизата казеина (табл.2). Одновременно для примера анализировали мясные пептоны производства разных фирм. Как показано в графе I таблицы I, на всех вариантах сред культура хорошо растет (урожай клеток выше, чем на контрольной среде с семипалатинским пептоном), причем на средах с тунгопептоном, комбипептоном, пептоном фирмы Merck, гидролизатом казеина и кукурузным экстрактом биомасса более чем в два раза превышала биомассу на среде с семипалатинским пептоном. Однако, РНКазная активность бактерий близка к контрольной только в среде с пептоном новосибирского производства, во всех остальных случаях она составляет менее 20% от активности на среде с семипалатинским пептоном (табл.2, графа 2).

Образцы пептонов 3,4,5 получены нами из ВГНКИ от проф. А.П.Простякова и подробно охарактеризованы в работе Таварткиладзе /10/. Тунгопептон - пептон, полученный путем лиофильного высушивания ферментативного гидролизата тунгового жмыха (т.е. имеет растительное происхождение и дешев, поскольку тунговый жмых является отходом производства технического масла). Гепатопептон получается путем лиофильной сушки гидролизата переваренной печени после получения из нее так называемого "печеночного экстракта". Комбипептон представляет собой лиофилизированную смесь гидролизатов, включающую две части панкреатического гидролизата печени и одну часть ферментативного гидролизата тунгового жмыха.

Известно, что тунгопептон содержит меньшее количество общего азота, чем семипалатинский пептон, так, содержание обще-

го азота в семипалатинском пептоне равно 14,8%, а в тунгопептоне - 9,11% /10/ и, как отмечает автор, это ниже требований, предусмотренных ГОСТом 13805-76 и требований стран СЭВ и ИСО. Однако, при введении в питательную среду тунгопептон обеспечивает значительно более интенсивный рост *Vac.intermedius* 7P, чем семипалатинский пептон, и резко снижает количество фермента в культуральной жидкости. Аналогичное действие оказывает кукурузный экстракт и ряд других пептонов. Содержание фосфора в этих пептонах не приводится.

Поскольку известно, что наличие в среде неорганических фосфатов ведет к интенсификации роста микроорганизмов, но при этом часто наблюдается снижение биосинтетической активности клеток в отношении ряда ферментов /II, I2/, все исследуемые пептоны были проанализированы на содержание в них общего и неорганического фосфора. Данные по содержанию фосфора в пептонах представлены в графах 4,5 таблицы 2. Было установлено, что только среда с пептоном новосибирского производства незначительно отличается по содержанию общего и неорганического фосфора от контрольной среды (с семипалатинским пептоном). Во всех остальных средах содержалось значительно большее количество исследуемых форм фосфора, а среда с тунгопептоном содержала в 118 раз больше неорганического фосфора и в 72 раза больше общего фосфора по сравнению со средой с семипалатинским пептоном. Очевидно, именно повышенное содержание фосфора в тунго-, гепато- и комби пептонах обеспечило и наблюдаемую в лаварткиладзе высокую интенсивность роста тест-организмов *Str.faecalis* шт. 6783, *E. coli* шт. 675, *Str.pyogenes* шт. Дик I, *Str.aureus* "Лоссманов" и *Cor.difteroides* шт. I9II в средах с ними по сравнению с ростом на среде с семипалатинским пептоном.

Обращает на себя внимание тот факт, что в среде с пептоном из баранины, ферментативным пептоном венгерского производства и пептоном фирмы Хемапол (табл.2, № 6, 10, 11) наблюдается самая низкая активность РНКазы (менее 0,3% по сравнению с контролем), а содержание общего и неорганического фосфора хотя и превышает его содержание в семипалатинском и новоси-

Таблица 2

Рост и активность щелочной внеклеточной РНКазы
Vac. intermedius 7P на средах с различными источниками
 азота (24-й час культивирования)

Источник азота	Биомасса, опт.ед.	РНКазы опт.ед/мл/час	pH среды	Фосфор, общий	мг%	неорг.
I. Семипальтинский пептон	4,5	26000	6,6	1,6		0,8
2. Новосибирский пептон	4,7	23000	6,2	1,8		1,2
3. Тунгопептон	11,3	1500	7,2	115,0		96,9
4. Гепатопептон	10,0	1700	7,2	17,1		10,2
5. Комбипептон	10,0	2400	6,8	41,5		30,6
6. Пептон из баранины	5,5	30	5,8	16,0		12,2
7. Гидролизат казеина сухой	10,0	700	7,4	14,9		12,2
8. Кукурузный экстракт	11,0	220	7,4	40,0		20,0
9. Пептон фирмы Merck	10,4	5000	7,1	11,5		10,3
10. Пептон ферментативный /Венгрия/	5,5	60	5,1	25,3		13,0
II. Пептон импортный "Хемапол"	5,3	50	5,0	13,1		4,6

бирском пептонах, но заметно ниже, чем в тунгопептоне, комби-пептоне и кукурузном экстракте. Рост культуры в этих средах несущественно отличается от роста на семипалатинском и новосибирском пептонах. При этом рН в этих средах на 24 час роста имеет значение 5,3, 5,1, 5,0, т.е. резко кислый. В остальных средах рН имеет значение, близкое к нейтральному. Поскольку исследуемые среды отличаются только по источнику азота, можно предположить, что отсутствие у культуры в средах с данными пептонами способности выравнивать рН до слабокислых и нейтральных значений отрицательно сказывается на её биосинтетической активности в отношении РНКазы.

В связи с тем, что на средах с растительными пептонами, кукурузным экстрактом и гидролизатом казеина наблюдается хороший рост бактерий (урожай клеток в 2,0 - 2,5 раза выше, чем на пептоне, не обогащенном фосфатами), нам представляется интересным исследовать в дальнейшем возможность получения фермента путем дерепрессированного синтеза.

Кроме того, нам представляется целесообразным введение при характеристике промышленных пептонов показателя содержания в них фосфора, т.к. пептоны используются в питательных средах не только с целью накопления обильной биомассы, но и для получения ряда ферментов, репрессируемых фосфатом, в частности, фосфатаз, РНКаз и др.

В заключение авторы выражают глубокую благодарность проф. А.П.Простякову за любезно предоставленные для исследования образцы новых отечественных пептонов.

Выводы

1. Лучшим источником углерода для биосинтеза РНКазы *Вас. intermedius* 7Р является глюкоза.
2. Источники углерода, вносимые в среду, содержащую 2% семипалатинского пептона, активизируют биосинтез РНКазы и не оказывают влияния на рост культуры.
3. Оптимальным органическим источником азота для биосинтеза РНКазы является пептон, не обогащенный фосфором.

4. Показано отрицательное влияние фосфора, содержащегося в компонентах питательной среды, на биосинтез щелочной внеклеточной РНКазы *Vac.intermedius* 7P и положительное влияние на рост бактерий.

Литература

1. Куриненко Б.М., Беляева М.И., Черепнева И.Е., Виестуре З.А. - *Вопр. онкологии*, 1977, 23, 94.
2. Афанасенко Г.А., Дудкин С.М., Каминир Л.Б., Северин Е.С., Голубенко И.А., - *Биоорганическая химия*, 1979, 5, 2, 187.
3. Лещинская И.Б., Сайманова Р.А., Булгакова Р.Ш., Капранова М.Н., Голубенко И.А., Авт.свид. № 587176.-*Бюл.откр. и изобр.*1978, I, 74.
4. Nakai M., Minamy Z., Yamazaki T., - *J.Biochem.*, 1965, 57, 96.
5. Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Капранова М.Н., Голубенко И.А. - В кн.: *Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов.* - Казань, 1980, 178.
6. Kuttner T., Cohen H.R., - *J.Biol.Chem.*, 1927, 72, 517.
7. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севостьянова Г.А. - *Практикум по общей биохимии.* - М.: Просвещение, 1975, 318.
8. Клейнер Г.И., Паэгле Б.Я., Хисамеева Т.А., Знаменская Л.В., Балабан Н.П., Лещинская И.Б. - М.: *Рукопись деп. в ВНИИТИ*, 1979, № 321-79 Деп.
9. Знаменская Л.В., Клейнер Г.И., Паэгле Б.Я., Краснов С.И., Лещинская И.Б. - *Микробиология*, 1980, 49, 5, 722.
10. Накамура К., Тон-е А., Ishikawa T. - *Biophys.et Biochim. Acta*, 1976, 432, 2, 223.
11. Таварткиладзе Н.И. - *Получение и изучение свойств гидролизатов и пептона из непищевого сырья животного и растительного происхождения.* Дисс. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. М., 1977.
12. Ежов В.А., Санцевич Н.И., Безбородова С.И. - *Микробиология*, 1976, 45, 2, 253.

Знаменская Л.В., Краснов С.И.
ИТУ им.В.И.Ульянова-Ленина

Метод математического планирования
эксперимента применительно к оптимизации
биосинтеза бактериальной РНКазы

Необходимость получения микробных нуклеаз в препаративных количествах ставит вопрос о повышении биосинтетической активности микроорганизмов - их продуцентов. Одним из путей увеличения ферментативной активности микроорганизмов является оптимизация условий культивирования. Как и в ряде других экспериментальных наук, для оптимизации процессов в микробиологии все большую популярность завоевывает метод "крутого восхождения" Бокса-Уилсона /1,2/. Этот метод был применен нами для оптимизации условий культивирования *Vac.intermedius* 7P с целью повышения биосинтеза щелочной внеклеточной РНКазы /3/.

Преимущества этого метода перед традиционным изучением однофакторных зависимостей обусловлены одновременным изменением всех выбранных факторов, от которых зависит значение оптимизируемой величины (целевой функции y).

Первый этап метода требует получения линейной модели целевой функции в окрестности выбранных исходных значений x_{i0} факторов x_i (например, x_1 - концентрация какого-либо компонента среды, x_2 - pH, x_3 - аэрация и т.д.). Это достигается постановкой одновременной серии опытов, в которой каждый фактор может быть установлен на двух фиксированных уровнях, где Δ_i - шаг варьирования (в кодированных переменных значениям x_i^{\pm} соответствуют $x_i = \pm 1$).

Практика применения математических методов оптимизации в биологии /4/ показывает целесообразность использования в качестве такой серии полных факторных экспериментов ПФЭ 2^I (число опытов $N = 2^I$, I - число факторов). Постановка ПФЭ 2^I позволяет получить уравнение вида

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum_{i,j} a_{ij} x_i x_j + \dots + a_{12\dots I} x_1 x_2 \dots x_I \quad (I),$$

отражающее не только линейные эффекты, но и взаимодействия различных порядков. Таким образом, попутно достигается более глубокое понимание биологического механизма изучаемого процесса. В табл. I приводится наиболее часто используемый план ПФЭ 2^4 с простым алгоритмом Иейтса для расчета коэффициентов управления /1/. Столбец значений переменных x_i образует матрицу плана. Коэффициенты членов, написанных в последнем столбце таблицы, получаются из соответственных величин A_n предыдущего столбца делением на число опытов $N = 16$.

Статистическая обработка результатов ПФЭ 2 заключается в следующем. Подсчитывается дисперсия среднего значения по формуле

$$s^2(\bar{y}) = \frac{1}{NK(K-1)} \sum (\bar{y}_n - y_{nk})^2, \quad (2)$$

где K - число повторностей, y_{nk} - значение экспериментального замера величины Y для условий n -той строки матрицы плана в k -той повторности, $\bar{y}_n = \frac{1}{K} \sum y_{nk}$. Коэффициенты a_i (аналогично a_{ij} , a_{ijk} и т.д.) считаются незначимыми и соответствующие члены не включаются в уравнение, если

$$a_i < t_p(f) \sqrt{c_{ii} s^2(\bar{y})}. \quad (3)$$

Здесь $t_p(f)$ - коэффициент Стьюдента для заданной достоверности P и числа степеней свободы $f = N(K-1)$ (например, для $P = 95\%$ и $N = 16, K = 3$ $t_{0.95} = 2.04$), $c_{ii} = 1/N$. Адекватность модели без квадратичных членов (I) проверяется сравнением величины y_0 (дополнительный опыт $X_i = 0$) со значением коэффициента a_0 . Если число повторностей этого дополнительного опыта равно K_0 и выполняется неравенство

$$|y_0 - a_0| < t_p(f) \sqrt{\left(\frac{1}{N} + \frac{1}{K_0}\right) s^2(\bar{y})},$$

то уравнение (I) адекватно описывает целевую функцию внутри области планирования. При числе факторов $I \geq 4$ проверку значимости коэффициентов можно провести также с помощью графического метода Даниела /5/. Применение последнего позволяет отказаться от дублирования опытов.

№ варианта	Уровни факторов				\bar{y}_n	Схема Иейтса				Члены ур-ния (I)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		Шаг 1	Шаг 2	Шаг 3	Шаг 4		
1	-I	-I	-I	-I	\bar{y}_1	$E_1 = \bar{y}_1$	$+y_2$	$C_1 = E_1 + E_2$	$B_1 = C_1 + C_2$	$A_1 = B_1 + B_2$	a_0
2	+I	-I	-I	-I	\bar{y}_2	$E_2 = \bar{y}_3$	$+y_4$	$C_2 = E_3 + E_4$	$B_2 = C_3 + C_4$	$A_2 = B_3 + B_4$	$a_1 X_1$
3	-I	+I	-I	-I	\bar{y}_3	$E_3 = \bar{y}_5$	$+y_6$	$C_3 = E_5 + E_6$	$B_3 = C_5 + C_6$	$A_3 = B_5 + B_6$	$a_2 X_2$
4	+I	+I	-I	-I	\bar{y}_4	$E_4 = \bar{y}_7$	$+y_8$	$C_4 = E_7 + E_8$	$B_4 = C_7 + C_8$	$A_4 = B_7 + B_8$	$a_{12} X_1 X_2$
5	-I	-I	+I	-I	\bar{y}_5	$E_5 = \bar{y}_9$	$+y_{10}$	$C_5 = E_9 + E_{10}$	$B_5 = C_9 + C_{10}$	$A_5 = B_9 + B_{10}$	$a_3 X_3$
6	+I	-I	+I	-I	\bar{y}_6	$E_6 = \bar{y}_{11}$	$+y_{12}$	$C_6 = E_{11} + E_{12}$	$B_6 = C_{11} + C_{12}$	$A_6 = B_{11} + B_{12}$	$a_{13} X_1 X_3$
7	-I	+I	+I	-I	\bar{y}_7	$E_7 = \bar{y}_{13}$	$+y_{14}$	$C_7 = E_{13} + E_{14}$	$B_7 = C_{13} + C_{14}$	$A_7 = B_{13} + B_{14}$	$a_{23} X_2 X_3$
8	+I	+I	+I	-I	\bar{y}_8	$E_8 = \bar{y}_{15}$	$+y_{16}$	$C_8 = E_{15} + E_{16}$	$B_8 = C_{15} + C_{16}$	$A_8 = B_{15} + B_{16}$	$a_{123} X_1 X_2 X_3$
9	-I	-I	-I	+I	\bar{y}_9	$E_9 = \bar{y}_2$	$-y_1$	$C_9 = E_2 + E_1$	$B_9 = C_2 + C_1$	$A_9 = B_2 + B_1$	$a_4 X_4$
10	+I	-I	-I	+I	\bar{y}_{10}	$E_{10} = \bar{y}_4$	$-y_3$	$C_{10} = E_4 - E_3$	$B_{10} = C_4 - C_3$	$A_{10} = B_4 - B_3$	$a_{14} X_1 X_4$
11	-I	+I	-I	+I	\bar{y}_{11}	$E_{11} = \bar{y}_6$	$-y_5$	$C_{11} = E_6 - E_5$	$B_{11} = C_6 - C_5$	$A_{11} = B_6 - B_5$	$a_{24} X_2 X_4$
12	+I	+I	-I	+I	\bar{y}_{12}	$E_{12} = \bar{y}_8$	$-y_7$	$C_{12} = E_8 - E_7$	$B_{12} = C_8 - C_7$	$A_{12} = B_8 - B_7$	$a_{124} X_1 X_2 X_4$
13	-I	-I	+I	+I	\bar{y}_{13}	$E_{13} = \bar{y}_{10}$	$-y_9$	$C_{13} = E_{10} - E_9$	$B_{13} = C_{10} - C_9$	$A_{13} = B_{10} - B_9$	$a_{34} X_3 X_4$
14	+I	-I	+I	+I	\bar{y}_{14}	$E_{14} = \bar{y}_{12}$	$-y_{11}$	$C_{14} = E_{12} - E_{11}$	$B_{14} = C_{12} - C_{11}$	$A_{14} = B_{12} - B_{11}$	$a_{134} X_1 X_3 X_4$
15	-I	+I	+I	+I	\bar{y}_{15}	$E_{15} = \bar{y}_{14}$	$-y_{13}$	$C_{15} = E_{14} - E_{13}$	$B_{15} = C_{14} - C_{13}$	$A_{15} = B_{14} - B_{13}$	$a_{234} X_2 X_3 X_4$
16	+I	+I	+I	+I	\bar{y}_{16}	$E_{16} = \bar{y}_{16}$	$-y_{15}$	$C_{16} = E_{16} - E_{15}$	$B_{16} = C_{16} - C_{15}$	$A_{16} = B_{16} - B_{15}$	$a_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4$

Для успеха последующего "крутого восхождения" весьма важно чтобы коэффициенты α_i в уравнении (I) были одного порядка. Этого можно добиться подходящим выбором шагов варьирования. Первоначально выбранные величины Δ_i апробируются в прикидочном, без повторностей, многофакторном эксперименте (тот же ПФЭ 2^r или его дробные реплики), по результатам которого проводится необходимая коррекция.

Второй этап метода Бокса-Уилсона - собственно "крутое восхождение". Чтобы осуществить движение в направлении оптимума, необходимо рассчитать направление градиента и определить величину шага до следующего опыта. Сначала выбирают шаг λ_m для фактора x_m с минимальным произведением $a_m \Delta_m$. Целесообразно, чтобы величина λ_m имела тот же порядок, что и соответствующий шаг варьирования Δ_m в ПФЭ. В случае неадекватности линейного приближения следует взять $\lambda_m < \Delta_m$. Далее вычисляют нормированный шаг $\lambda = \lambda_m / (a_m / |a_m|)$ и находят координаты опытов в направлении градиента по формуле

$$x_i^{(l)} = x_{i0} + l \lambda \Delta_i \alpha_i, \quad l = 1, 2, \dots$$

Все опыты крутого восхождения также ставятся одновременно. "Восхождение" считается удачным, если хотя бы один опыт серии дал результат лучший, чем в ПФЭ.

Лучший опыт "крутого восхождения" теоретически следует принять за новый отправной пункт для дальнейшего приближения к оптимуму, поставив эксперимент, дающий новое локальное описание целевой функции в виде (I). Практика показывает, однако, что целесообразнее сразу ставить эксперимент по какому-либо плану второго порядка, так как уже первое крутое восхождение обычно приводит в область, достаточно близкую к оптимуму (если имеющиеся в системе взаимодействия не слишком существенны). Единицы варьирования в этом опыте выбираются с учетом предыдущих результатов. Полученное квадратичное описание целевой функции позволяет предсказать оптимум (или частный оптимум) без дальнейших опытов, либо продолжить "восхождение", если квадратичные эффекты малы, а линейные еще существенны.

Применяя планы для моделей, не содержащих взаимодействия высших порядков

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j, \quad (4)$$

можно получить приемлемое число опытов, не уменьшая числа варьируемых факторов. Для $\Gamma = 3, 4, 5$ хорошие статистические свойства имеют планы типа B_Γ (число опытов соответственно 14, 24, 42 против 27, 81, 243 для ПФЭ 3^Γ). Планы B_Γ имеют лучшие характеристики и по сравнению с соответствующими ротатабельными планами и ортогональными планами Бокса /2/.

План типа B строится как план ПФЭ 2^Γ , дополненный 2Γ опытами, в каждом из которых один из факторов установлен на уровне -1 или $+1$, а остальные на уровне 0. Например, в случае 4-х факторов к плану, представленному в табл. 1 (строки 1-16), следует добавить еще 8 опытов табл. 2.

Таблица 2

Дополнение плана ПФЭ 2^4 до плана B_4

№ опытов	x_1	x_2	x_3	x_4
17	-1	0	0	0
18	+1	0	0	0
19	0	-1	0	0
20	0	+1	0	0
21	0	0	-1	0
22	0	0	+1	0
23	0	0	0	-1
24	0	0	0	+1

Статистическая обработка результатов, полученных по плану B_Γ , относительно трудоемка, однако для $\Gamma = 3, 4, 5$ вполне может быть проведена с помощью микрокалькулятора.

Коэффициенты уравнения (4), представленные как вектор-столбец $A = (a_0, a_1, \dots)$, находятся по формулам

$$A = C(F'Y), \quad C = (F'F)^{-1}$$

где F - матрица плана, дополненная слева столбцом из единиц и справа столбцами из значений произведений факторов в том же порядке как они расположены в (4), Y - вектор-столбец экспериментальных (средних) значений целевой функции Y . Пример расчета можно найти в монографии /2/, там же приведены матрицы C для $J = 4, 5, 6$, значение которых существенно уменьшает объем вычислений.

Проверка значимости коэффициентов производится по той же формуле (3), с той лишь разницей, что теперь элементы c_{ii} матрицы C отличны от N^{-1} ; дисперсию среднего $s^2(\bar{y})$ можно взять из предыдущих опытов (ПФЭ).

Адекватность полученной модели подтверждается выполнением неравенства

$$\frac{\sum (y_n - \bar{y}_n)^2}{f_1 s^2(\bar{y})} < F_p(f_1, f)$$

где y_n - значение, получаемое по уравнению (4),

$F_p(f_1, f)$ - значение критерия Фишера.

Координаты "теоретического" оптимума, если он существует, находится по формуле

$$x_i = - \frac{a_i}{2a_{ii}}$$

Литература

1. Максимов В.Н., Федоров В.Д. "Применение методов математического планирования экспериментов при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов" - М.: МГУ, 1969. - 236 с.
2. Хартман К., Лецкий Э., Шефер В. Планирование экспериментов в исследовании технологических процессов - М.: Мир, 1977. - 552 с.
3. Знаменская Л.В., Паэгле Б.Я., Клейнер Г.И., Краснов С.И. и Лещинская И.Б. Микробиология, 1980 49, - 722.

4. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планировке эксперимента.: МГУ им. А. А. Жданова, 1975, -76 с.

5. Максимов В. Н. Многофакторный эксперимент в биологии.-М.: МГУ, 1960.-280 с.

Матюшкова Н.А., Калинина Л.Н.
ЛГУ им. П.Стучки

Изучение стабильности плазмид группы pBR в
некоторых штаммах *Escherichia coli*

Одной из наиболее важных характеристик штаммов микроорганизмов, создаваемых генноинженерными методами, является стабильность получаемых систем: внедренный рекомбинантный генетический материал - клетка бактерии (хозяин).

Плазмиды группы pBR получены в результате рекомбинации *in vitro* производной плазмиды Col EI-pMB9 и ампициллинового транспозона Tn A. Эти плазмиды в настоящее время широко используются в качестве векторных молекул для доставки и обеспечения функционирования чужеродного генетического материала в клетках *Escherichia coli* (1). Плазмиды группы pBR несут легкодетектируемые по фенотипическому выражению гены устойчивости к различным антибиотикам. Элиминация плазмид из клеток бактерий приводит к утрате внехромосомальных маркеров антибиотикоустойчивости. Определяя число антибиотико-чувствительных клеток в штамме, несущем плазмиду антибиотикоустойчивости, можно характеризовать стабильность данной плазмиды. Процент плазмидных клеток обычно определяют путем клонального анализа штамма, выращенного в неселективных условиях. Анализ проводят через определенное число пересевов (2), клеточных поколений (3) или в ранней стационарной фазе (4). Эти методы удобны для получения сравнительных данных, позволяют характеризовать стабильность плазмиды в данном штамме, но не дают количественной характеристики процесса элиминации плазмид. По фенотипическому выражению в селективных условиях потеря клеткой плазмиды антибиотикоустойчивости равноценна появлению мутации, приводящей к нежизнеспособности (при бактерицидном действии селективирующего антибиотика), или к неспособности размножаться (при бактериостатическом действии антибиотика).

Мы предлагаем использовать для объективной оценки стабильности плазмид показатель частоты их элиминации на клетку за генерацию, определяемый по аналогии с общепринятым показателем частоты мутации (5).

Используя метод клонирования после определенного числа пересевов в неселективных условиях и предложенный нами метод определения частоты элиминации плазмид на клеточную генерацию, определяли стабильность плазмид группы pBR в некоторых штаммах *E. coli*.

Материал и методика

В работе использовались плазмидные штаммы RR I (F^{-} pro leu thi lac y Str^R r_k⁻ m_k⁻), содержащие плазмиды pBR 313 (6), pBR 322 (7) несущие гены, определяющие устойчивость к тетрациклину (Tc^R) и ампициллину (Ap^R) и pBR 325 (8) несущую гены, определяющие устойчивость к тетрациклину, ампициллину и хлорамфениколу (Cm^R), а также бесплазмидные штаммы RR I, MM 294, HB 101 (F^{-} pro leu thi lac y Str^R r_k⁻ m_k⁻ Endo I⁻ rec A⁻) HB 129 (Endo I⁻ r_b⁻ m_b⁻ gal lac Str^R), в которые плазмиды вводили путем трансформации.

Штаммы выращивали на среде LB (9). Для получения селективных сред в LB добавляли антибиотики: тетрациклин и хлорамфеникол в концентрации 25 мкг/мл, ампициллин - 100 мкг/мл. Трансформацию проводили методом удлинённой инкубации в CaCl₂ (10) с некоторыми модификациями (11).

Плазмидную ДНК выделяли методом Герри (12).

Электрофорез плазмидной ДНК проводили в 1% агарозном геле в трис-фосфатном буфере (13).

Стабильность плазмид в изучаемых штаммах определяли двумя методами.

1. Метод последовательного пересева плазмидного штамма в неселективных условиях.

Клон, устойчивый к данным антибиотикам, многократно последовательно пересевался на неселективной среде и через определенное число пересевов субклоновая культура анализировалась на наличие клеток, потерявших плазмидные маркеры антибиотикоустойчивости, путем клонирования на неселективной среде и последующих отпечатков на селективные среды.

2. Определение частоты элиминации плазмиды на клетку за генерацию.

Плазмидный штамм выращивался на селективной среде, содержащей 25 мкг/мл тетрациклина. Тетрациклин в данной концентрации об-

ладает бактериостатическим действием. Поэтому для определения частоты элиминации плазмиды на клетку за генерацию (а) применима формула используемая для определения частоты появления нежизнеспособных мутантов на клетку за генерацию, выведенная на основе анализа нарастания концентрации таких мутантов в популяции (5).

$$a = r \ln 2 \quad , \text{ где}$$

r - частота встречаемости мутантов; $r = \frac{M}{N}$, M - количество мутантных клонов, N - количество анализируемых клонов.

Для определения r штамм, выращенный на среде с тетрациклином, клонировался на неселективной среде. Полученные клоны отпечатывались на среды, содержащие и не содержащие антибиотики, устойчивость к которым определяется плазмидой. При сравнении отпечатанных колоний (N), выявлялись колонии, потерявшие фенотипический маркер плазмиды (M).

Результаты и обсуждение

Определение частоты элиминации плазмид рВR 313, 322 и 325 в штамме RR I при его культивировании в селективных условиях показало, что наименьшая стабильность характерна для рВR 313: $2,7 \cdot 10^{-2}$ элиминаций на клетку за генерацию (табл. I).

Данные, полученные методом сравнительного анализа при последовательных пересевах плазмидных штаммов RR I в неселективных условиях, также показали, что наиболее быстро из *E. coli* RR I исчезают фенотипические маркеры рВR 313. После одного пересева штрихами на агаризованой среде LB , где культура росла 18 часов, только 21,8% клеток штамма сохранили оба маркера антибиотикоустойчивости рВR 313. За это время культура *E. coli* проходит примерно 30 циклов деления. При этом из каждых 100 клеток посевного материала вырастают 10^{II} потомков. Используя формулу для подсчета накопления мутантов при последовательных делениях растущей культуры

$$M = g^{2^g} N_{0m} (B), \text{ где}$$

M - число мутантов в культуре, g - число циклов деления, N_0 - исходное число клеток и m - частота появления мутантов (в нашем случае частота элиминации плазмиды), можно подсчитать теоретически ожидаемое количество бесплазмидных клеток в популяции. Для плазмиды рВR 313 это равняется $30 \cdot 10^{II} \cdot 2,7 \cdot 10^{-2} = 8,1 \cdot 10^{10}$ клеток или около 81% популяции, что хорошо коррелирует с полученными

Таблица I

Стабильность плазмид в штамме RR I

Плазмиды	Условия выращивания плазмидного штамма		
	неселективные		селективные
	%плазмидных клонов после 1-го пересева	%плазмидных клонов после 6-го пересева	частота элиминации (элиминация/генерация)
pBR 313	21,8	0,0	$2,7 \cdot 10^{-2}$
pBR 322	100,0	61,0	$1,5 \cdot 10^{-3}$
pBR 325	100,0	95,5	$1,2 \cdot 10^{-3}$

Таблица 2

Сравнительная стабильность pBR 313 в некоторых штаммах *Escherichia coli*

№ пересева	Маркер	Штамм			
		RR I'	MM 294	HB 129	HB 101
1	Ap ^R	89,7	95,5	100,0	100,0
	Tc ^R	75,9	95,5	100,0	100,0
3	Ap ^R	32,2	99,4	100,0	100,0
	Tc ^R	30,6	94,8	99,4	100,0

В таблице приведен процент клонов, сохранивших данный маркер антибиотикоустойчивости, от числа клонов, растущих на неселективной среде.

ми в эксперименте данными - 78.2%(табл.1). Аналогично рассчитывая теоретически ожидаемое число бесплазмидных клеток в штамме RR I, несущих рВR 322 и 325 через 30 циклов деления, получаем соответственно 4,5 и 3,6 клеток на 100 в популяции. Учитывая число проанализированных клонов (200-300) вполне вероятно, что бесплазмидные клетки не попали в выборку(табл.1). Результаты, полученные последовательными пересевами плазмидных штаммов в неселективных условиях, подтверждают правомерность предлагаемого нами критерия частоты элиминации плазмид на клетку за генерацию.

Для выяснения влияния клетки-хозяина на стабильность плазмиды рВR 313, очищенную ДНК этой плазмиды путем трансформации переносили в другие штаммы *E.coli*, в том числе и в исходно бесплазмидный штамм RR I, обозначенный нами как RR I*. Было обнаружено, что по сравнению с исходно плазмидным *E.coli*, рВR313 более стабильна во всех изученных нами штаммах (табл.2). В штаммах НВ101 и I29 после трех пересевов на неселективной среде не удалось обнаружить субклонов, потерявших устойчивость к ампициллину. Антибиотикоустойчивые субклоны этих штаммов были обнаружены при увеличении количества пересевов на неселективной среде(табл.3). Наиболее стабильна плазмида в штамме НВ101, который отличается от остальных штаммов отсутствием *rec A* системы.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии свойств штамма-хозяина на стабильность плазмиды рВR 313. Одним из факторов стабилизации, по-видимому, является отсутствие в штамме-хозяине *rec A* системы. Снижение частоты элиминации в штаммах, неотличающихся по *recA* системе от RR I предполагает наличие и других факторов стабилизации.

Плазмиды группы рВR несут одновременно несколько маркеров антибиотикоустойчивости. Процесс элиминации в неселективных условиях роста был прослежен нами для каждого из них в отдельности. Характерной особенностью плазмиды рВR 313 является большая вероятность потери фенотипического маркера тетрациклиноустойчивости по сравнению с маркером ампициллиноустойчивости. В меньшей степени это свойственно и плазмиде рВR 322(табл.4). Для рВR325 не найдено клонов потерявших устойчивость к одному или к двум антибио-

Таблица 3

Сравнительная стабильность рВРЗ13 в штаммах
 MB I29 и MB IOI E.coI₁

№ пере- сева	Штаммы	% клонов, сохранивших маркер устойчивости			
		I	Ap	I	Tc
1.	HB I29	100			100
	HB IOI	100			100
2.	HB I29	100			99.7
	HB IOI	-			-
3.	HB I29	100			99.4
	HB IOI	100			100
4.	HB I29	100			96.0
	HB IOI	-			-
5.	HB I29		97.0		66.5
	HB IOI	100			100
6.	HB I29		64.3		51.8
	HB IOI	-			-
7.	HB I29		49.2		27.7
	HB IOI		92.0		88.0
8.	HB I29		27.1		10.0
	HB IOI	-			-
9.	HB I29		4.3		1.4
	HB IOI		56.0		44.0

Таблица 4

Элиминация плазмидных маркеров антибиотикоустойчивости при многократных пересевах на среде L В (клоны, сохранившие маркер в % от растущих на среде L В)

№ пересева	Маркер	Плазмида		
		pBR 313	pBR 322	pBR 325
1.	Ap	58,2	100	100
	Tc	21,8	100	100
3.	Ap	1,3	77,5	99,39
	Tc	1,3	77,5	99,39
6.	Ap	0	63,0	95,49
	Tc	0	61,0	95,49

Таблица 5

Элиминация маркеров антибиотикоустойчивости pBR 325 при многократных пересевах на селективной среде

№ пересева	% клонов, сохранивших маркер устойчивости		
	Ap	Tc	C
1.	100	100	100
3.	99,4	99,4	99,4
4.	97,4	97,4	97,4
6.	95,5	95,5	95,5
7.	88,9	88,9	88,9
8.	80,6	80,6	80,6
10.	55,6	55,6	55,6

тикам. Все три фенотипических маркера плазмиды терялись одновременно (табл. 5). Эти результаты указывают на сложность и разнообразность молекулярного механизма элиминации плазмид группы pBR из клеток *E. coli*.

Дополнительным контролем фенотипического проявления плазмид служил электрофоретический анализ осветленных лизатов отдельных клонов, который во всех случаях подтвердил отсутствие плазмидной ДНК при потере клонами всех внехромосомных маркеров антибиотикоустойчивости.

Потеря клонами только фенотипического маркера тетрациклиноустойчивости сопровождалась уменьшением электрофоретической подвижности плазмидной ДНК или рядом изменений её физических свойств. Природа этих изменений будет выявляться с помощью рестрикционного анализа.

Выводы

1. Разработан метод количественной оценки элиминации плазмид антибиотикоустойчивости на клетку за генерацию и этим методом оценена стабильность плазмид серии pBR в штамме RR I *E. coli*.
2. Стабильность плазмид группы pBR в штамме RR I *E. coli* увеличивается в следующем порядке: pBR 313, pBR 322, pBR 325.
3. Плазмида pBR 313 стабилизируется в штаммах НВ 129 и особенно в НВ 101 (гес А⁻) *E. coli*.
4. Для плазмиды pBR 313 характерна частая потеря плазмидного маркера тетрациклиноустойчивости без элиминации плазмидного генома.

Литература

1. Поляновский О. Л., Носиков В. В. Рестрикционные эндонуклеазы в генетической инженерии. - Биологическая химия. - М., 1978, том 14.
2. Ермоленко З. М. Тез. докл. IV рабочего совещания по программе "Плазмида". - Тарту, 1979, с. 60.
3. Varth P. T., Hilary R., Naomi D. - J. Bacteriol. 1978, 135, 760.
4. Щукин Н. Н. Тез. докл. IV рабочего совещания по программе "Плазмида". - Тарту, 1979, с. 163.
5. Захаров И. А., Квитко К. В. Генетика микроорганизмов. Л., 1967, с. 242.

6. Bolivar F., Rodriguez R.L., Beatlach M.C., Boyer H.W.-Gene, 1977, 2, 75.
7. Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.I., Batloch M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crassa I.H., Falkow S.-Gene, 1977, 2, 95.
8. Bolivar F.-Gene, 1978, 4, 121.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976-436 с.
10. Dagert M., Enrllich S.D.-Gene, 1979, 6, 23.
11. Матюшкова Н.А., Макаренкова Г.И. Условия трансформации некоторых штаммов *E. coli* дезоксирибонуклеиновой кислотой плазмид группы рН^R *
12. Guerry P., Le Blanc, Falkows-J. Bacteriol., 1973, 116, 1064.
13. Loening E.-Biochem. J., 1969, 113, 131.
14. Захаров И.А. Курс генетики микроорганизмов. Минск: Высшейшая школа, 1978-190 с.

* в настоящем сборнике

Условия трансформации некоторых штаммов
Escherichia coli дезоксирибонуклеиновой
кислотой плазмид группы ρ VR

Введение в клетку бактерий чужеродного гена в составе гибридной молекулы ДНК путем трансформации или трансфекции, является обязательным этапом в работах по генной инженерии.

В отличие от других трансформабельных видов бактерий, *E. coli* приобретает состояние компетентности — способность адсорбировать и поглощать ДНК (1), только в результате действия дополнительных факторов. К таким факторам относятся, например, обработка клеток бактерий хлористым кальцием (2) и замораживание-оттаивание клеток (3). Мандель и Хига (2) впервые произвели трансфекцию на клетках *E. coli*, обработанных хлористым кальцием. В настоящее время различные модификации "кальциевого метода" широко используются для плазмидной трансформации (4,5,6). Наиболее высокая эффективность трансформации получена методом Дагерта и Эрлиха (5).

Эффективность трансформации в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей штамма-реципиента *E. coli*. Уровень трансформации некоторых штаммов можно повысить, действуя добавочными факторами и меняя условия трансформации (7).

Влияние целого ряда факторов на эффективность трансформации было исследовано для специфического, созданного для генно-инженерных исследований, штамма *E. coli* XI776, отличающегося пониженной выживаемостью (6)

Нами изучалась эффективность трансформации штаммов С600, MM294, НВ101, НВ129, ρ R I и влияние на нее условий трансформации дезоксирибонуклеиновой кислотой плазмид группы ρ VR.

Материал и методика

В качестве реципиентов для плазмидной ДНК использовали широко применяемые в генной инженерии штаммы (табл. I).

Культуру для трансформации выращивали в среде LB (8). Трансформаты выделяли на агаризированной LB с добавлением антибиотиков: тетрациклина 25 мкг/мл, ампициллина 100 мкг/мл, хлорам-

феникола (левомицетина) - 25 мкг/мл среды.

ДНК выделяли из плазмидных штаммов RR I методом Гуерри и сотрудников (9). Очистку плазмидной ДНК, полученной методом Гуерри, от примесей РНК и хромосомальной ДНК проводили хроматографией на гидроксилapatит (10).

Таблица I
Штаммы-реципиенты *E. coli*, использованные
для трансформации

№ п/п	Штамм	Генотип
1	RR1	F ⁻ pro leu thi lac ⁺ Y Str ^R r _k ⁻ m _k ⁻ Endo I ⁻
2	MM 294	-
3	HB 129	Endo I ⁻ r _B ⁻ m _B ⁻ gal lac Str ^R
4	HB 101	F ⁻ pro leu thi lac ⁺ Y Str ^R r _k ⁻ m _k ⁻ Endo I ⁻ rec A ⁻
5	C600	thr ⁻¹ leu-6 thi-1 sup. E 41 lac ⁺ l ton A2

Плазмиды pBR 313 и 322 селекционируются по фенотипическим маркерам тетрациклин- и ампицилин устойчивости (Tc^R, Ap^R), pBR 325 несет дополнительный маркер хлорамфеникол (левомицетин) устойчивости (Sm^R)

Основой наших методов трансформации служил метод Дагерта и Эрлиха (5), характерной особенностью которого, по сравнению с другими, "кальциевыми методами", является длительная, в течение 24 часов, инкубация клеток в хлористом кальции.

Мы варьировали условия трансформации, изменяя параметры метода: объем вносимого инокулята при выращивании клеток на среде LB, оптическую плотность трансформируемой культуры, время инкубации в хлористом кальции, объем суспензии, высеваемой на селективные среды, а также вводя дополнительные этапы охлаждения - нагревания.

Для анализа трансформантов на наличие маркеров антибиотикоустойчивости использовали метод отпечатков на селективные среды, содержащие антибиотик.

Эффективность трансформации определяли как число трансформантов, полученных на 1 мкг ДНК. Частоту трансформации выражали процентом трансформированных клеток от общего числа жизнеспособных клеток, к которым добавлялась плазмидная ДНК.

В связи с тем, что не всегда эксперименты проводятся в оптимальных для трансформации условиях, за частоту трансформации принимали относительную трансформацию (%) равную проценту от максимальной трансформации в каждом эксперименте (5).

Статистическая обработка данных по влиянию количества высеваемой суспензии и выделению трансформантов на различных селективных средах проводилась путем сравнения совокупностей с попарно сопряженными вариантами.

Сравнение результатов сводилось к расчету средней разности каждой пары вариант и далее к определению границы доверительного интервала средней по формуле

$$\bar{X} \pm W_n \cdot K_{w99}, \text{ где}$$

\bar{X} - средняя разность каждой пары вариант,

W_n - размах варьирования

K_{w99} - коэффициент для расчета границ доверительного интервала средних по размаху варьирования для уровня достоверности 99%.

При доверительном интервале не включающем нуль, различие в результатах при различных условиях опыта можно считать доказанным (10).

Результаты и обсуждение.

Изучаемые штаммы *E. coli* различаются по эффективности трансформации (табл.2). К хорошо трансформируемым, относятся штаммы RR1, MM294, NB 129, хуже трансформируется штамм NB101. Штамм С600 выделяется значительно пониженной эффективностью трансформации, хотя по литературным данным он известен как хорошо трансформируемый (5).

Таблица 2

Максимальная эффективность трансформации для некоторых штаммов *E. coli* посредством ДНК плазмиды pBR 322.

Штамм	Трансформанты/мкг ДНК
RR I	2,4 . 10 ⁷
MM 294	2,0 . 10 ⁷
HB 129	1,0 . 10 ⁷
HB 101	2,3 . 10 ⁶
C 600	2,0 . 10 ⁴

В некоторых опытах эффективность трансформации была значительно ниже максимальной, хотя трансформация проводилась с соблюдением всех параметров, предусмотренных методикой. Это, по-видимому, объясняется вариабильностью каких-то неконтролируемых условий трансформации. Отсутствие постоянной эффективности трансформации в серии опытов отмечалось и для штамма XI776 (6).

Изменение некоторых параметров трансформации, позволило выявить их влияние на эффективность.

Условия выращивания культуры

Уменьшение объема начального инокулята, выращиваемой для трансформации культуры приводит к увеличению эффективности трансформации (табл.3). По-видимому, при заражении большим количеством инокулята вносится больше погибших клеток, ингибирующих развитие компетентной культуры.

Таблица 3

Зависимость эффективности трансформации *E. coli* RR I плазмидной ДНК pBR 322 от объема начального инокулята (клеточная суспензия: среда LB)

№ п/п	Объем начального инокулята	Трансформанты/мкг ДНК
1	I: 100	3,4 . 10 ⁶
2	I: 200	4,7 . 10 ⁶
3	I: 1000	1,3 . 10 ⁷

Определение оптимальной оптической плотности культуры, выращиваемой для трансформации, показало, что максимального значения частота трансформации достигает при $OD_{540}=0,21-0,26$ (квета 3,08 мм) (рис.1).

Это несколько выше оптической плотности рекомендуемой в данной методике (5). Однако при этой оптической плотности культуры также находится на ранней логарифмической стадии роста.

Влияние длительной инкубации в $CaCl_2$

Увеличение времени инкубации клеток в хлористом кальции до 24 часов повышает эффективность трансформации (табл.4), что согласуется с данными Дагерта и сотрудников, полученными на других штаммах (5).

Таблица 4

Зависимость эффективности трансформации *E. coli* RRI плазмидной ДНК pBR 322 от времени инкубации в 0,1 М $CaCl_2$

Время инку- бации в $CaCl_2$ (час)	Трансформанты/мл	Клетки/мл	% трансформантов
1	$4,5 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^8$	$1,97 \cdot 10^{-3}$
3	$7,2 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^8$	$3,13 \cdot 10^{-3}$
17	$10,6 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^8$	$5,05 \cdot 10^{-3}$
24	$13,7 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^8$	$12,50 \cdot 10^{-3}$

Высев трансформированных клеток на селективные среды

При изучении экспрессии трансформантов на селективных средах, содержащих ампициллин или тетрациклин, было показано, что различия в экспрессии недостоверны (табл.5).

относительная
трансформация
(%)

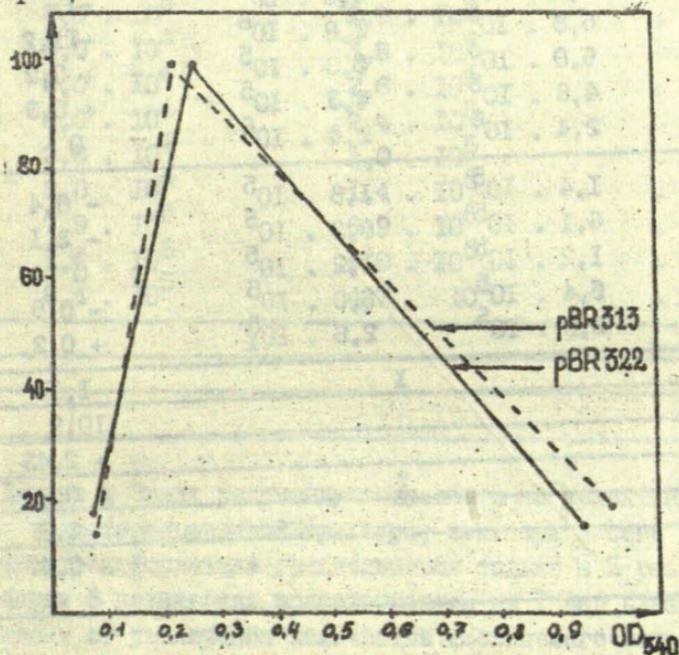


Рис. I. Влияние оптической плотности на частоту трансформации штамма RR1 E.coli

Таблица 5

Сравнительная экспрессия трансформантов штамма RR I
E. coli на селективных средах с ампициллином и
тетрациклином.

ДНК плазмиды	№ варианты	Трансформанты/мкг ДНК		Разность парь вариант (x)
		Селективные среды		
		Tc	Ap	
pBR 322	I	$1,8 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	0
	2	$3,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	-I
	3	$6,8 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^6$	-II,2
	4	$6,0 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$	+ 0,2
	5	$4,6 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^5$	+ 0,3
	6	$2,4 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	0
pBR 313	I	$1,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	- 0,4
	2	$6,1 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^5$	- 2,1
	3	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	0
	4	$5,4 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	- 0,6
	5	$2,8 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	+ 0,2
pBR 322			X	-I,17
				10,9
pBR 313				+ 2,43
			X	- 0,29
				2,3
				+ 0,47

Таблица 6

Эффективность плазмидной pBR 313 трансформации *E. coli* RR I в зависимости от количества высеваемой клеточной суспензии на селективную среду с тетрациклином

№ вари- анты	Трансформанты/мкг ДНК		Разность пары вариант (x)
	Объем клеточной суспензии в мл.		
	0,01	0,05	
1	4,4 · 10 ⁵	5,1 · 10 ⁵	- 0,7
2	5,8 · 10 ⁵	2,9 · 10 ⁵	+ 2,9
3	8,0 · 10 ⁴	3,8 · 10 ⁴	+ 4,2
4	8,0 · 10 ⁴	2,6 · 10 ⁴	+ 5,4
5	8,0 · 10 ⁴	2,4 · 10 ⁵	- 16
6	2,0 · 10 ⁴	1,0 · 10 ⁵	- 8
7	3,0 · 10 ⁴	1,4 · 10 ⁵	- 11
8	7,9 · 10 ⁵	6,9 · 10 ⁵	+ 1
9	1,6 · 10 ⁶	9,0 · 10 ⁵	+ 7
10	8,4 · 10 ⁵	4,7 · 10 ⁵	+ 3,7
	X		- 1,5
			23
			+ 6,94

Дэгерт и Эрлих рекомендуют высевать на селективную среду 10 мкл трансформированной культуры, т.к. при высеве 100 мкл количество трансформантов увеличивается только в 5 раз. Как видно из таблицы 6 количество трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК не зависит от увеличения количества высеваемого материала до 50 мкл. Так как различия в эффективности трансформации недостоверны, более удобно пользоваться дозой посева 0,05 мл для более точного определения числа трансформантов.

Дополнительный этап нагревания-охлаждения

Введение в методику дополнительного этапа нагревания клеточной суспензии при 37°C - 5 мин, после выдерживания в CaCl_2 , а затем охлаждения при 0°C - 10 мин до добавления плазмидной ДНК, повышает количество трансформантов примерно в 10 раз, даже в опытах с пониженной эффективностью трансформации (рис. 2). Дополнительное нагревание и охлаждение клеточной суспензии после добавления плазмидной ДНК также увеличивает число трансформантов, но в значительно меньшей степени. Введение в опыт двух дополнительных этапов нагревания-охлаждения, напротив, снижает частоту трансформации. Эти закономерности характерны для всех изучаемых в данной работе штаммов. Введение дополнительного этапа нагревания-охлаждения рекомендуется нами как модификация к методу М. Дагерта с целью повышения частоты трансформации.

Надо отметить, что оптимизация трансформации путем изменения выше перечисленных параметров методики, введение добавочного этапа нагревания-охлаждения не помогли добиться превышения максимального уровня эффективности трансформации для каждого из штамма, а только повышали частоту трансформации в конкретных экспериментах.

Выводы

1. Штаммы *E. coli* трансформируются дезоксирибонуклеиновой кислотой плазмид группы pVR с различной эффективностью: наибольшая эффективность трансформации характерна для штамма RR1 I-2,4. 10^7 трансф./мкг - ДНК, наименьшая эффективность для штамма С600 - $2,0 \cdot 10^4$ трансф./мкг ДНК.
2. Показано влияние условий выращивания культуры и времени инкубации культуры в CaCl_2 для трансформации, выделения трансформантов.
3. Введение в методику Дагерта дополнительного этапа нагревания-охлаждения повышает частоту трансформации в 10 раз.

относительная трансформация (%)

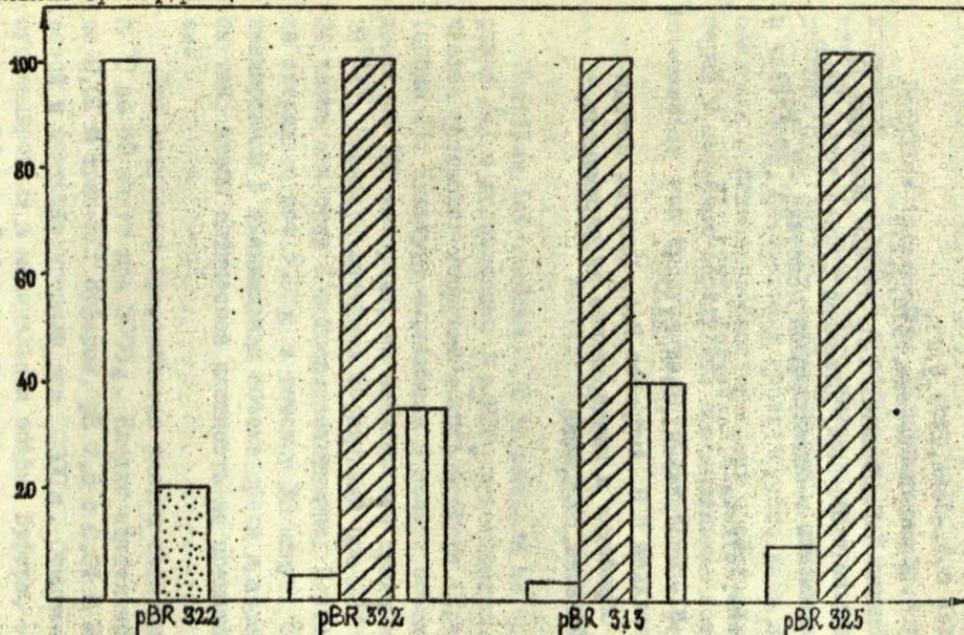


Рис.2. Влияние дополнительного этапа охлаждения-нагревания на трансформацию штамма RR1 *E.coli*

 -отсутствие дополнительного этапа нагревания-охлаждения
 -дополнительный этап охлаждения-нагревания клеточной суспензии

 -дополнительный этап охлаждения-нагревания клеточной суспензии с добавлением плазмидной ДНК
 -2 дополнительных этапа охлаждения-нагревания клеточной суспензии

Литература

1. Прозоров А.А. Генетическая трансформация и трансфекция.- М.:Наука,1980,-248с.
 2. Mandel M., Higa A.-J.Mol.Biol.1970,53,159.
 3. Дитяткин С.Я.,Ильяшенко Б.Н.-Генетика,1974,10,-II5с.
 4. Cohen S.,Chang A.,Hsu L.-Proc.Nat.Acad.Sci USA,1972,69,2110.
 5. Dagert M.,Ehelich S.D.-Gene,1979,6,23.
 6. Norgart M.,Keem K.,Monahan J.-Gene,1978,3,279.
 7. Рудченко О.Н.,Левина Н.Б.,Никитин А.Н. Тезисы докладов IV рабочего совещания по программе "Плазмида",Тарту,1979,-125с.
 8. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.-М.:Мир, 1976,-436с.
 9. Guerry P.,Le Blane,Falkows-J.Bacteriol.,1973,116,1064.
 10. Colman A.,Eyer H.-Eur.J.Bioch.,1978,91,303.
- II. Ашмарин И.П.,Васильев Н.Н.,Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов,- Л.:ЛГУ им.А.А.Жданова,1971,-76с.

Шарипова Ф.Р., Филатова С.В., Коробкова В.Д.
КТУ им. В.И. Ульянова-Ленина

Получение сферопластов и исследование
внутриклеточного пула белков и ферментов
Bacillus intermedius 7P

Bacillus intermedius 7P привлекает к себе внимание исследователей как активный продуцент внеклеточной щелочной рибонуклеазы /1,2,3/. Нам представляется интересным провести исследование ряда внутри- и внеклеточных гидролитических ферментов, в частности, фосфатазы и протеазы. Это дает дополнительные сведения о физиолого-биохимических свойствах данного вида бактерий и позволит определить потенциальные возможности *Bac. intermedius* как продуцента внутриклеточных ферментов.

Материалы и методы

Bacillus intermedius 7P выращивали на среде, описанной ранее /4/ с добавлением Na_2HPO_4 в концентрации 10 мг % в качестве источника неорганического фосфора (среда 1) и без него (среда 2). Культуру выращивали в колбах объемом 750 мл, содержащих по 100 мл среды, на качалке при температуре равной $28^{\circ} \pm 1^{\circ}$. Посевной материал выращивали при 28° в течение 12 и 24 часов для сред 1 и 2 соответственно. Клетки центрифугировали стерильно при 3000 г в течение 30 минут. Затем клетки ресуспендировали в минимальном объеме среды и засекали рабочие колбы так, чтобы оптическая плотность не превышала 0,4 - 0,5 опт. ед.

Для получения сферопластов клетки собирали на центрифуге К-70 за 30 минут при 3000 г. Клетки тщательно отмывали от среды 0,01 М трис-НСI буфером, рН 7,5 с 0,01 М MgCl_2 и 20% сахарозой и центрифугировали при 10000 г. Отмытые клетки тщательно суспендировали в минимальном объеме буфера, затем объем довели до 30 мл. Добавляли 2 мл отечественного лизоцима (10 мг в мл), растворенного в этом же буфере. Инкубировали в термостате при 37° в течение 20 минут при постоянном перемешивании.

Превращение клеток в сферопласты контролировали под световым микроскопом. Сферопласты отделяли от периплазматической жидкости центрифугированием при 10000 g 20 минут. Супернатант использовали для определения активностей фосфатазы /5/, протеазы /6/.

Белок определяли методом Лоури /7/ и спектрофотометрически при 280 нм.

Сферопласты разрушали осмотическим шоком. Нуклеиновые кислоты осаждали стрептомицин сульфатом (конечн. конц. 0,7%). Осаждение проводили на холоду в течение 10 минут. 40 минут выдерживали в ледяной бане для формирования осадка. Осадок удаляли центрифугированием при 5000 g за 15 минут. Супернатант сливали и подвергали повторному центрифугированию при 35000 g в течение двух часов. В супернатанте определяли белок и активности ферментов.

Результаты и их обсуждение

При подборе условий для получения сферопластов изучали действие разных концентраций лизоцима 200, 400, 600, 800 мкг на культуру *Bacillus intermedius*. Установлено, что первые сферопласты появляются при концентрации 200 мкг/мл, однако встречаются очень редко — это лишь единичные случаи. При концентрации 400 мкг/мл до 20% клеток превращаются в сферопласты, при 600 мкг/мл — более 50%. Практически полностью культура превращается в сферопласты при концентрации лизоцима 800 мкг/мл.

Выход сферопластов значительно увеличился при повышении температуры инкубационной смеси от 30 до 37⁰, при этом время инкубации сократилось от 60 до 20 минут. В качестве осмотических стабилизаторов использовали 1 М NaCl и 20% сахарозу, причем в присутствии последней сферопласты оказались более стабильны, поэтому в дальнейшем использовали сахарозу.

На рис. I представлены кривые, отражающие динамику роста микроорганизмов на средах 1 и 2. На среде с фосфором экспо-

ненциальная фаза продолжается 12 часов, на среде без фосфора она в 2 раза длиннее, т.е. 24 часа. Из рис. I видно, что на среде I в точке максимального накопления биомассы урожай клеток в 2,5 раза выше, чем на среде 2.

Мы проводили сравнительное изучение внутри- и внеклеточных ферментов гидролитического характера на разных стадиях роста: в середине экспоненциальной фазы (8-й и 12-й час на средах I и 2 соответственно) и в точке, когда культура переходила в стационарную фазу (12-й и 24-й часы на средах I и 2 соответственно).

В табл. I представлены данные по изучению выхода белка из периплазматического пространства в инкубационную смесь после получения сферопластов и белка, полученного в результате лизиса сферопластов. Из таблицы видно, что в экспоненциальной фазе роста выход цитоплазматических белков превышает выход белков периплазмы в среднем в 1,6 раза, в то время как к началу стационарной фазы - в среднем в 3 раза.

В табл. 2 представлены данные по изучению активности щелочной фосфатазы и ее локализации.

Эти ферменты активно секретируются клеткой при дефиците фосфора в среде. На среде, содержащей неорганический фосфор, их выделение сокращается в 10 и более раз. В этом случае их содержание в цитоплазме в 10 раз выше, чем в периплазме.

По-видимому, неорганический фосфор в среде не только репрессирует синтез внеклеточной фосфатазы, но и угнетает процесс секреции фермента из цитоплазмы в периплазму и в среду.

Далее была изучена казеинолитическая активность *Vac. intermedius*. Как видно из табл. 3, активность фермента в большей степени обнаруживается в культуральной жидкости. Очень низкая активность (порядка 5-20 ед/г биомассы) найдена в периплазме и цитоплазме, возможно это связано с ингибирующим влиянием на протеазы собственных белков клетки и какого-то специфического ингибитора.

Биомасса,
опт. ед.

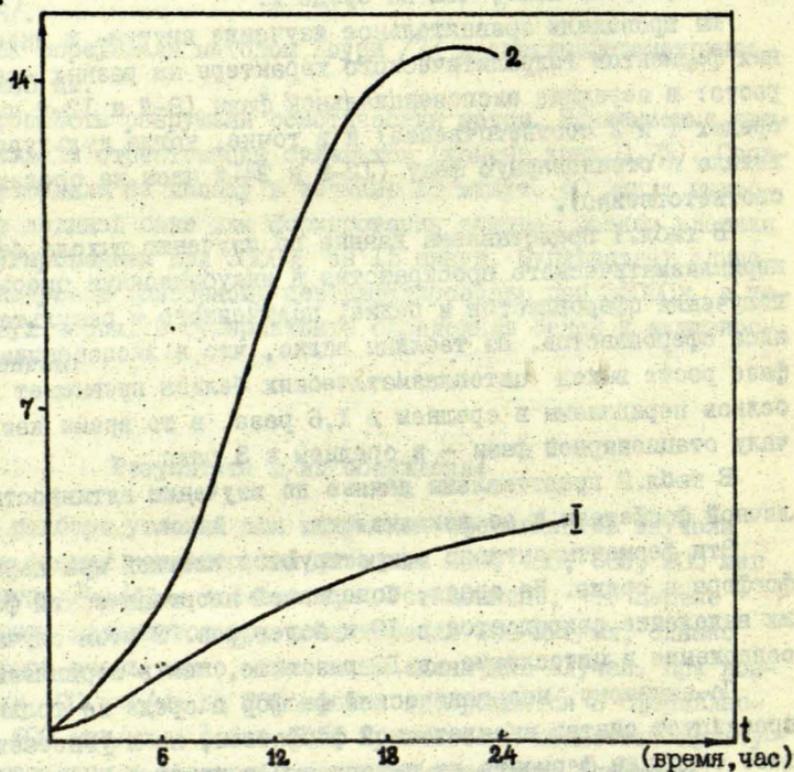


Рис. I. Динамика роста *Bacillus intermedius*

I- на среде без фосфора

2- на среде с фосфором

Таблица I

Содержание периплазматических и цитоплазматических белков в клетке на разных фазах развития культуры, выращенной на средах I и 2

		Среда I		Среда 2	
		Белок Лоури : мг/г массы(бм):	Белок А ₂₈₀ : опт.ед. / г бм	Белок Лоури : мг/г бм :	Белок А ₂₈₀ : опт.ед. / бм
Середина экспоненциальной фазы роста	Белки периплазмы	16	65	26	72
	Белки цитоплазмы	31	64	45	68
Начало стационарной фазы роста	Белки периплазмы	6	35	28	77
	Белки цитоплазмы	50	73	70	134

Таблица 2

Активность внутри- и внеклеточной фосфатазы (рН 8,6)
в середине экспоненциальной и начале стационарной фазы роста
культуры на средах I и 2

	Активность фосфатазы в середине экспоненциальной фазы роста, ед/г биомассы			Активность фосфатазы в начале стационарной фазы роста, ед/г биомассы		
	в КМ	В пери- плазме	В цито- плазме	в КМ	В пери- плазме	В цито- плазме
Среда I	330	98	910	230	81	1000
Среда 2	3300	600	600	3800	360	1100

Таблица 3

Активность внутри- и внеклеточной протеазы (рН 8,5)
в середине экспоненциальной и начале стационарной фазы роста
культуры на средах I и 2

	Активность протеазы в середине экспоненциальной фазы роста, ед/г биомассы (20 часов гидролиза)			Активность протеазы в начале стационарной фазы роста, ед/г биомассы (20 часов гидролиза)		
	В КК	В пери- плазме	В цито- плазме	В КК	В пери- плазме	В цито- плазме
Среда I	1700	5	20	1800	6	20
Среда 2	5600	4	I	4600	I	I

Выводы

1. Оптимальными условиями лизиса клеток середины и конца экспоненциальной фазы роста *Bacillus intermedius* являются концентрация лизоцима - 800 мкг/мл, температура 37°, время инкубации 20 мин.
2. Установлено, что на среде, обогащенной неорганическим фосфатом (Фн), активность щелочной фосфатазы в цитоплазме в 10 раз выше, чем в периплазме. На среде без Фн активность фермента в периплазме и цитоплазме одинакова у клеток середины экспоненциальной фазы роста; у клеток стационарной фазы роста в цитоплазме активность фосфатазы в 3 раза выше, чем в периплазме.
3. Показано, что казеинолитическая активность *Bacillus intermedius* незначительна.

Литература

1. Arhangel'skii G.A. et al. Primary structure of ribonuclease from *Bac. intermedius* 7P. - FEBS Lett., 1979, 97, 1, p. 77.
2. Болотина И.А. и др. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius*. Определение вторичной структуры в растворе методом К.Д. - Биоорганическая химия, 1979, 5, № 2, с. 203.
3. Ханданян А.Ж., Дудкин С.М. Рибонуклеаза *Bac. intermedius*. Исследование состояния тирозина и триптофана с помощью разностных спектров поглощения. - Биоорганическая химия, 1979, 5, № II, с. 1700.
4. Лещинская И.Б. и др. - Прикладная биохимия и микробиология, 1981, 17, с. 241.
5. Whiteley H., Oishi K. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 13, 6.

6. Экспериментальная микробиология/Под ред. С.В. Гурдарова.-
София, 1965, с.240.
7. Lowry O.M., Rossenbrough N.I., Farr A.L., Randall R.J.-
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.

Иващенко М.Е., Эзе Д.И., Шпрунка И.К.
ЛГУ им.П.Стучки

**Разработка иммунологической тест-системы для
детекции ферментативного дезаминирования поли-А**

Модификации первичной структуры полинуклеотидов оказывают существенное влияние на регуляцию различных процессов жизнедеятельности клеток. Например, в результате постсинтетических изменений в структуре мРНК, таких как присоединение последовательности поли-А, укорачивание ее и др., происходит превращение первичного транскрипционного продукта в функционально зрелую мРНК (I-8). Известны также модификации нуклеиновых кислот другого характера - без изменения длины полинуклеотидной цепи, а с образованием так называемых минорных оснований, возникающих в результате ферментативного изменения обычных азотистых оснований (9-11). Однако биологическое значение, а также механизм модификации полинуклеотидов изучены еще недостаточно. Одной из причин этого является отсутствие высокочувствительных, специфичных и быстрых методов определения минорных компонентов в составе нуклеиновых кислот. Разработка таких методов является предпосылкой успешных структурно-функциональных исследований различных классов нуклеиновых кислот.

Нами разработан иммунохимический подход для детекции дезаминированных оснований в составе полинуклеотидов.

Методика

Синтез антигена. Антиген, представляющий собой конъюгат инозина или инозинмонофосфата с белком-носителем, синтезировали по методике Эрлангера и Байсера, предложивших способ конъюгации нуклеозидов и нуклеотидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (12). По этому же методу конъюгировали инозин или инозинмонофосфат с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), который использовали для выделения антител. Соотношение молей нуклеозида или нуклеотида к молям БСА в конъюгате вычисляли по следующей формуле (13)

$$n = \frac{E_{\text{БСА}}^{280} (A_{260}^{\text{нм}} / A_{280}^{\text{нм}}) - E_{\text{БСА}}^{260}}{E^{260} - E^{280} (A_{260}^{\text{нм}} / A_{280}^{\text{нм}})}, \text{ где}$$

n - число связанного нуклеотида или нуклеозида на моль БСА.

A_{260}/A_{280} - отношение поглощения конъюгата при 260 нм к поглощению при 280 нм.

E_{280}^{BCA} и E_{260}^{BCA} - коэффициенты молярной экстинкции BCA при 280 и 260 нм соответственно.

E_{280} и E_{260} - коэффициенты молярной экстинкции нуклеотидов или нуклеозидов при 280 и 260 нм.

Иммунизация кроликов. Для иммунизации кроликов использовали раствор лиофилизированного антигена в концентрации 2 мг/мл. Кроликов породы "Шиншилла", весом 2,0 - 2,5 кг иммунизировали тремя различными дозами антигена: 2000, 750 и 75 мкг/кг веса животного. Первая подкожная инъекция антигена проводилась в смеси с адъювантом Фрейнда (14). Последующие две инъекции делали без адъюванта с недельным интервалом, а через 30-40 дней проводили реиммунизацию кроликов. Пробы крови. Отбор проб крови производили через 7 дней после каждой инъекции из ушной вены кролика. Объем пробы - 5-10 мл. По окончании цикла иммунизации, проводили тотальное обескровливание кролика через сонную артерию.

Выделение антител. Сыворотку крови получали центрифугированием 30 мин при 3000 об/мин. Глобулиновую фракцию сыворотки выделяли высаливанием сульфатом аммония 40%-ного насыщения при 0°. Осадок отделяли центрифугированием 30 мин при 6000 об/мин., растворяли в 0,9% растворе хлористого натрия и диализовали 16 часов на холоду против этого же раствора, после чего центрифугировали 30 мин при 6000 об/мин.

Очистка антител. Очистку антител проводили иммуносорбцией на конъюгате инозина или инозинмонофосфата с ЧСА, присоединенном к активированной цианбромидом сефарозе 4 В (Фармация, Швеция), по методу описанному Макаровой и Гольдфарб (15). Иммуноглобулиновую фракцию сыворотки наносили на колонку (0,7 x 7 см) со скоростью 5 мл/час. Для промывания колонки использовали фосфатный буфер pH 7,5, содержащий 0,15 М хлорид натрия, который пропускали через колонку со скоростью 20-30 мл/час. Антитела элюировали 0,17 М буфером глицин - HCl, pH 2,3. Фракции, содержащие белок, объединяли и диализовали против 0,1 М фосфатного буфера pH 7,5.

Специфичность и активность антисыворотки определяли в реакции двойной радиальной иммунодиффузии в 1,5% агаре (Дадико, США) (16).

О титре антисыворотки судили по конечному разведению антигена, которое еще дает преципитацию с антисывороткой.

Дезаминирование поли-А бесклеточным экстрактом гриба *Penicillium lanoso-viride* исследовали в инкубационной смеси следующего состава: 0,1 мл раствора поли-А (в концентрации 2 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5 и 0,3 мл экстракта клеток гриба в том же буфере. Инкубацию проводили в термостате при 37°C в течение 15 мин. О дезаминировании поли-А судили по образованию специфического преципитата в реакции двойной радиальной иммунодиффузии при взаимодействии антител с инкубатом.

Реакцию двойной радиальной иммунодиффузии проводили на стеклянных пластинках (7 x 12 см) в 1,5%-ном агаре (Difko, США). С этой целью в агаре вырезали лунки: центральную - для антител или антисыворотки, диаметром 8 мм; и периферические - для анализируемых и контрольных растворов, диаметром 3 мм.

Результаты и их обсуждение

В результате подбора оптимальной дозы иммунизации наиболее пригодной оказалась доза 750 мкг/кг веса. (рис.1., табл.1). Сыворотка, полученная при иммунизации кроликов этой дозой антигена обладает достаточно высокой активностью и специфичностью. При использовании антигена в дозе 2000 мкг/кг сыворотка оказалась полиспецифичной, а при использовании дозы антигена 75 мкг/кг - недостаточно активной. Как следует из таблицы 1., все полученные сыворотки положительно реагируют с БСА, т.е. с белком-носителем, входящим в состав конъюгированного антигена. Однако, после очистки на иммуносорбенте (рис.2.) были получены антитела, не преципитировавшие БСА, в реакции двойной радиальной иммунодиффузии (табл.1); Выход антител из 1 мл глобулиновой фракции сыворотки - 0,8-1,2мг. Полученные антитела использовали для определения продуктов дезаминирования поли-А, образующихся после ее инкубации с бесклеточным экстрактом гриба *Penicillium lanoso-viride* (рис.3). Положительная реакция преципитации с конъюгированным антигеном инкубата поли-А с бесклеточным экстрактом гриба и отсутствие реакции в остальных контрольных растворах свидетельствует в пользу образования в инкубационной смеси продуктов дезаминирования поли-А - ее кнозидовых производных.

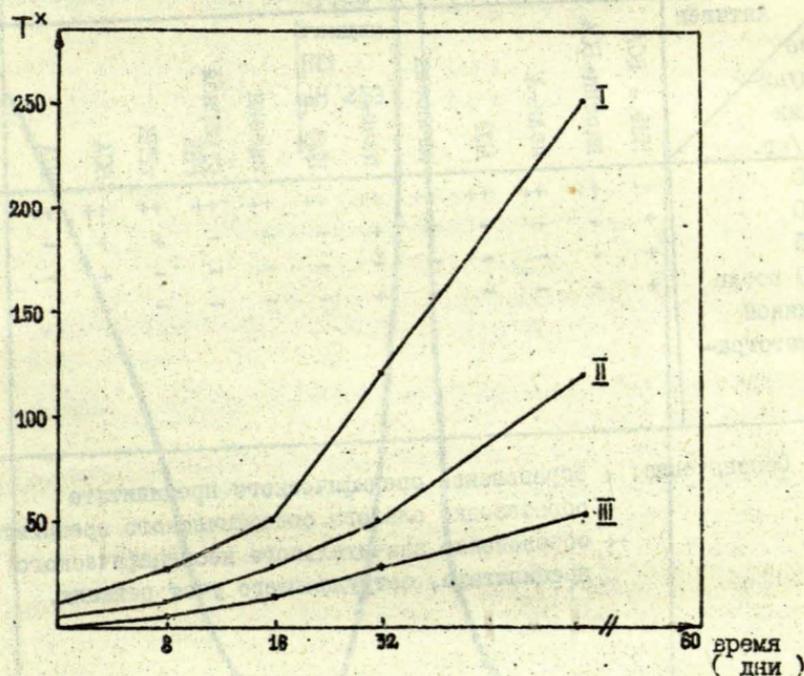


Рис. I. Динамика нарастания титра антител в сыворотках кроликов, иммунизированных различными дозами коньюгированного антигена

Одноразовая доза антигена: I-2000 мкг

II-750 мкг

III-75 мкг

T^X -титр, определенный по конечному разведению антигена, которое еще дает видимый преципитат с определенным количеством сыворотки

Таблица I

Специфичность антисывороток, полученных иммунизацией кроликов конъюгатом БСА с ИМФ и инозином в реакции двойной радиальной диффузии в 1,5% агаре *

Доза иммунизации мкг/кг.	Антиген											
	ИМФ - БСА	инозин-БСА	поли-А	ИМФ	аденозин	поли-И	ИМФ	инозин	суммарная РНК	тРНК	БСА	УСА
2000	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
750	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
75	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
750 после аффинной хроматографии	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

* Обозначения: + образование специфического преципитата
 ± образование слабого специфического преципитата
 ++ образование значительного неспецифического преципитата, затрудняющего учет реакции.

A₂₈₀

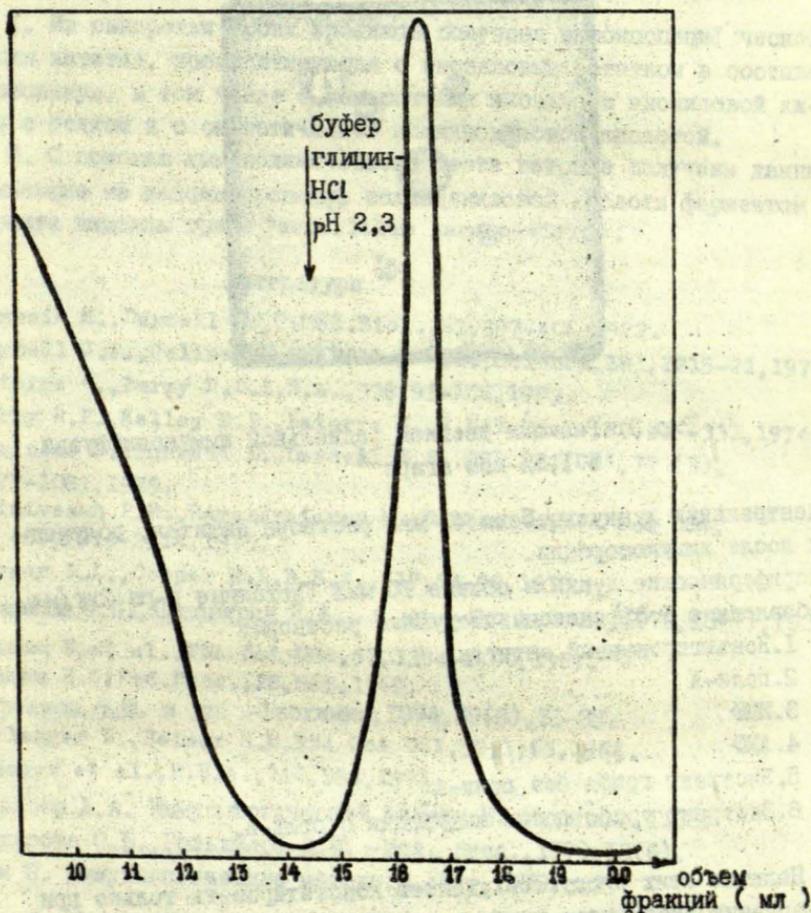


Рис. 2. Профиль элюции антител при хроматографии глобулиновой фракции сыворотки на колонке илозин-САЧ-сефарозы 4В

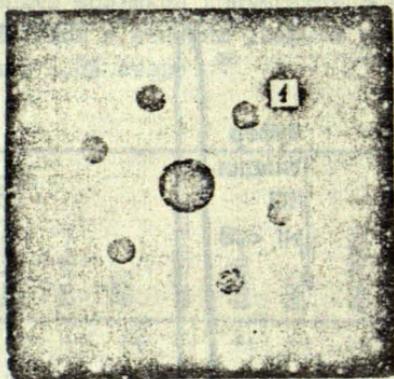


Рис.3. Реакция двойной радиальной иммунодиффузии в 1,5%-ном агаре *

* В центральную лунку внесено 40 мкл раствора антител, полученных после иммуносорбции.

В периферические лунки в объеме 10 мкл (исходные р-ры 2мг/мл, разбавленные 1:32) внесены следующие растворы:

1. Конъюгированный антиген
2. поли-А
3. ИМБ
4. АМФ
5. Экстракт гриба без поли-А
6. Экстракт гриба после инкубации с поли-А.

Наличие этих продуктов удалось констатировать только при использовании экстрактов гриба на определенных стадиях развития — на начальных фазах перехода стерильного роста вегетативного мицелия к образованию конидиеносящих клеток — метул и фиаллид. Это косвенно свидетельствует о связи процесса энзиматического дезаминирования поли-А с дифференциацией клеток гриба *Penicillium lanosoviride*.

По нашим данным мы пока не можем судить с глубине происходящего дезаминирования, т.е. с соотношении и взаимном расположении нуклеотидов в образовавшемся из поли-А гетерополинуклеотиде — АМ.

Это является предметом дальнейшего исследования.

Выводы

1. Из сыворотки крови кроликов получена высокоспецифическая фракция антител, преципитирующая с инозитовым остатком в составе макромолекул, в том числе с конъюгатами инозина и инозитовой кислоты с белком и с синтетической полиинозитовой кислотой.

2. С помощью иммунохимического теста впервые получены данные указывающие на дезаминирование полиадениловой кислоты ферментом экстракта мицелия гриба *Penicillium largoc-viride*.

Литература

1. Adesnik M., Darnell E., J. Mol. Biol., 67, 397-406, 1972.
2. Darnell J. E., Jelinek W. R., Mollaj G. P., Science, 181, 1215-21, 1973.
3. Latorre J., Perry R. P. V. B. A., 335, 93-101, 1973.
4. Perry R. P., Kelley D. E., Latorre J., J. Mol. Biol., 82, 315-331, 1974.
5. Sheiness D., Puckett L., Darnell J. E., PNA Sci USA, 72 (3), 1077-1081, 1975.
6. Srinivasah P. R., Ramanarayanan M., Rabbam E., PNA Sci USA, 72 (8), 2910-2914, 1975.
7. Berger S. L., Cooper H. L. V. B. A., 517, 84-98, 1978.
8. Самарина О. П., Просвирин Н. А., и др. - Мол. биол., 1979, 13(1), 192.
9. Scaram E. et al., PNA Sci USA, 57, 1394-1400, 1967.
10. Kamen H. O. Fed. Proc., 28, 865, 1969.
11. Бурьянов Я. И. и др. - Биохимия, 1974, 39(6), 31-38.
12. Erlanger B., Weiser S. M. PNA Sci USA, 52, 1, 68, 1964.
13. Inouye et al., V. B. A., 240, 594, 1971.
14. Зильбер Л. А. Иммунологический анализ. М.: Медицина, 1968.
15. Макарова О. В., Гольдфарб Д. М. - Мол. биол., 1979, 13(6).
16. Бэм Э. Иммунологические методы. М.: Мир, 1979, с. 31.

Вульфа Л.А., Вилкс С.Р., Романова Н.А.
ЛГУ им. П. Стучки

Деаминазирование аденозина культурами ризосферных микроорганизмов

Аденсиндезаминаза является одним из ключевых ферментов пуринового обмена. Показано важное значение этого фермента для нормального функционирования клеток млекопитающих и целесообразность дальнейшего его исследования с целью практического применения в медицине. Предполагается, что источником фермента смогут служить микроорганизмы (Шпрунка, 1978).

С целью получения продуцента аденозиндезаминазы продолжаются поиски активных культур микроорганизмов среди представителей различных экологических групп. Было установлено, что аденозиндезаминазой активностью обладают почти все проверенные актиномицеты (Sawa, Fukagawa, Nomura, 1967, Вилкс, Вульфа, 1978), но активность фермента низка. Широко аденозиндезаминаза распространена среди представителей эпифитной микрофлоры (Вилкс, Вульфа, 1978). Из этой группы выделен активный штамм *Flavobacterium breve* (Вилкс, Вульфа, Нейберга, 1980).

В настоящей работе исследовалась микрофлора ризосферы как источник перспективных продуцентов аденозиндезаминазы.

Методика

Чтобы выделить из ризосферы и ризопланы микроорганизмы, использующие аденозин в качестве единственного источника азота, применялся метод накопительных культур, а потом на плотной среде выделялись чистые культуры.

Для исследования брались растения из 3 семейств:

- | | |
|------------------|---|
| сем. Poaceae | - кукуруза (<i>Zea mays</i> L.),
мятлик луговой (<i>Poa annua</i> L.), |
| сем. Leguminosae | - фасоль (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.),
конские бобы (<i>Faba vulgaris</i>
Moench), |
| сем. Asteraceae | - цикорий обыкновенный (<i>Cicharium</i>
<i>intybus</i> L.),
салат посевной (<i>Lactuca sativa</i> L.). |

Ризосферная микрофлора и корневая микрофлора выделялась по методу, описанному в работе З.Т. Разумовской и др. (1960).

Состав накопительной среды (г/л): KH_2PO_4 - I, K_2HPO_4 - I, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2, аденозин - 2, глюкоза - 10г или этиловый спирт - 40 мл, дистиллированная вода. Среда без источника углерода стерилизовалась при I атм. 20 мин. После стерилизации к среде добавлялся стерильный раствор глюкозы или этиловый спирт. Минеральный фон среды рекомендован Е.Ф. Берёзовой (Разумовская и др., 1960).

Смывы с корней или суспензии корней вносились в количестве I мл в 100 мл колбы с 30 мл среды. Культивирование проходило при 26°C 3 суток. В случае роста делались два пассажа в такие же условия. Для выделения чистых культур из накопительных использовались чашки с обогащенным капустным агаром, приготовленным по рецепту, предложенному Ю.М. Возняковской и О.Т. Широковым (Разумовская и др., 1960). Эта же среда использовалась для поддержания культур.

Продукты катаболизма аденозина в культурах выделенных микроорганизмов определялись методом восходящей хроматографии на бумаге **Filtrak FN** - II в системе - этилацетат: уксусная кислота: вода (3:1:1). Продукты катаболизма обнаруживали по поглощению ультрафиолетовых лучей на ультрамикроскопе.

Для хроматографирования на бумагу были наложены агаровые диски (диаметр 8 мм) из 1-3 суточных культур на выше указанной синтетической среде. (Муйжниекс, Витолс, 1980).

Результаты

Из шести видов растений выделено всего 78 культур микроорганизмов, использующих аденозин в качестве единственного источника азота. Из них 32 культуры (39,7%) выделены на среде с этиловым спиртом, а 46 культур (60,3%) - на среде с глюкозой. В результате макроскопических и микроскопических наблюдений установлено, что 49,3% выделенных культур - бактерии, 36,9% - дрожжи, 13,7% - микромицеты. На среде с этиловым спиртом наблюдался главным образом рост бактерий, не были выделены культуры грибов, а на среде с глюкозой выделены бактерии, дрожжи и микромицеты.

52% культур, использующих аденозин в качестве единственного источника азота, выделено из ризосферы, а 48% - из ризопланы. Состав аденозиниспользующих микроорганизмов по группам для ризосферы и ризопланы, существенно не отличается, за исключением

микромикетов, которых в ризосфере мало (табл. I).

Таблица I.

Групповой состав в % микроорганизмов ризосферы и ризопланы, использующих аденозин в качестве единственного источника азота

	Ризосфера	Ризоплана
бактерии	47,3	51,5
дрожжи	34,2	40,0
микромикеты	18,5	8,5

Наибольшее количество аденозиниспользующих культур выделено из ризосферы и ризопланы салата (20 культур), из остальных объектов около - 14 культур. Это свидетельствует о широком распространении и значительном разнообразии микроорганизмов, которые могут использовать аденозин. Можно предположить, что корневке выделения содержат некоторое количество аденозина.

В отличие от млекопитающих, микроорганизмами начальный катаболизм аденозина может осуществляться двумя путями:

1) аденозин → инозин → гипоксантин;

2) аденозин → аденин → гипоксантин

(Шпрунка, 1978).

Как возможные продуценты аденозиндезаминазы нас интересовали микроорганизмы, разлагающие аденозин по первому пути.

Таблица 2

Пути разложения аденозина микроорганизмами ризосферы и ризопланы

Источник выделения	Группа микроорганизмов	К-во культур, разлагающих	
		аденозин→инозин	аденозин→аденин
Ризосфера	бактерии	13	1
	дрожжи	7	6
	микромикеты	4	1
Ризоплана	бактерии	15	0
	дрожжи	7	3
	микромикеты	2	0

Подавляющее большинство выделенных бактериальных культур дезаминируют аденозин с образованием инозина, поэтому будут исследованы как возможные продуценты аденозиндезаминазы. Среди выделенных дрожжей встречаются оба пути катаболизма аденозина. Так как культур микромицетов выделено мало, трудно делать выводы.

Выводы

1. В ризосфере и пизоплане растений широко распространены микроорганизмы, использующие в качестве единственного источника азота аденозин.

2. Большинство бактерий, выделенных из ризосферы и ризопланы, дезаминируют аденозин до инозина.

Литература

1. Разумовская З. Г., Чижик Г. Я., Громов Б. В. Лабораторные занятия по почвенной микробиологии. - Л.: ЛГУ им. А. А. Дзюнова, 1960. - с. 124.
2. Мушженикс И. О., Витолс М. Я. Выделение и скрининг биохимических свойств сапрофитных пурино- и пиримидинлитических аэробных микроорганизмов. - В кн.: Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. - Казань, 1980, с. 44-53.
3. Вилкс С. Р., Вульфа Л. Я. Распространенность аденозиндезаминазной способности среди микроорганизмов отдельных систематических и экологических групп. - В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. - Рига: ЛГУ им. П. Стучки, 1978, с. 78-82.
4. Шпрунка И. К. Аденозиндезаминаза (Е.С.3.5.4.4) микроорганизмов. Там же, с. 64-77.
5. Sawa T., Fukagawa Y., Nomma L., Takenchi T., Umazawa H. - Antibiotics, 1967, 20, 6, p. 317.
6. Вилкс С. Р., Вульфа Л. Я., Нейберга Э. Р. Исследования *Flavobacterium breve* как продуцента аденозиндезаминазы (Е.С.3.5.4.4). Тезисы Всесоюзного микробиологического общества. - Рига, 1980.

Ревелиня В.Р.

ЛГУ им. П. Стучки

Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*.

Изменение активности в процессе роста и в зависимости от условий культивирования

Деаминазы адениловых нуклеотидов найдены и описаны у микроскопических грибов *Microsporium audouini* (1,2,3), *Saccharomycetes cerevisiae* (4) и у ряда грибов, принадлежащих к роду *Aspergillus* (5). Наиболее изученным является фермент из *A. oryzae* (6,7,8).

Однако данные по изучению аденилатдезаминазной активности в различных условиях культивирования, что могло бы дать ответ о физиологической роли деаминаз, весьма малочисленны. Существует только мнение, что индуцибельная АМД - или аденилатдезаминаза *A. oryzae* аналогично как и аденозиндезаминаза слизистой оболочки тонкой кишки животных выполняет функцию "пищеварительной системы" (9).

Больше данных имеется насчет физиологической роли аденозиндезаминаз у бактерий, особенно у бацилл (10,11,12), у которых отмечена повышенная деаминазная активность в спорулирующих клетках, именно в четвертой стадии споруляции, характеризующейся образованием кортекса (13,14,15).

В данной работе представлен материал по изучению АМД-дезаминазной активности во время роста гриба *Penicillium lanoso-viride* и в зависимости от условий культивирования на плотных и жидких питательных средах различного состава.

Методика

Гриб *P. lanoso-viride* культивировали при 28°C на качалках (режим 100 ос. мин.) в колбах Эрленмейера (20 мл среды в 100 мл колбе) в жидкой среде следующего состава (среда СНР): янтарная кислота - 1 г/л, глицерин - 3 мл/л, $(NH_4)_2SO_4$ - 1 г/л, KH_2PO_4 - 3 г/л, KCl - 2,5 г/л, $MgSO_4$ - 0,1 г/л. Среда СР не содержала $(NH_4)_2SO_4$, среда СН - KH_2PO_4 . В соответствующих плотных средах добавлялся агар - 20 г/л. Пуриновые и пиримидиновые соединения добавлялись до конечной 2,6 мМ концентрации.

Для выращивания колонии гриба использовалась среда следующего состава (16): глюкоза - 5%, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,76%,

KH_2PO_4 - 0,045%, агар - 2%.

Разделение и идентификация продуктов катаболизма АМФ проводилась методом бумажной хроматографии в системах растворителей: изомалянная кислота: NH_4OH : H_2O (59:4:37), изопропанол: NH_4OH : H_2O (14:1:5), ⁴ этилацетат: летяная уксусная кислота: H_2O (3:1:1) и УФ-спектрофотометрией.

Суспензии клеток получали отфильтровыванием биомассы, промыванием и ресуспендированием её в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,0. АМФ-дезаминазная активность определялась в экстрактах клеток после их механического дезинтегрирования в шаровой мельнице и центрифугирования при 6000 об./мин. 30 мин. при 0°C.

Аденилатдезаминазная активность определялась модифицированным спектрофотометрическим методом (17) по изменению абсорбции в процессе дезаминирования производных аденина при 240 и 265 нм длины волны (рис. I). Реакционную смесь объемом 0,4 мл, содержащую 20 мкМ калий-фосфатного буфера pH 6,0, 1 мкМ субстрата (АМФ) и раствор фермента, инкубировали при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 0,1 мл холодной 25% HCl O_4 . Выпавший осадок центрифугировали, к 0,2 мл супернатанта добавляли 5 мл дист. воды и измеряли абсорбцию на спекорде UV Vis (ГДР). За единицу активности (МЕ) приняли количество фермента, дезаминирующего 1 мкМ субстрата за 1 мин. при 37°C в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,0.

Результаты и их обсуждение

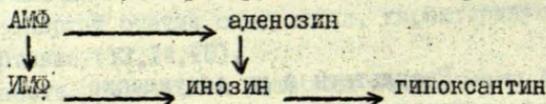
Штамм *Penicillium lanoso-viride* был отобран на элективной плотной питательной среде, содержащей АМФ в качестве единственного источника азотного питания, по накоплению в среде культивирования продукта дезаминирования АМФ - ИМФ. Качественный состав продуктов катаболизма АМФ показан в таблице I.

Таблица I

Продукты катаболизма АМФ культурой *P. lanoso-viride*

Среды	АМФ и продукты катаболизма в среде	
	инкубация 24 часа	инкубация 96 часов
плотные CP + АМФ	ИМФ	аденозин, ИМФ
CP + АМФ	ИМФ	-
C NP + АМФ	ИМФ	-
жидкие CP + АМФ	АМФ, инозин	ИМФ, инозин, гипоксантин
CP + АМФ	АМФ	аденозин, инозин, гипоксантин
C NP + АМФ	АМФ	аденозин, инозин

Видно, что дезаминирование АМФ происходит сравнительно рано при выращивании гриба на плотных средах и зависит также от состава среды. Анализируя продукты катаболизма АМФ, можно представить схему использования АМФ в качестве источника питания культурой *P. lanoso-viride*, деградирующей АМФ по параллельным путям катаболизма:



Было проверено, всегда ли необходимо присутствие экзогенной АМФ в среде культивирования для индукции аденилатдеаминазной активности. Определяли дезаминазную активность в культурах различного возраста, выращенных в присутствии и отсутствии экзогенной АМФ в среде (табл.2), следили также за образованием конидий.

Таблица 2

Накапливание аденилатдезаминазной активности культурой *P. lanoso - viride* на средах различного состава

Среды	АМФ-дезаминазная активность в культурах разного возраста (в сутках)*				Возраст культуры в начале конидиеобразования (в сутках)
	2	4	6	8	
$C^N P + AM\Phi$	0,0	0,1	0,6	0,9	6
$C^N P$	0,0	0,1	0,2	0,8	7
$CP + AM\Phi$	0,1	0,2	0,7	0,8	6

* активность выражена в МЕ на 1 г сырой биомассы.

Из таблицы видно, что АМФ-дезаминазная активность проявляется раньше в условиях, в которых культура использует АМФ в качестве единственного источника азотного питания. Неорганический NH_4^+ незначительно тормозит появление аденилатдезаминазной активности в присутствии АМФ, но активность не ингибирует. Накапливание деаминазной активности начинается также с началом стадии конидиеобразования и в отсутствии экзогенной АМФ.

Добавление АМФ в начале конидиеобразования приводит к появлению аденилатдезаминазной активности уже через 2-часовой инкубации (рис.2). Индуцибельная природа аденозин- и аденилатдеаминаз до сих пор показана только у *E. coli* (18), у которой деаминазная активность повышается в 10-30 раз в присутствии аденина и гипоксантина, и у *A. ozyzae*, где она индуцируется в достаточном источниках азотного питания (9).

Для выяснения вопроса о взаимосвязи между появлением аденилатдезаминазной активности и конидиеобразованием проверяли АМФ-дезаминазную активность и её индуцибельность в суспензиях клеток *P. lanoso - viride*, находящегося на различных фазах развития (табл.3).

A 265/240

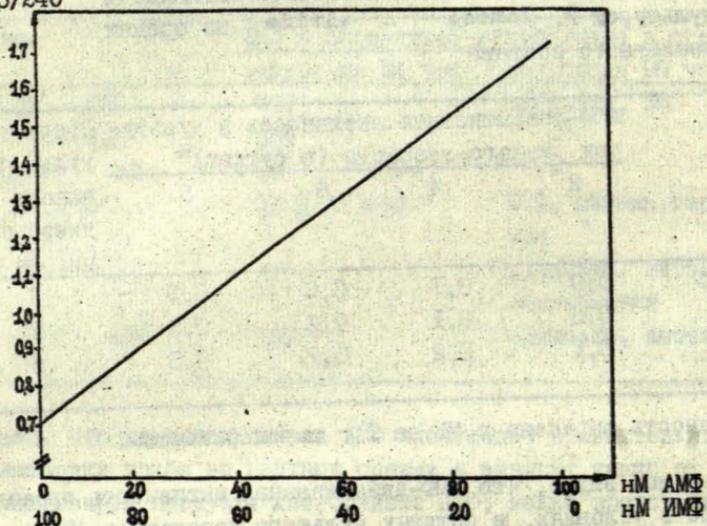


Рис.1. Определение количества АМФ и ИМФ в их смеси

АМФ-дезаминазная
активность,
МЕ/мл

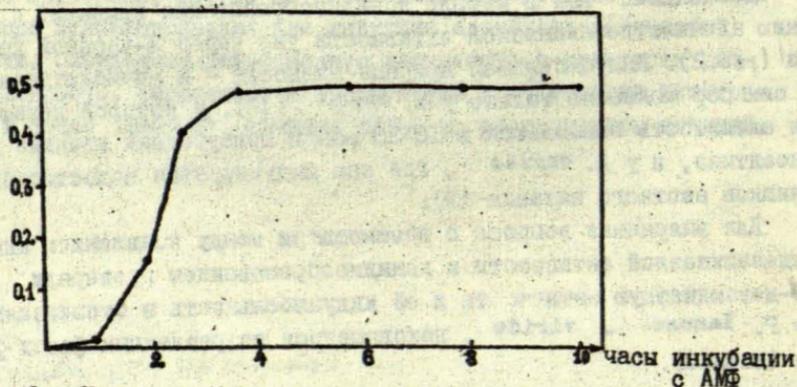


Рис.2. Индукция АМФ-дезаминазной активности *P.lanosoviride*

Таблица 3

Активность аденилатдезаминазы и её индуцибельность в суспензиях клеток *P. lanoso - viride* в различных фазах развития

Характеристика фаз развития	АМФ-дезаминазная активность	
	без преинкубации АМФ	после преинкубации с АМФ ^{жж}
конидиеобразующая культура	•	+
культура в начале конидиеобразования	+	+
культура в фазе вегетативного роста гиф	-	+
культура с подавленной способностью к конидиеобразованию ^ж	-	±
прорастающие конидии	-	-

ж конидиеобразование подавлено 0,5% содержанием в среде агара

жж время преинкубации с 0,2% АМФ - 4 часа

" + " - АМФ-дезаминазная активность, превышающая 0,05 МЕ на I мл суспензии

" ± " - 0,01 - 0,05 МЕ

" - " - активность не обнаружена.

Индуцибельность или присутствие аденилатдезаминазной активности в культуре *P. lanoso - viride* без добавления экзогенной АМФ связано со способностью культуры образовывать конидии. В культуре с угнетенным в результате физиологического воздействия среды конидиеобразованием, а также в прорастающих конидиях аденилатдезаминазная активность не индуцируется. Следовательно, ферментативная активность связана не именно с присутствием конидий в культуре, а со способностью культуры образовывать дифференцированные клетки бесполого размножения (конидиеносцев, фиазид, конидий). Также и у бактерий аденозиндезаминаза обнаруживается как в вегетативных клетках, так и в спорах, и, хотя в спорах её активность в 4-5 раз выше, аденозиндезаминазу только частично можно причислять собственно спорным ферментам (14).

Высокая аденилатдезаминазная активность наблюдается при росте гриба на плотной питательной среде, содержащей отруби пшеницы и благоприятствующей конидиеобразованию, в отсутствие экзогенной АМФ (рис.3). Накапливание активности начинается в экспоненциальной фазе роста и продолжается параллельно с приростом биомассы, достигая максимум в середине стационарной фазы, примерно соответствующий максимуму конидиеобразования. Накапливание АМФ-дезаминазной активности, изученной в процессе роста *Microsporium audouini* (I), имеет несколько иной характер - максимальная активность достигается во второй половине экспоненциальной фазы.

Накапливание аденилатдезаминазной активности параллельно конидиеобразованию подтверждается также опытом с 8-суточной колонией *P. lanoso - viride*, диаметром 4,5 см (табл.4), выращенной на агаризованной среде над целлофановой пленкой. В наружной зоне содержащей только растущие гифы, активность не была обнаружена, она появилась в конидиеобразующей зоне.

Таблица 4

Аденилатдезаминазная активность в разных зонах колонии *P. lanoso - viride*

Зона колонии	Количество сырой биомассы (мг)	АМФ-дезаминазная активность (МЕ на 1 г сырой биомассы)
наружная белая	12	0,0
конидиеобразующая	28	1,2
конидиеносщая	35	2,0
середина колонии	33	2,4

Для количественного определения индуцибельности аденилатдезаминазной активности в погруженной культуре были проведены опыты с добавлением некоторых пуриновых соединений в качестве единственных источников азотного питания и в качестве дополнительных источников питания (табл.5). АМФ-дезаминазная активность определялась в 3-суточной культуре. Результаты аналогичных опытов с добавлением пуриновых и пиримидиновых соединений к плотной среде, содержащей отруби пшеницы, обобщены в табл.6.

Таблица 5

Аденилатдезаминазная активность в погруженной культуре *P. lanoso - viride* при добавлении экзогенных пуриновых соединений в различных условиях питания

Субстраты	Среда С N P			Среда С P		
	сырая биомас-са (мг)	АМФ-дезаминазная активность		сырая биомас-са (мг)	АМФ-дезаминазная активность	
		МЕ на 1 г биомассы	в % *		МЕ на 1 г биомассы	в % *
АМФ	240	0,11	110	300	0,08	80
аденозин	280	0,07	70	270	0,11	110
аденин	170	0,26	260	215	0,12	120
инозин	365	0,06	60	180	0,17	170
гипоксантин	420	0,05	50	60	0,73	730
контроль	220	0,10	100	7	2,22	2220

* за 100% принята активность в МЕ на 1 г биомассы в среде С N P без добавления пуриновых соединений (контроль).

Таблица 6

Аденилатдезаминазная активность *P. lanoso - viride* при росте на плотной среде с добавлением пуриновых и пиримидиновых соединений в качестве дополнительных источников питания.

Субстраты	сырая биомасса на чашку Петри (г)	АМФ-дезаминазная активность	
		МЕ на 1 г биомассы	в % *
контроль	6,5	25,2	100
УМФ	7,5	18,7	74
урацил	6,9	19,7	76
цитидин	7,0	20,0	79
аденозин	6,6	22,3	85
ЦМФ	6,7	24,5	97
гуанин	6,5	25,2	100
аденин	6,0	27,3	108
уридин	6,0	27,3	108
ГМФ	5,9	27,8	110

Продолжение таблицы 6

Субстраты	сырая биомасса	АМФ-дезаминазная активность	
	на чашку Петри (г)	МЕ на 1г биомассы	в % *
АМФ	6,5	28,3	112
ИМФ	6,2	28,3	112
цитозин	5,5	29,8	118
инозин	5,5	29,8	118
гуанозин	5,6	32,9	131
гипоксантин	5,4	34,1	135

* за 100% принята активность 25,2 МЕ на 1 г биомассы (контроль)

Из данных таблиц 5 и 6 можно предположить, что пуриновые и пиримидиновые соединения в различной степени влияют на появление и количество аденилатдезаминазной активности в зависимости от условий культивирования. Активность варьирует на плотной среде культивирования 19-34 МЕ на 1 г сырой биомассы (в среднем около 26 МЕ), на жидкой полной питательной среде 0,05-0,26 МЕ (в среднем 0,1), а на жидкой среде с пуриновыми соединениями в качестве единственных источников азотного питания - 0,08-0,73 МЕ на 1 г биомассы. Голодание, вызванное недостатком доступных источников азотного питания в жидкой среде, коррелирует с повышением АМФ-дезаминазной активности. В несколько ином аспекте данные таблицы 6 представлены на рис.4. Наблюдается негативная корреляция между количеством биомассы и аденилатдезаминазной активностью, т.е. пониженная скорость роста сопровождается повышенной дезаминазной активностью, определенной на единицу количества биомассы. Аналогичную зависимость, только в другом масштабе, можно получить также из данных, приведенных в табл.5.

Как известно, недостаток источников питания, особенно азота, приводит к образованию конидий у грибов (19). Так как аденилатдезаминазная активность каким-то образом связана с конидиеобразованием, то, по-видимому, повышение её активности в медленно растущих культурах можно объяснить их склонностью к дифференциации. Более глубоко это явление можно рассматривать, исходя из

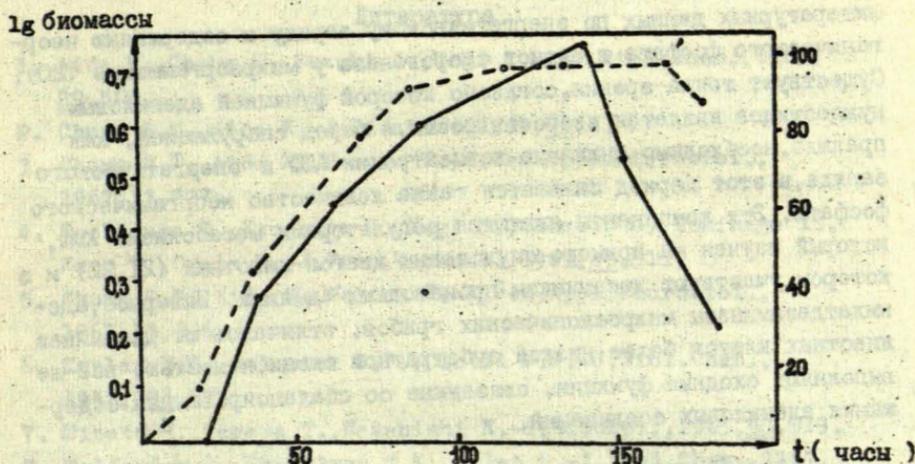


Рис.3. Изменение аденилатдезаминазной активности в процессе роста *P.lanoso-viride*

— аденилатдезаминазная активность
 --- биомасса

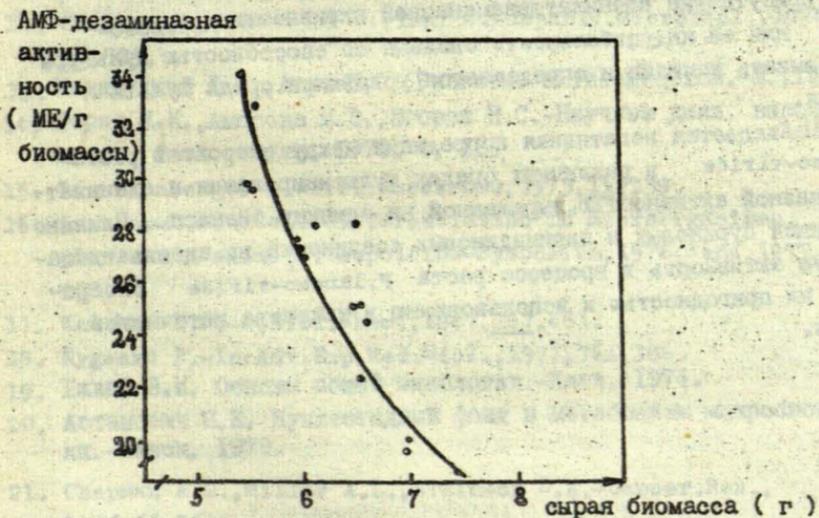


Рис.4. Зависимость аденилатдезаминазной активности от количества биомассы *P.lanoso-viride* при росте на плотной питательной среде с добавлением различных пуриновых и пиримидиновых соединений

литературных данных по энергетическому заряду и содержанию неорганического фосфата в период спорогенеза у микроорганизмов (20). Существует точка зрения, согласно которой функцией адениловых нуклеотидов является скорость роста. А перед споруляцией, как правило, необходимо снижение концентрации АТФ и энергетического заряда, в этот период снижается также количество неорганического фосфата. Эти компоненты являются регуляторами метаболизма АМФ, который изучен на примере опухолевых клеток животных (21,22) и в котором участвуют дезаминазы производных аденина. Наверное, аденилатдезаминазы микроскопических грибов, отличаясь от дезаминаз животных клеток более низкой субстратной специфичностью, всё-же выполняют сходные функции, связанные со сбалансированием содержания адениловых соединений.

Выводы

1. Культура *Penicillium lanoso-viride* катаболизирует АМФ по параллельным путям с образованием ИМФ, аденозина, инозина и гипоксантина в зависимости от условий культивирования.

2. Присутствие аденилатдезаминазной активности *p. lanoso-viride* или её индуцибельность связаны со способностью культуры образовывать конидии и определяется условиями среды культивирования.

3. Наблюдается негативная корреляция между скоростью роста *p. lanoso-viride* в различных средах культивирования и аденилатдезаминазной активностью, выраженной на единицу биомассы. Влияние экзогенных пуриновых и пиримидиновых соединений на аденилатдезаминазную активность в процессе роста *p. lanoso-viride* опосредовано их пригодностью к использованию в качестве источников питания.

Литература

1. Aida K., Chung S., Suzuki J., Yagi T. - Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 508.
2. Chung S. T., Aida K. - J. Biochem., 1967, 61, 1.
3. Chung S. T., Aida K., Uemura T. - J. Gen. Appl. Microbiol., 1967, 13, 237.
4. Tochicura T., Kunehara M., Yagi S., Okomoto H., Tominaga I., Kano T., Ogata H. - J. Ferm. Technol., 1967, 45, 511.
5. Chung S. T., Aida K., Uemura T. - J. Gen. Appl. Microbiol., 1967, 13, 335.
6. Kaplan N. O., Colowick S. P., Ciotti M. M. - J. Biol. Chem., 1952, 194, 579.
7. Minato S., Tagawa T., Nakanishi K. - J. Biochem., 1965, 58, 519.
8. Wolfender R., Sharpless T. K., Allan R. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 977.
9. Pitts B. J. R., Orsi B. H. - Biochem. J., 1967, 115, 3, 14 P.
10. Powell J. F., Hunter J. R. - Biochem. J., 1956, 62, 381.
11. Powell J. F., Strange R. E. - Biochem. J., 1956, 63, 661.
12. Shibata H., Takamatsu H., Tani J. - Japan. J. Microbiol., 1976, 20, 529.
13. Калагуцкий Л. В., Агре Н. С. Развитие актиномицетов. - М., 1977.
14. Лория Ж. К., Амосова М. В., Егоров Н. С. - Научные докл. высшей школы, биол. науки, 1976, 4, 13.
15. Leuchtenberger A. - Biol. Rundschau, 1973, 11, 139.
16. Luckner M. - In: Cell differentiation in microorganisms, plants and animals. Leopoldina-Symposium, 1976, Jena, 1977, 538.
17. Kalckar H. M. - J. Biol. Chem., 1947, 167, 461.
18. Nygaard P. - In: Adv. Exp. Med. Biol., 1977, 76A, 186.
19. Былай В. И. Основы общей микологии. - Киев, 1974.
20. Астапович Н. К. Нуклеотидный фонд и метаболизм микробной клетки. - Минск, 1979.
21. Chapman A. G., Miller A. L., Atkinson D. E. - Cancer. Res., 1976, 36, 1144.
22. Sauer L. A. - Cancer. Res., 1978, 38, 1057.

Шафранский А.Б.

ЛГУ им. П. Стучки

Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*.

Выделение и очистка фермента.

Аденилат- и аденозиндезаминазы впервые были обнаружены Шмидтом в 1928 году в экстракте скелетных мышц кролика (6). С тех пор накопился богатый материал по изучению ферментов обмена пуриновых соединений в макро- и микроорганизмах. Но истинный прогресс намечается в последнем десятилетии, после того, когда группа исследователей под руководством Джиблета в 1972 году раскрыла связь между дефицитом аденозиндезаминазы и комбинированной иммунонедостаточностью у людей (5). Одним из направлений является изучение дезаминаз производных аденина различных организмов с целью применения их в медицине (4, 8, 9). Для этого прежде всего необходимо получить высокоочищенные ферментные препараты.

В настоящей работе представлена попытка получения фермента аденилатдезаминазы *Penicillium lanoso-viride* в виде препарата с высокой степенью очистки для последующего изучения его свойств.

Методика

Для получения сырого экстракта фермента четырехсуточную культуру гриба *P. lanoso-viride*, выращенную на плотной питательной среде, содержащей пшеничные отруби, дезинтегрировали в шаровой мельнице в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,0 при 0° - +4°C. Гомогенат центрифугировали при 6000 об./мин., 0°C, 40 мин., и супернатант использовали для дальнейшей очистки.

Аденилатдезаминазную активность определяли спектрофотометрическим способом (2). За единицу активности принимали количество фермента, дезаминирующего 1 мкмоль субстрата (5'-АМФ) в течение 1 мин. при 37°C в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,0.

Белок определяли по Лоури (7).

Для контроля за гомогенностью очищенного препарата фермента использовали электрофорез в 7% ПААГ-е по Gävis (3) с модификациями - электрофорез проводили в пластинке ПААГ-я, толщиной 3 мм, без концентрирующего геля.

Результаты и обсуждение

Из нескольких рассмотренных вариантов нами выбрана оптимальная схема очистки фермента (табл. I), следуя которой получен препарат аденилатдезаминазы, очищенный в 1300 раз при 20% выходе.

Очистку начинали обработкой грубого экстракта 10% раствором сульфата стрептомицина для освобождения от нуклеиновых кислот и сопутствующих им белков. Обработку продолжали, пока отношение поглощений при 230 и 260 нм не превышала 2, что свидетельствует о достаточной очистке экстракта от нуклеиновых кислот.

Супернатант обрабатывали активированным углём марки АН-3 (10 г угля на 100 мл р-ра). Такая обработка (табл. I) приводит не только к понижению общего количества белка в растворе, но и увеличению активности фермента, возможно за счет специфического взаимодействия с сорбентом.

Далее использовали ступенчатое осаждение белков сульфатом аммония (I). Установлено, что аденилатдезаминаза обратимо денатурирует при насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в интервале 0,55 - 0,80.

Сконцентрированный высаливанием препарат фермента диализовали против 0,05 М калий-фосфатного буфера и от осадка освобождались центрифугированием. Супернатант наносили на колонку с сефадексом Г-200 (2,5 x 110 см), уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, pH 6,0.

Элюирование проводили тем же буфером (Рис. 1) со скоростью 20 мл /ч.

На последнем этапе препарат после гель-фильтрации подвергался очистке ионообменной хроматографией на колонке (1 x 24 см) с ДЕ-52 целлюлозой, уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером pH 6,0. Элюирование фермента осуществляется тем же буфером в линейном градиенте NaCl (0 + 0,4 М). Фермент элюируется в виде одного пика при 0,15 - 0,30 М концентрации NaCl (Рис. 2).

После объединения фракций с наиболее высокой удельной активностью фермента получили препарат, удельная активность которого в 1300 раз превышает таковую в грубом экстракте, а количество составляет около 20% от исходной.

Очищенный препарат аденилатдезаминазы был подвергнут электрофоретическому анализу, который выявил его гетерогенность (Табл. 2). Обнаруженные 5 зон, примерно одинаковой интенсивности, соответствуют белкам с сильно отличающимися молекулярными весами. Причем, ни одна из зон, как в отдельности, так и все вместе не об-

Таблица I

Схема очистки аденилатдезаминазы *Penicillium lanoso-viride*

Стадия очистки	Общая активность (ед.)	Общий белок (мг)	Удельная активность (ед./мг)	Выход (%)	Степень очистки
Экстракт	2156.1	3591.0	0.6	100	1.0
Обработка стрептомицин-сульфатом	2092.2	2789.2	0.7	97	1.2
Обработка активированным углем	2316.2	2128.4	1.1	107	1.8
Осаждение сульфатом аммония 0.55 - 0.80 насыщения	1466.1	170.8	8.6	68	14.4
Хроматография на сефадексе Г-200	948.7	22.4	40.7	44	67.9
Хроматография на DE-52 целлюлозе	452.8	0.9	790.3	21	1317.2 *

* - очищенный препарат аденилатдезаминазы не содержит активности РНК-аз и фосфоинозостераз.

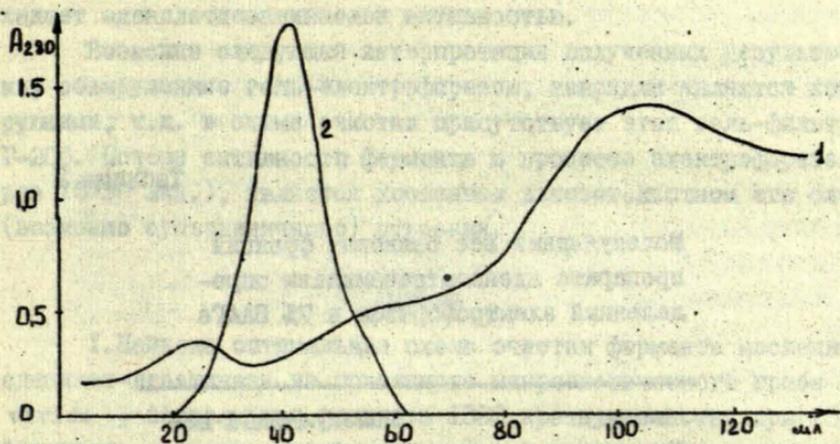


Рис.1. Гель-хроматография аденилатдезаминазы на колонке с сефадексом Г-200.

1 - белок; 2 - активность аденилатдезаминазы

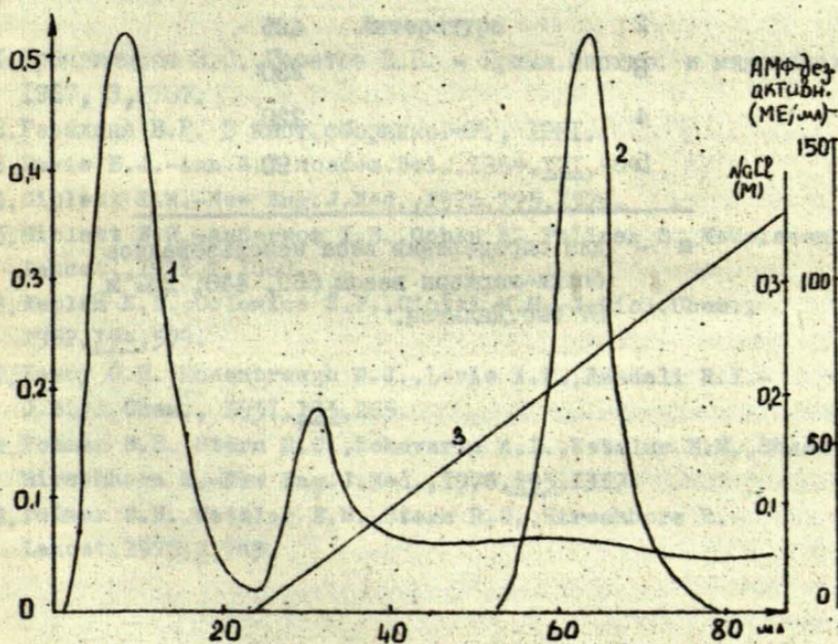


Рис.2. Хроматографическое разделение аденилатдезаминазы на DE-52 целлюлозе.

1 - белок; 2 - активность фермента; 3 - градиент NaCl

Таблица 2

Молекулярный вес белковых фракций препарата аденилатдезаминазы определенный электрофорезом в 7% ПААГе

номер фракции	Молекулярный вес фрагмента (в тыс.Дальтон)	ж
1	535	
2	425	
3	350	
4	220	
5	90	

ж - для определения веса использовались белки-маркеры весом 669, 440, 232 и 67 тыс.Дальтон.

ладеет аденилатдезаминазной активностью.

Возможна следующая интерпретация полученных результатов: Белки, обнаруженные гель-электрофорезом, наврядли являются контактирующими, т.к. в схеме очистки присутствует этап гель-фильтрации Г-200. Потеря активности фермента в процессе электрофореза (уже через 15-30 мин.), является косвенным доказательством его сложного (возможно субъединичного) строения.

Выводы

1. Найдена оптимальная схема очистки фермента неспецифической аденилат-дезаминазы из почвенного микроскопического гриба *P. lanosoviride*, позволившая получить 1300 кратную очистку при 20% выходе фермента.

2. Показана электрофоретическая неоднородность препарата, указывающая на сложное строение молекулы фермента.

Литература

1. Броновицкая З.С., Горетов В.П. - Прикл. биохим. и микробиол., 1967, 3, 707.
2. Ревелиня В.Р. В наст. сборнике. - Р., 1981.
3. Davis B.J. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404.
4. Giblett E.R. - New Eng. J. Med., 1976, 295, 1376.
5. Giblett E.R., Anderson I.E., Cohen E., Pollasa B., Meuwissen H.J. - Lancet., 1972, 2, 1067.
6. Kaplan N.D., Colowice S.P., Ciotti M.M. - J. Biol. Chem., 1952, 194, 579.
7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Lewis A.F., Randall R.I. - J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
8. Polmar S.H., Stern R.C., Schevarte A.L., Wetzler E.M., Chase P.A., Hirschhora R. - New Eng. J. Med., 1976, 295, 1337.
9. Polmar S.H., Wetzler E.M., Stern R.C., Hirschhora R. - Lancet, 1975, 2, 743.

Ревелиня В.Р., Шафранский А.Б., Мушкетер И.О.
ЛПУ им. П. Стучки

Аденилатдезаминаза *Penicillium lanoso-viride*.
Некоторые свойства фермента

Аденилатаминогидролазы (КФ.3.5.4.6), осуществляющие гидролитическое дезаминирование 5'-аденозинмонофосфата (АМФ), широко распространены в специализированных тканях позвоночных (1,2) и беспозвоночных (3,4). Аденилатдезаминазы или неспецифические аденозинаминогидролазы (КФ.3.5.4.4), дезаминирующие также АМФ, известны и у микроорганизмов *Desulfovibrio desulfuricans* (5), *Beneckea natriegens* (6), *Actinomyces antibioticus* (7), *Streptomyces aureofaciens* (8), *Saccharomyces cerevisiae* (9), *Microsporium oudouini* (10) и у ряда видов, принадлежащих к роду *Aspergillus* (11,12). В отличие от дезаминаз высших организмов, свойства которых изучены относительно подробно, из дезаминаз аденилатовых соединений микроорганизмов основательно охарактеризована только неспецифическая аденозиндезаминаза *A. oryzae* (12,13,14,15).

В настоящей работе приводятся данные о некоторых физико-химических и кинетических свойствах аденилатдезаминазы *Penicillium lanoso-viride*.

Методика

В работе использовался в 1317 раз очищенный (16) препарат аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* с удельной активностью 790 единиц (МЕ) на 1 мг белка. Определение дезаминазной активности проводилось по описанной методике (17).

Для определения молекулярного веса активной формы фермента проводили хроматографию на колонке (1,5 x 20 см) с СL-сефарозой 4В в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,0. Скорость элюирования - 10 мл/час. В качестве свидетелей использовали следующие белки - маркеры: тиреоглобулин - 663 тыс.Д, ферритин - 440 тыс.Д, каталазу - 323 тыс.Д и гемоглобин - 67 тыс.Д.

Для определения субстратной специфичности использовали субстраты производства "Резнал". При изучении кинетических свойств препарат аденилатдезаминазы инкубировали 1 мин. при 37°C в 0,1М калий-фосфатном буфере, pH 6,0, с добавлением различных количеств

АМФ (от 2,5 до 25,0 мкМ). Км определяли графическим методом в координатах обратных величин Лайнувера-Берка (16). Для изучения механизма ферментативной реакции использовали графическое определение зависимости $1/s/v$ от $1/s$ (18).

Влияние на аденилатдезаминазную активность катионов в виде хлоридов определяли в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 6,0, действии фермента при различных значениях pH - с применением 0,1 М буферных растворов: калий-фосфатного (pH 5,0 - 8,0), цитратного (pH 3,0 - 6,5), трис - HCl (pH 7,0 - 9,0), боратного (pH 7,5-9,2).

Результаты и их обсуждение

Уже в процессе очистки были получены предварительные данные о высоком молекулярном весе фермента, т.к. активность обнаруживали в самых ранних фракциях элюата с колонки с сефадексом Г-200 (16). Установленный методом колоночной хроматографии с применением СЛ - сефарозы 4В молекулярный вес оказался равным 210 тыс.Д (рис.1), что сравнимо с молекулярным весом, определенным для аденозиндезаминазы *Aspergillus oryzae* в недиссоциированном состоянии - 217 тыс.Д (15).

Субстратную специфичность аденилатдезаминазы проверяли по отношению к 14 субстратам (табл.1).

Аденилатдезаминаза *P.lanoso-viride* также как и другие известные аденозин - и аденилатдезаминазы грибов (II,14) активно дезаминирует адениловые нуклеотиды и аденозин, менее активно - их дезоксирибозопроизводные, НАД и НАДФ, но также как аденозиндезаминаза *A.oryzae* не дезаминирует аденин и полиадениловую кислоту (14). Дезаминирование аденозина происходит в 3 раза быстрее, чем дезаминирование дезоксиаденозина. Км для дезаминирования АМФ составляет $7,4 \cdot 10^{-3}$ М (рис.2). При концентрациях, превышающих 10 мкМ, наблюдается ингибирование избытком субстрата. Определенная нами Км примерно на порядок выше, чем у аденозиндезаминазы *A.oryzae* (13) и *Streptomyces aureofaciens* (8), и на два порядка выше, чем у *Microsporium audouinii* (II). Зависимость

$[s] / v$ от концентрации субстрата, позволяющая различать механизм, включающий образование тройного комплекса, от механизма с замещением фермента в двухсубстратных - двухпродуктных реакциях, как видно из рис.3, может свидетельствовать в пользу конкурентного характера ингибирования и, следовательно, подчинения реакции

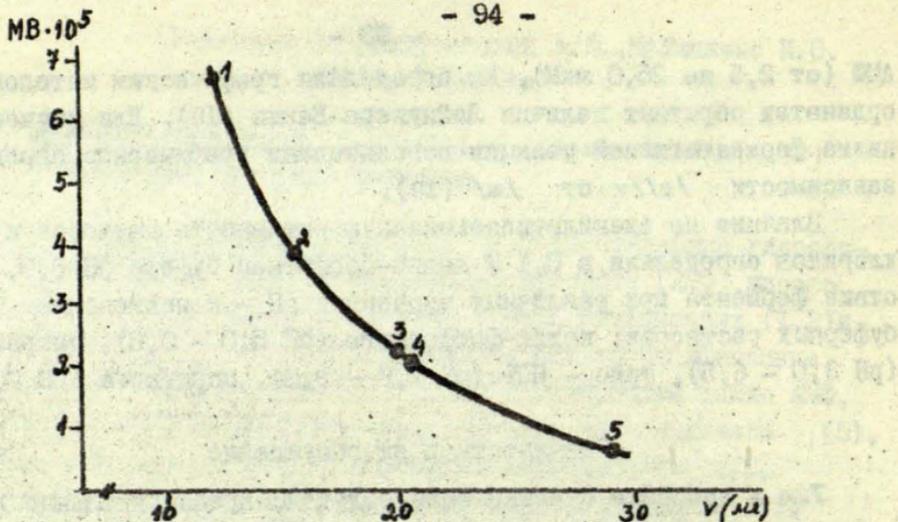


Рис.1. Определение молекулярного веса аденилатдезаминазы хроматографией на колонке с С.-сефарозой 4В
 1-тиреоглобулин; 2-ферритин; 3-каталаза; 4-аденилатдезаминаза; 5-гемоглобин

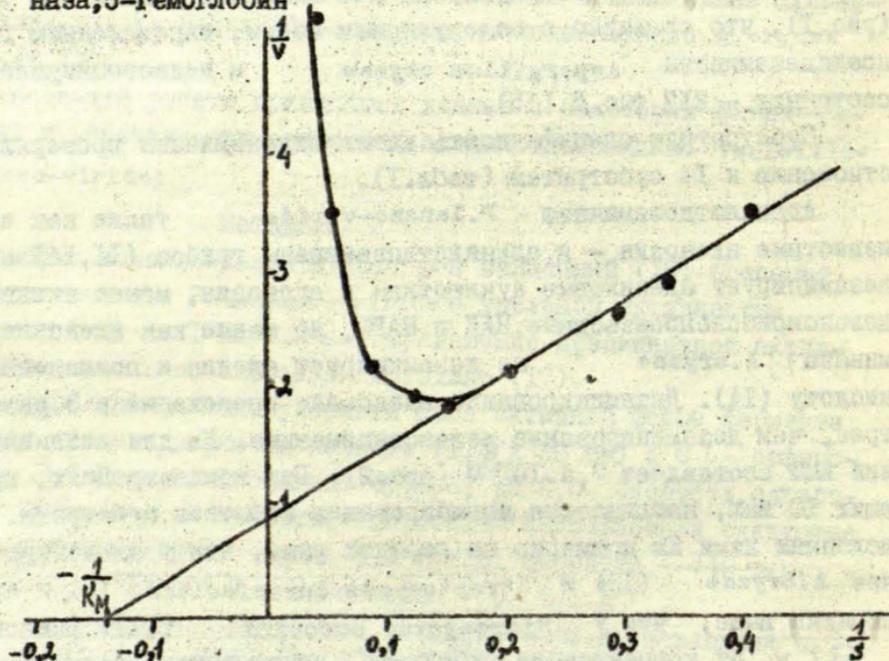


Рис.2. Определение константы Михаэлиса для аденилатдезаминазной реакции

Таблица I

Субстратная специфичность аденилатдезаминазы
P. lanoso-viride

Субстраты	Деаминазная активность	
	МЕ/мл	%*
АМФ	790	100
АДФ	751	95
АТФ	695	88
аденозин	656	83
НАД	395	50
дезоксид АМФ	211	27
дезоксиаденозин	205	26
НАДФ	134	17
2',3'- цАМФ	111	14
НАДФ · Н ₂	0	0
Аденин	0	0
полиадениловая кислота	0	0
ГМФ	0	0
ЦМФ	0	0

* за 100% принята активность деаминарования АМФ.

деаминарования АМФ механизму с замещением фермента.

Аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* не требует присутствия диализуемых кофакторов. Это свойство отмечено и у других деаминаз (2). Ионы Li^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , K^+ в концентрации 4 мМ не влияют на деаминазную активность фермента, однако ряд ионов, особенно Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , оказывает ингибирующее действие (табл. 2). Ионы-активаторы не были найдены.

На рис. 4 изображена зависимость активности аденилатдезаминазы от концентрации $NaCl$ в реакционной смеси, видно, что отклонение молярности от оптимальной - 0,04 - 0,10 М $NaCl$ вызывает снижение активности фермента.

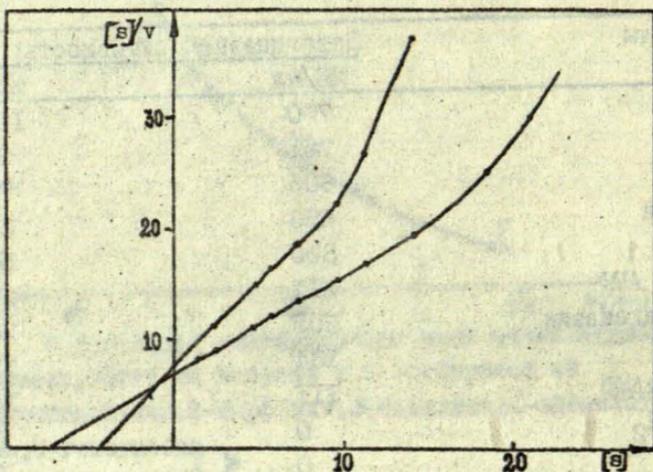


Рис.3. Первичные зависимости $[s]/v$ от концентрации AMF

AMF-дезаминазная
активность
(ME/мл)

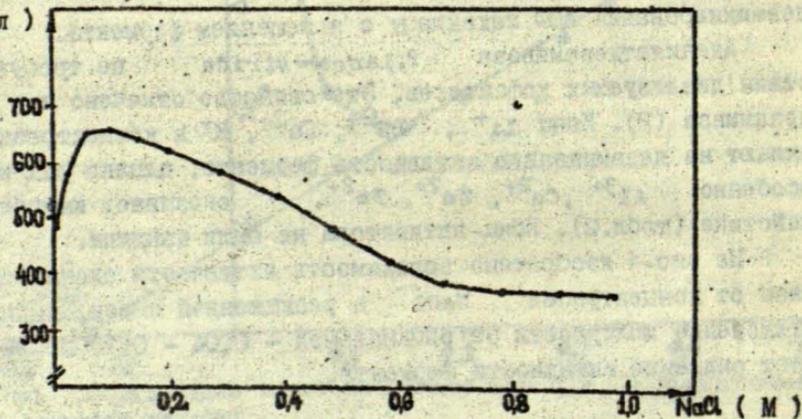


Рис.4. Зависимость активности аденилатдезаминазы *P. lanoso-viride* от концентрации NaCl

Таблица 2

Влияние катионов на активность аденилатдезаминазы
P.lanosoviride

Катионы (4мМ)	Аденилатдезаминазная активность	
	МЕ/мг	в % *
-	780	100
Li ⁺	780	100
Ba ²⁺	780	100
Ca ²⁺	780	100
K ⁺	780	100
Na ⁺	741	95
Cr ³⁺	710	91
Mg ²⁺	702	90
Ni ²⁺	664	88
Mn ²⁺	644	80
Mn ²⁺	608	78
Co ²⁺	608	78
Fe ²⁺	481	63
Zn ²⁺	296	38
Cu	296	38
Al ³⁺	101	13

* за 100% принята активность в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 6,0.

Все известные деаминазы производных аденина имеют оптимум активности при физиологически нормальных значениях рН, близких к нейтральным - обычно в пределах от 5,0 до 7,5 (2), за исключением АДФ - деаминаз грибов рода *Aspergillus*, имеющих оптимум рН около 3,4 (II). Деаминаза *P.lanosoviride* сохраняет активность в интервале рН 3-9, а максимальную активность проявляет при рН 6,0 ± 0,3 (рис.5).

Работу с аденилатдеаминазой *P.lanosoviride* облегчает её относительная стабильность при пониженной температуре (табл.3). Значительная инактивация наступает при выдерживании фермента при температуре 40°C и выше. Температурный оптимум каталитического действия фермента равен 37° ± 3°C (рис.6), что близко к оптималь-

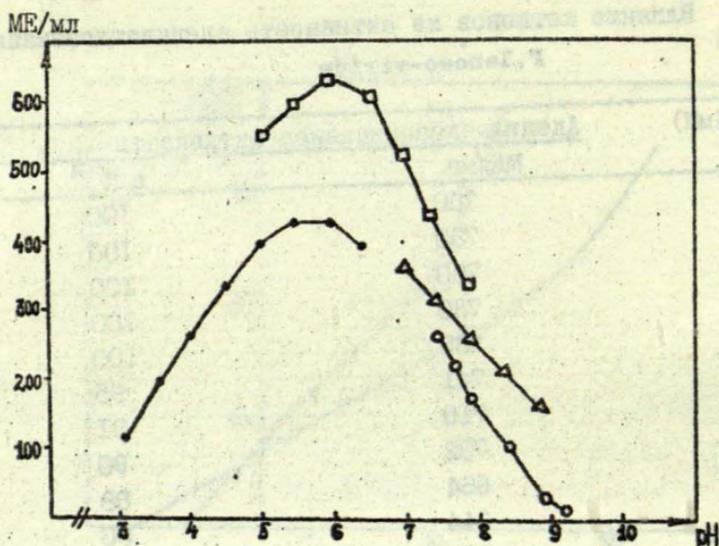


Рис.5. Влияние рН на активность аденилатдеаминазы *P. lanoso-viride*

- — калий-фосфатный буфер
- — цитратный буфер
- ▲ — трис-НСl буфер
- ◇ — боратный буфер

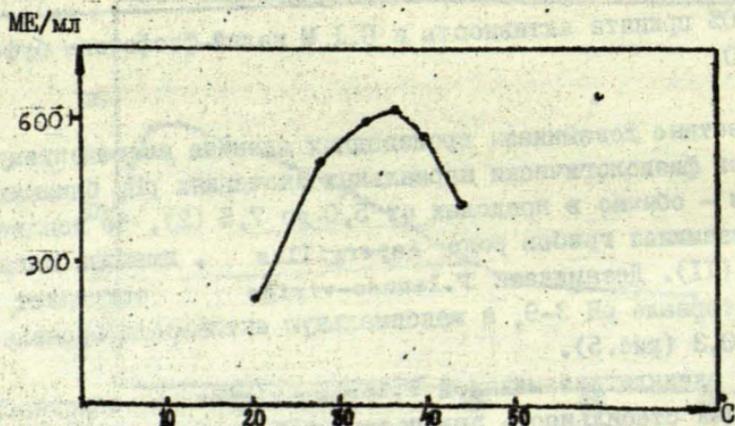


Рис.6. Влияние температуры инкубационной смеси на активность аденилатдеаминазы *P. lanoso-viride*

ным температурам дезаминаз других грибов (I2, I9).

Таблица 3.

Термостабильность аденилатдезаминазы
P. lanoso-viride при pH 6,0

Температура, °C	Время выдержи- вания	Аденилатдезаминазная активность	
		МЕ / мл	% *
+ 2	7 дней	790	100
	2 месяца	727	92
+18	2 дня	727	92
	6 дней	16	2
+40	30 мин.	727	92
	60 мин.	55	7
+60	5 мин.	24	3
	10 мин.	0	0

* за 100% принята активность сразу после выделения и очистки.

Выводы

Аденилатдезаминаза *P. lanoso-viride* (КФ.3.5.4.6) дезаминарует в убывающей скорости реакции 5' - АМФ, 5'-АДФ, 5'-АТФ, аденозин, НАД, дезокси АМФ, дезоксиаденозин, НАДФ и 2',3'-циАМФ. Км для 5'-АМФ равняется $7,4 \cdot 10^{-3}$ М. Молекулярный вес фермента - 210 тыс. Д. Ингибиторами активности аденилатдезаминазы являются Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . Максимальная активность проявляется в калий-фосфатном буфере при pH $6,0 \pm 0,3$, температуре $37^{\circ}C$ и концентрации $NaCl$ 0,04 - 0,10 М. Фермент не требует присутствия диализуемых кофакторов.

Литература

1. Акопян Ж.И. - Биол.ж.Арм., 1977, 30,49.
2. Zielke C.L., Suelter C.H. - In: The Enzymes, v.4. London-N.Y., 1971, 47.
3. Fujiwara T., Spencer B. - Biochem. J., 1962, 85, 187.
4. Gibbs K.L., Bishop S.H. - Biochem. J., 1977, 163, 511.
5. Yates M.G. - Biochem. Biophys. Acta, 1969, 171, 299.
6. Niven D.F., Collins P.A., Knowles C.J. - J. Gen. Microbiol., 1977, 100, 5.
7. Максимова Л.Ф., Дебов С.С., Реброва Т.Т. - Вopr. мед. хим., 1974, 20, 86.
8. Rosinova M., Zelinova E., Zelinka J. - Collect. Czech. Chem. Commun., 1978, 43, 2324.
9. Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. - Biochim. Biophys. Acta, 1979, 1, 157.
10. Chung S.T., Aida K. - J. Biochem., 1967, 61, 1.
11. Chung S.T., Aida K., Hemura T. - J. Gen. Appl. Microbiol., 1967, 13, 335.
12. Mitchell H.K., McElroy W.D. - Anal. Biochem., 1946, 10, 251.
13. Mikato S., Tagowa T., Miyaki M., Shimizu B., Nakanishi K. - J. Biochem., 1966, 59, 265.
14. Wolfender R., Sharpless T.K., Allan R. - J. Biol. Chem., 1967, 242, 977.
15. Wolfender R., Tomozava Y., Bamman B. - Biochemistry, 1968, 7, 3965.
16. Шафранский А.Б. В наст. сборнике. - Р., 1981.
17. Ревелиня В.Р. В наст. сборнике. - Р., 1981.
18. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. - М., 1979.
19. Chung S.T., Hamane M., Aida K., Uemura T. - Agr. Biol. Chem., 1968, 32, 1278.

ЛГУ им. П. Стучки

Влияние гипоксантина на токсичность
аденина у мышей

Среди всех известных пуриновых оснований аденин является единственным относительно токсичным веществом (1). Однако аденин является и единственным пурином, очень эффективно включаемым в синтез полинуклеотидов организма млекопитающих (2,3,4).

Аденин используется для нормализации уровня мочевой кислоты в крови и моче, что важно при лечении ацидозов различного происхождения (5,6), для лечения некоторых наследственных заболеваний, связанных с аномалиями жирового обмена (7,8,9). Однако, токсичное действие повышенных доз этого вещества ограничивает его применение. Например, из-за токсичности аденина не всегда возможно использование в животноводстве микробной биомассы, богатой белками, но характеризующейся высоким содержанием нуклеиновых кислот, компонентом которых является аденин.

Данные по поводу детоксикации аденина обнаружить в литературе не удалось. Однако для решения этой проблемы интересны сведения (10) о том, что токсичность повышенных количеств некоторых адениновых нуклеозидов эффективно снимается другими пуринами и пиримидинами. Так, детоксикация аденозина производится уридином, а обезвреживание аналога аденозина - 6-меркаптопуринового рибозида - при введении в организм уридина вместе с гипоксантином. Интересна в этом отношении также работа Клиффорда с соавторами (5), в которой показано, что метаболизм пуринов в организме может изменяться под воздействием экзогенных пуринов, поступающих с пищей.

На основании выше приведенных данных литературы мы пытались определить, как влияет на токсичность аденина у мышей присутствие в их рационе других пуринов и пиримидинов, особое внимание уделяя возможному воздействию гипоксантина.

Методика

В опытах были использованы самцы конвенциональных белых мышей линии Lobrend Laboratory Swiss Webster в возрасте от 1,5 до 2-х месяцев со средним весом 20 г. Животные содержались на полной синтетической диете I - 479E2(II), не содержащей пуриновые и пиримидиновые соединения за исключением витамина В₁, и на диете № 6 (I2), включающей природные пуриновые и пиримидиновые мономеры и полимеры.

Для исследования токсичного действия аденина препарат вводился животным перорально (п/о) через зонд, а также путем добавления к рациону в следующих количествах: 0,1; 0,05; 0,02 и 0,005%. Кроме того определялась доза аденина, вызывающая гибель 50% опытных животных (LD_{50}). В связи с трудностями, возникающими при получении достаточного количества синтетической диеты для обеспечения большого количества опытных животных, доза LD_{50} аденина определялась лишь на мышах, получивших диету № 6. В экспериментах по изучению токсичного действия аденина у мышей, содержащихся на диете I - 479E2 было использовано по 5 животных в каждой опытной группе.

Для определения LD_{50} животным п/о однократно вводился 0,8% раствор аденина в дозах 708; 637; 600; 550; 500 и 450 мг/кг животного веса. Высшая доза аденина 708 мг/кг была выбрана с учетом литературных данных об LD_{50} для аденина у мышей (I3). Для определения LD_{50} было использовано 63 животных. Статистическая обработка данных проводилась по методу Литчфилда и Уилкоксона (I4). После установления величины дозы LD_{50} подбиралось соответствующее количество гипоксантина, которое могло бы обладать защитным эффектом против токсичного действия аденина. Гипоксантин вводился животным дробно: половина установленной эффективной дозы 238 мг/кг вводилась п/о в виде 0,27% раствора вместе с дозой LD_{50} для аденина. Оставшаяся половина дозы гипоксантина, разделенная на три части по 76 мг/кг с физиологическим раствором вводилась интраперитонеально, дважды через каждые 12 часов, а затем через 24 часа. Параллельно ставились контрольные опыты с введением животным только гипоксантина в адекватных количествах.

Для изучения защитного действия гипоксантина на аденином пораженных мышах, содержащихся на диете № 6, было использовано

108 животных. Достоверность защитного действия гипоксантина проверялось по X^2 (14). Над опытными животными велись визуальные наблюдения изменений их почек. Все наблюдения за экспериментальными животными проводились в течение 10 дней от момента введения исследуемых препаратов.

Результаты и их обсуждение

I. Токсичность аденина у мышей, содержавшихся на различных диетах.

Опыты показали, что на животных, получавших диету, не содержащую других пуриновых и пиримидиновых соединений, аденин оказывает резкое токсическое действие (табл. I). Особенно это проявляется при содержании в пище 0,1% аденина. При таком количестве соединения животные использовали в среднем лишь 3 мл диеты в течение 12 часов и в дальнейшем отказались от пищи. Хотя такое количество принятого с пищей аденина составляло только 150 мг/кг, оно быстро вызвало отравление животных с последующей их гибелью в течение 3-4 суток.

Необходимо отметить, что наблюдается взаимосвязь между величиной промежутка времени, в течение которого вводилась определенная доза аденина и степенью токсичного действия последнего. При более постепенном введении даже сравнительно большая общая доза аденина действовала менее токсично, чем невысокая при однократном введении. Например, однократное пероральное введение аденина, в количестве 150 мг/кг вызвало у мышей, содержавшихся на синтетической диете $L - 479E2$ 100% смертность, тогда как доза аденина 305 мг/кг, вводимая постепенно с рационом в течение суток, не приводила к гибели животных, хотя при этом наблюдалось повреждение их почек. В целом это явление подтверждает мнение других исследователей (1, 15), что токсичность аденина зависит от его разовой дозы.

Опыты по установлению величины дозы LD_{50} показали, что у мышей, получавших диету № 6, этот показатель равняется 475 (402 + 561) мг/кг. Это почти наполовину меньше, чем указано в литературе 708 мг/кг (13). Трудно сказать, чем объяснима такая высокая токсичность аденина в наших опытах. Возможно - другим составом используемого рациона, возможно - индивидуальными особенностями этой линии мышей.

Хотя в наших опытах не проводилось определение дозы LD₅₀ для мышей, содержащихся на рационе L - 479E2 по причине, указанной в методике, однако на основании ряда данных (см. табл. I) можно предположить, что она гораздо ниже, чем на диете № 6. В целом можно сказать, что токсичность аденина на фоне диеты № 6, содержащей определенное количество пуринов и пиримидинов, намного ниже, чем на синтетической диете L - 479E2, нефимкицей в своём составе этих соединений. Это подтверждают результаты сравнения по влиянию различных доз аденина на мышей, питающихся этими рационами. Так, если доза 150 мг/кг у мышей, содержащихся на диете L - 479E2 вызывает 100% гибель (см. табл. I), то на фоне диеты № 6 такой же эффект достигается лишь при введении 950 мг/кг.

2. Влияние гипоксантина на токсичность аденина.

Исследования показали, что значительную роль в детоксикации аденина может играть гипоксантин. Так добавление к синтетической диете L - 479E2, содержащей 0,1% аденина, такого же количества гипоксантина, снимает летальность этой дозы аденина в течение всего времени эксперимента, продолжавшегося 10 дней. На фоне диеты № 6 гипоксантин также обладал определенным защитным эффектом, если вводился вместе с аденином. Для снятия токсичности дозы аденина LD₅₀ на фоне диеты № 6 более действительным оказалось эквивалентное количество гипоксантина, равное 477 мг/кг. Причём лучшее выживание животных наблюдалось в случае, если названное количество гипоксантина вводилось постепенно в течение 2-3 суток. Защитное действие гипоксантина было определено как статистически достоверное при $p=0,05$ (14). На фоне выше упомянутого количества гипоксантина доза аденина LD₅₀ увеличивалась в 1,3 раза, т.е. $R R = 1,3$ (1,04 + 1,62) (14), и достигала 620(535+719) мг/кг (рис. I).

Таким образом можно сделать вывод, что на токсичность аденина у мышей определенное влияние оказывают пуриновые и пиримидиновые соединения их рациона, в особенности оксипуридин гипоксантин, который, если и не имеется в корме непосредственно, то может образоваться в ходе переработки других пуринов пищи. Пока трудно представить защитный механизм гипоксантина против токсичного действия аденина. По предварительным нашим данным можно сказать, что не один из других испытанных пуриновых и пиримидиновых соеди-

Таблица I.

Влияние экзогенных аденина и гипоксантина на мышей, питающихся
синтетической диетой L 479E2

Диета	Ежедневное употребление диеты (мл)	Среднее к-во принятого за сутки исслед.соед. (мг/кг)	Изменение веса за 10 дней (г)	Состояние почек
Контроль (К)	16.2	-	+ 3,2	нормальные
К + 0,1% аденина	3.0 ^x	150 ^{xx}	- xxx	поврежденные
К + 0,05% аденина	12.2	305	- 3,1	поврежденные
К + 0,02% аденина	16.2	162	+ 3,1	нормальные
К + 0,005% аденина	17.2	43	+ 2,0	нормальные
К + 0,1% аденина + + 0,1% гипоксантина	8.8	440 + 440	0,3	поврежденные
К + 0,1% гипоксантина	10.0	500	+3,0	нормальные

x - употребление диеты в течение 12-ти часов.

xx - количество аденина, принятого в течение 12-ти часов.

xxx - животные 100% погибли в течение 3-4 суток после употребления диеты с аденином.

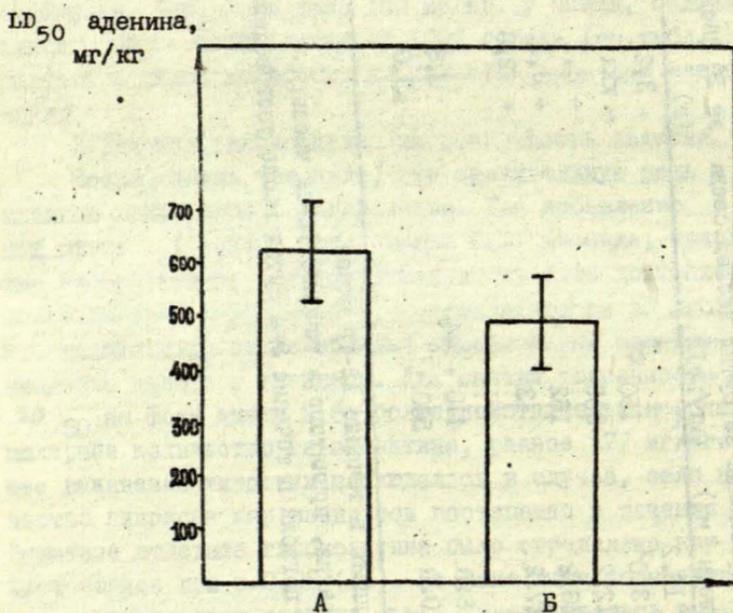


Рис. I. Сравнение фармакологической активности аденина на фоне гипоксантина и без него у мышей, питающихся диетой №6 ($PR=1,3$ ($1,04 \pm 1,62$) при $p=0,05$)

А- LD₅₀ аденина на фоне гипоксантина

Б- LD₅₀ аденина

нений (инозин, урацил, уридин и барбитуровая кислота) не оказывали такого положительного действия как гипоксантин. В доступной нам литературе не удалось найти каких-либо данных в отношении влияния гипоксантина на токсичность аденина. Однако из литературы известно (10), что гипоксантин вместе с уридином является эффективной защитой для организма при токсичных количествах аналога аденозина - 6-меркаптопуринового рибозиде. Токсичность повышенных количеств этого соединения, также как и аденозина, проявляется в блокировании последним биосинтеза пиримидинов (16,17-19) и, возможно, пуринов (10). Благоприятное действие гипоксантина и уридина Фокс и Келлу (10) видят в том, что эти вещества являются альтернативными субстратами для синтеза нуклеотидов при токсичных концентрациях аденозина или 6-меркаптопуринового рибозиде.

Трудно сказать, имеет ли это явление место при положительном действии гипоксантина на токсичность аденина. Как известно (1,15, 20), вредное влияние повышенных количеств аденина на организмы заключается, в основном, в поражении клеток почечных канальцев, где аденин откладывается в виде 8-оксиаденина и 2, 8-диоксиаденина. Эти кристаллические отложения разрушают структуру клеток и вызывают острые нарушения их функций. Кроме того, по данным литературы, уже весьма небольшие количества аденина вызывают лейкоцитоз крови у лабораторных млекопитающих - мышей, крыс, кроликов, собак (13,15).

Интересно отметить, что в наших опытах после введения токсичных доз аденина вместе с гипоксантином визуально не наблюдалось столь резкого поражения почек, как после введения только аденина. Возможно, в этом кроется механизм защиты гипоксантина? Однако проведенные визуальные наблюдения состояния почек требуют тщательных цитологических подтверждений.

Выводы

1. Токсичность повышенных концентраций аденина на мышей снижается, если в их корме присутствует пурины и пиримидины.
2. Гипоксантин является эффективным средством против токсичного действия аденина на мышей.

Литература

1. Story D., Schrader L., Theriault L. a. o., G.Nutr., 1977, 107, 1044.
2. Sheehan T., Tully E., Biochem. Soc. Trans., 1978 66, 1070.
3. Santos G., Hempstead K., Kopp L., Miesch R., G. Neurochem., 1968, 15, 367.
4. Kolassa N., Stengg R., Turnheim K., Can. G. Physiol. Pharmacol., 1977, 55, 1039.
5. Clifford A., Riunailo V., Young V., Schrimshaw N., G. Nutr., 1976, 106, 428.
6. Clifford A., Story D., G. Nutr., 1976, 106, 435.
7. Beuke P., Herrick N., Smitten L. a. o., Pediatr. Res., 1973, 7, 729.
8. Ceccarelli M., Ciompi M., Pasero G., Adv. Exp. Med. Biol., 1974, 41B, 675.
9. Van der Zee S., Lommer E., Trijbels I., Schretler E., Acta Pediatr. Scand., 1970, 59, 259.
10. Fox I., Kelley W., Rev. Biochem., 1978, 47, 655.
11. Pleasants J., Reddy B., Wostmann B., G. Nutr., 1970, 100, 497.
- 12.
13. Akintonwa A., Auditore G., Fed. Proc., 1976, 35, 250.
14. Беленький М. Д. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - Л.: Медгиз, 1963, 159 с.
15. Auditore G., Akintonwa A., Ballard B., Green L., Life Sci., 1979, 24, 733.
16. Carson D., Seegmiller J., J. Clin. Invest., 1976, 57, 274.
17. Snuder F., Seegmiller J., FEBS Lett., 1976, 66, 102.
18. Green H., Chan T., Science, 1973, 182, 836.
19. Ischii K., Green H., J. Cell Sci., 1973, 13, 429.
20. Philips F., Thiersch J., Bendich A., J. Pham. Exp. Therap., 1952, 104, 20.

Мушкин И.О.

ЛГУ им. П. Стучки

Метаболизм оротовой кислоты у *Bacillus*
adhaerens 9 в присутствии 6-азаурацила

Схема анаболических превращений оротовой кислоты в уридиловую (УМФ) впервые была установлена у бактерий (1) (Рис. I). Впоследствии аналогические пути *de novo* биосинтеза УМФ были обнаружены и у грибов, растений и млекопитающих (2,3).

Нет сомнений, что именно таким образом происходит синтез основной массы пиримидинов самых различных клеток. В то же время накапливаются сведения о возможном альтернативном пути превращения оротовой кислоты в УМФ у некоторых микроорганизмов.

Добавление в среду культивирования бактерий 6-азаурацила, который ингибирует *de novo* биосинтез пиримидинов, приводит к накоплению не только оротовой кислоты, но и урацила (4). Многие виды бактерий накапливают большие количества урацила в среде культивирования с оротовой кислотой (5,6). Оротовая кислота снимает ингибирующее воздействие 6-азаурацила на рост бактерий родов *Pseudomonas* и *Mycobacterium* (7), а также *Aspergillus nidulans* (8). При этом для бактерий прямыми биохимическими тестами, а для гриба - косвенно показано наличие ферментов, превращающих 6-азаурацил в активную форму ингибитора - 6-аза УМФ. Генетический дефект образования УМФ декарбоксилазы у *Saccharomyces cerevisiae* приводит к "leaky" фенотипу, а не к летальному исходу (9).

Перечисленные экспериментальные данные все же только косвенно указывают на возможность прямого декарбоксилирования оротовой кислоты. Накопление урацила из оротовой кислоты может осуществляться и через стадию УМФ (рис. I) при участии известных ферментов метаболизма. "Leaky" фенотип часто вызывается не полным отсутствием фермента, а наличием его видоизмененной формы. Если 6-азаурацил-резистентный штамм *A. nidulans* прямо образует урацил из оротовой кислоты, то непонятно, почему последняя не снимает ингибиторный эффект 5-фторурацила, снимающегося урацилом.

Целью настоящей работы явилось изучение биохимического механизма устойчивости некоторых штаммов бактерий к ингибиторному воздействию 6-азаурацила в присутствии оротовой кислоты и выяснение связи этого явления с возможным прямым декарбоксилированием оротовой кислоты.

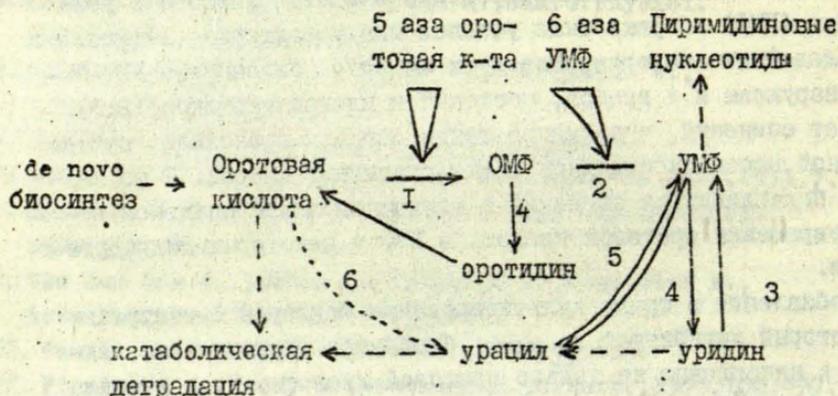


Рис. I. Схема метаболизма оротовой кислоты в клетках микроорганизмов

Пунктирной стрелкой указана гипотетическая реакция прямого декарбоксилирования оротовой кислоты.

ОМФ - оротидиловая кислота, 1-ОМФ - пирофосфорилаза, 2-ОМФ-декарбоксилаза, 3-уридинкиназа, 4-фосфатаза, 5-УМФ-пирофосфорилаза, 6-нуклеозидаза.

Жирными стрелками указаны места ингибиторного воздействия 5-азаоротовой кислоты и 6-азаурацила после его превращения ферментами клетки в активную форму ингибитора - 6 аза УМФ (IO).

Материалы и методы

Выделение и скрининг биохимических свойств штаммов, устойчивых к воздействию 6-азаурацила в присутствии оротовой кислоты, велось по описанной методике (II). Выращивание культур бактерии в жидкой среде в присутствии ингибиторов описано ранее (7). Избранный для исследований штамм *Bacillus adhaerans* 9 отличался среди других, схожих по биологическим

свойствам штаммов, наибольшей скоростью роста и активностью накопления урацила в жидкой среде культивирования с оротовой кислотой и 6-азаурацилом. Видовая принадлежность штамма была установлена по определителю Н.А. Красильникова (1949) (12).

В работе использовалась оротовая кислота, урацил и 6-азаурацил, которые были получены из фирмы "Реакхим" (олайнское НПО "Биохимреактив"); 6-азауридин - фирмы "Хемапол" (ЧССР); оротидин, ОМФ, ффсорибозилпирофосфат (ФРФФ) - фирмы "Калбиохем" (США). УМФ, уридин, УТФ, АТФ, тиаминпирофосфат и дитиотреитол (ДТТ) - фирмы "Реанал" (ВНР). 5-азаоротовая кислота, 6 аза УМФ, а также 4,5-¹⁴C-6-азаурацил (20МКю/мм) были синтезированы в Институте органической и биохимии АН ЧССР (Прага) и любезно представлены д-ром А. Чихаком. Остальные использованные в работе изотопы были продукцией фирмы "Изотоп". Их удельная активность 2-5 МКю/мм.

Получение бесклеточных экстрактов бактерий описано ранее (7). Для освобождения от различных примесей небелковой природы, бесклеточные экстракты высаливали сульфатом аммония, добавляя соль до 90% насыщения. Препrecитированный белок отцентрифугировали при 8000 об/мин. в течение 45 мин. при +5 - 8°C и ресуспендировали в исходном объеме 0,1 М К-фосфатного буфера рН 7,0, содержащего 0,1 М NaCl (КФ). Для освобождения от примесей сульфата аммония проводили диализ в течение 4-6 часов против 200 объемов КФ содержащих 1.10⁻³% тритона X-100. Количество белка в полученных препаратах определялось по методу Лоури (13) и обычно была в пределах 3-6 мг/мл.

При изучении метаболизма оротовой кислоты в бесклеточных экстрактах *B. adhaerans* 9 инкубационная смесь в 0,5 мл содержала 50 мкМ КФ буфера, 10 мкМ MgCl₂, 5 мкМ ДТТ, 0,5 мг белка экстракта и 0,02 МКю оротовой кислоты - 2¹⁴C, разбавленной до 1 мкМ немеченным соединением. Инкубация проводилась 5-30 мин. при 28°C и прекращалась быстрым охлаждением смеси на льду и добавлением к ней 0,1 мл 3 н HClO₄. Через 20 мин. смесь нейтрализовали добавлением 0,1 мл 3 н КОН, выдержали еще 10 мин. при 0°C и образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин.). 0,1 мл суперна-

танта наносили на точку бумажной хроматограммы. Использовалась бумага Филтрак ФН-18 (ГДР). Восходящую хроматографию проводили в системе I: изомаляновая кислота - 25% водный аммиак - вода (59:4:37); для уточнения данных иногда использовались и системы II: изопропанол - 25% водный аммиак-вода (14:1:5), или III: этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (3:1:1). После завершения разделения (18-20 часов при 20°C) хроматограммы высушивались, соответствующие полосы разрезали на зоны шириной в 1 см, в которых определяли содержание радиоактивности методом жидкостной сцинтилляции. Использовали сцинтилляционную жидкость Жс 107 (Харьковский химзавод), измерения проводились на приборе Интертехник СЛ-200 (Франция).

Активность УМФ-пирофосфатазы определялась как описано ранее /Муйжников, 1978/. Для выяснения активности фермента относительно 6-азаурацила, в инкубационной смеси урацил был заменен 10 нМ 4,5 - ^{14}C 6-азаурацилом. Радиоизотопный метод применялся и для определения общего количества урацила, образовавшегося из оротовой кислоты при ее инкубации с белковой фракцией бесклеточного экстракта *V. adhaerans* 9. Инкубационная смесь содержала в 0,4 мл: 40 мкМ КФ буфера, 8 мкМ MgCl_2 , 4 мкМ ДТТ, 0,1 мкМ оротовой кислоты - ^{14}C и 0,5 мг белка экстракта. В некоторых случаях в инкубационную смесь вводилось 1 мкМ 6-азаурацила и 0,3 мкМ ФРФФ. Реакция прекращалась и анализ накопления урацила проводился хроматографией на бумаге в системе II как описано выше. При работе с изотопами были учтены требования к санитарным условиям и технике безопасности, выдвигаемые "Основными правилами по работе с радиоизотопами" - ОСП-72 (14).

Активность ОМФ и УМФ-пирофосфатаз и ОМФ декарбоксилазы определяли спектрофотометрически. Инкубационная смесь для изучения активности пирофосфатаз содержала в 0,5 мл 50 мкМ КФ буфера, 10 мкМ MgCl_2 , 25-40 нМ основания, 100 нМ ФРФФ, 5 мкМ ДТТ и 0,7 мг белка экстракта. Для изучения ингибции реакций к смеси были добавлены 100 нМ 5-азаоротовой кислоты или 6-азаурацила.

ОМФ-пирофосфатазную реакцию останавливали добавлением 1,5 мл охлажденной 5% хлорной кислоты. Смесь выдерживали

10 мин. при 0°C , центрифугировали и спектрофотометрировали на приборе "Спекорд-УВ-Вис" (ГДР) против аналогично составленной и обработанной смеси без оротовой кислоты. За единицу активности фермента принимали количество белка, вызывающего в данных условиях снижение УФ-абсорбции смеси при 290 нм на 0,01 оптическую единицу в течение часа при 28°C .

УМФ - пирофосфатазную реакцию останавливали добавлением 1,5 мл 1,5% раствора додецилсульфата натрия, содержащего 50 мкМ ЭДТА. Смесь выдерживали 30 мин. при $+10^{\circ}\text{C}$, центрифугировали, добавляли к ней 0,1 мл 5н Na OH и спектрофотометрировали. За единицу активности фермента принимали количество белка, вызывающего снижение УФ-абсорбции смеси при 282 нм на 0,01 оптическую единицу в течение часа при 28°C .

Активность ОМФ декарбоксилазы определяли в инкубационной смеси, которая в 0,5 мл содержала: 50 мкМ КФ буфера, 10 мкМ MgCl_2 , 5 мкМ ДТТ, 20 нМ ОМФ и 0,1 мг белка экстракта. Для изучения ингибирования реакции в смесь добавлялась 40 нМ 6-азаурацила или 40 нМ 6-азаурацила и 100 нМ ФРФФ, или 40 нМ 6-аза УМФ. Реакцию останавливали хлорной кислотой как описано выше. За единицу активности фермента принимали количество белка экстракта, вызывающего снижение УФ-абсорбции смеси при 272 нм на 0,01 оптическую единицу в течение часа при 28°C .

Используемые в реакциях количества оротовой кислоты, урацила и ОМФ находились на пределе чувствительности прибора "Спекорд УВ-Вис", и измерения проводились в режиме А0-20 с ручной коррекцией абсолютных величин абсорбции.

Результаты и их обсуждение

Штамм *Bacillus adhaerans* 9 был выделен из пробы почвы, взятой из верхнего горизонта (A_0) лесной подзолистой почвы в окрестностях г.Риги. Штамм трансформировал оротовую кислоту только в условиях кометаболизма - в качестве дополнительного источника питания. Изучение биохимических свойств *B. adhaerans* 9 показала, что на полной синтетической среде его рост подавляется 0,05% концентрациями 5-азаоротовой кислоты и 6-азаурацила. Ингибиторное воздействие этих соединений снижалось равной концентрацией оротовой кислоты (табл. I). По ка-

Таблица I

Рост *Bacillus adhaerans* на различных средах, содержащих производные пиримидинов

Производное	Рост	Производное	Рост
Контроль	0,96	Оротовая к-та + азаурацил	1,25
Оротовая кислота	1,05	Оротовая к-та + азауридин	1,08
Урацил	1,12	Оротовая к-та + 5-азаоротовая к-та	0,98
6 азаурацил	0,15	Урацил + 6-азаурацил	1,12
6 азауридин	0,18	5-азаоротовая к-та	0,25

Рост определялся в 5 мм кюветах на ФЭК-56 М при 6-ом фильтре 48 часов после засева культуры в жидкую среду.

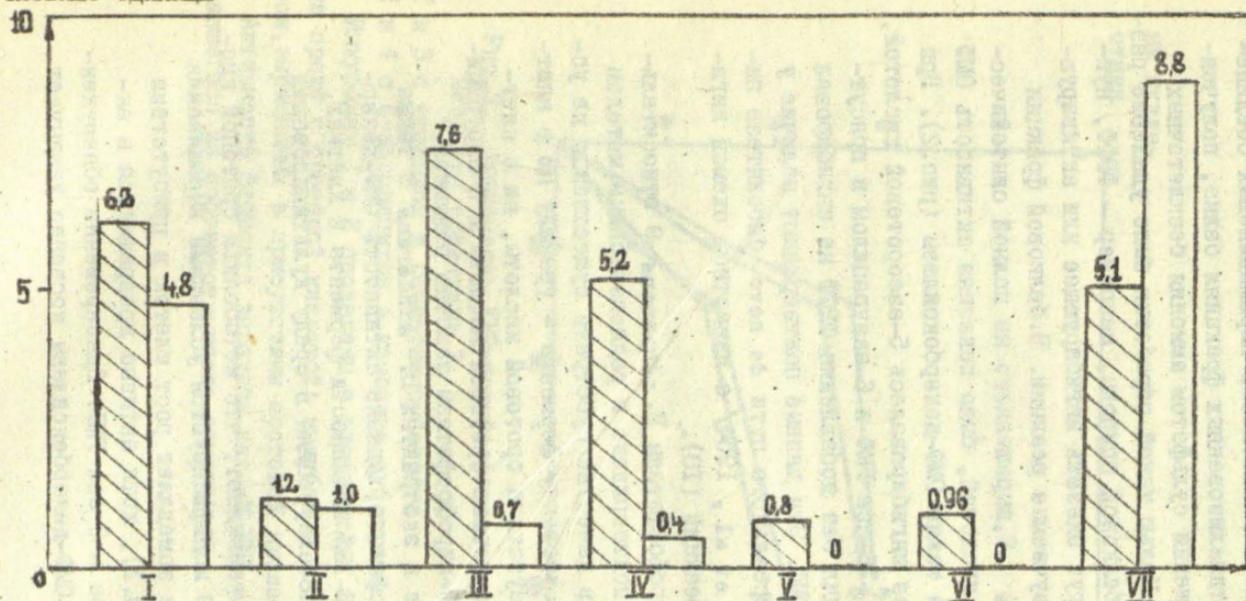


Рис. 2. Активность некоторых ферментов метаболизма оротовой кислоты в белковой фракции экстрактов *Bacillus adhaerens* 9

Активность ферментов определена спектрофотометрическим методом.

▨ - экстракт из клеток, росших в присутствии оротовой кислоты

□ - экстракт из клеток, росших в присутствии оротовой кислоты и 6 азаурацила

I-ОМФ-пирофосфатаза; II-то же в присутствии 5 азаоротовой кислоты; III-ОМФ-декарбоксилаза; IV -ОМФ-декарбоксилаза в присутствии 6 азаурацила; V-то же в присутствии 6 азаурацила и ФРФФ; VI-то же в присутствии 6 азаУМФ; VII-УМФ-пирофосфатаза. Время инкубации во всех случаях I час.

рактору устойчивости к 6-азаурацилу *B. adhaerans* 9 схож с ранее описанными штаммами *Mycobacterium* spp. I07 и 47 (7).

Активность ферментов метаболизма пиримидиновых соединений определялась в отдиализованных фракциях белка, полученных при 90%-ном насыщении сульфатом аммония бесклеточных экстрактов бактерий. Целью такой обработки было удаление различных соединений небелковой природы, например - ФРФФ, нуклеозидов, которые могут оказать ингибирующее или активирующее воздействие на изучаемые реакции. В белковой фракции экстракта *B. adhaerans* 9, выращенного на полной синтетической среде с оротовой кислотой, была показана активность ОМФ и УМФ пирофосфатаз, а также ОМФ-декарбоксилазы (рис.2). При этом ОМФ-пирофосфатаза ингибировалась 5-азаоротовой кислотой, а ОМФ-декарбоксилаза - 6-аза УМФ и 6-азаурацилом в присутствии ФРФФ. 6 азаурацил без добавления ФРФФ не ингибировал декарбоксилирование ОМФ. Эти данные подтверждают наличие у *B. adhaerans* 9 универсального пути *de novo* биосинтеза пиримидинов / Lieberman et al, 1954/ с известной схемой ингибирования отдельных реакций (10)..

Активность УМФ-пирофосфатазы *B. adhaerans* 9 относительно 6-азаурацила была подтверждена и радиоизотопным методом (рис.3). 6-азаурацил в качестве субстрата существенно не уступает естественному субстрату фермента - урацилу ни в клетках, выращенных в присутствии оротовой кислоты, ни в клетках, выращенных в присутствии оротовой кислоты и 6-азаурацила, где активность УМФ-пирофосфатазы заметно повышена.

В последнем случае в экстрактах *B. adhaerans* 9 также обнаружена ОМФ пирофосфатаза, однако активность ОМФ-декарбоксилазы составляет 5-10% активности фермента в клетках, росших без добавления 6-азаурацила в среду культивирования (рис.2).

Полученные данные указывают, что метаболизм оротовой кислоты у *B. adhaerans* 9 модифицируется условиями выращивания штамма. 6-азаурацил не замедляет рост клеток в присутствии оротовой кислоты (табл.1), хотя активно превращается в активную форму ингибитора - 6 аза УМФ. Одновременно обнаруженная низкая активность ОМФ-декарбоксилазы косвенно указывает

нМ нукле-
отида

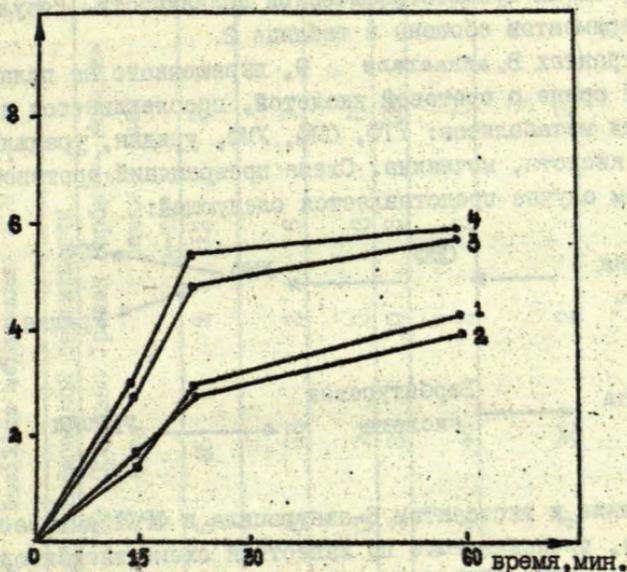


Рис.3. Активность УМФ-пирофосфатазы в экстрактах *Bacillus adhaerans* 9

1 и 3 с урацилом в качестве субстрата
2 и 4 с 6-азаурацилом в качестве субстрата.

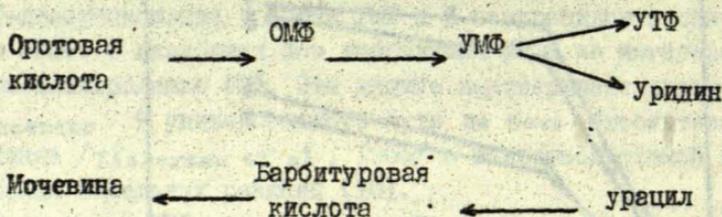
Инкубации 1 и 2 проведены с экстрактами из клеток, выращенных на среде с оротовой кислотой; инкубации 3 и 4-с экстрактами клеток, выращенных в присутствии оротовой кислоты и 6-азаурацила.

Активность фермента выражена как нМ УМФ или 6 аза УМФ, образовавшегося из соответствующего основания.

на существование обходного пути метаболизма оротовой кислоты у *V. adhaerans* 9.

Применением радиоизотопного метода мы пытались проследить схему метаболизма оротовой кислоты в экстрактах *V. adhaerans* 9 в зависимости от присутствия 6-азаурацила в среде культивирования. Метаболиты оротовой кислоты идентифицировались по их хроматографической подвижности. Результаты этих экспериментов обобщены в таблице 2.

В экстрактах *V. adhaerans* 9, выращенного на полной синтетической среде с оротовой кислотой, прослеживается накопление шести метаболитов: УТФ, ОМФ, УМФ, уридин, урацил, барбитуровая кислота, мочевина. Схема превращений оротовой кислоты в этом случае представляется следующей:



Добавление к экстрактам 6-азаурацила и ФРФФ вызывает последствия, предсказуемые по известной схеме ингибиторного действия 6-аза УМФ (10) (табл.2).

Накопление метаболитов оротовой кислоты характеризуется как содержание радиоактивной метки (в % от общего числа импульсов на хроматограмме) в зоне хроматографической подвижности (R_f) соответствующего свидетеля. "-" представлено, если радиоактивность в данной зоне была на уровне фона.

ЭI - экстракт из клеток, выращенных на среде с оротовой кислотой; ЭII - экстракт из клеток, выращенных на среде с оротовой кислотой и 6 азаурацилом.

Оро-оротовая кислота, У-уридин, Ура-урацил, БК-барбитуровая кислота, X-неидентифицированное соединение. БК и мочевина - потенциальные продукты окислительного пути расщепления урацила, который, очевидно, присущ для *V. adhaerans*.

Таблица 2

Количественная характеристика продуктов метаболизма оротовой кислоты - $2^{14}C$
в экстрактах *Bacillus adhaerans* 9^x.

№ п.п	Характеристика экстракта и инкубации	Зона хроматографической подвижности								
		УТФ	ОМФ	УМФ	Оротовая к-та	Уридин	Барбитуровая к-та	Мочевина	X	Урацил
1	ЭI + оротовая к-та	9	II	6	46	2	12	2	0	18
2	ЭI + оротовая к-та + 6 азаурацил	3	4	6	62	2	6	7	0	9
3	ЭI + оротовая к-та + 6 азаурацил + ФРФФ	0	22	0	78	0	0	0	0	0
4	ЭII + оротовая к-та	2	20	2	33	10	3	3	20	7
5	ЭII + оротовая к-та + 6 азаурацил	2	5	4	48	2	0	I	29	10
6	ЭII + оротовая к-та + 6-азаурацил + ФРФФ	I	5	4	38	2	I	2	26	2I

X - пояснения см. в тексте.

Судя по нашим данным расщепление урацила у *V. adhaerans* 9, протекает по окислительному пути катаболизма. Это было подтверждено и изучением хроматографическими методами (7) превращений экзогенного урацила в процессе культивирования штамма.

В экстрактах клеток, выращенных в присутствии оротовой кислоты и 6-азаурацила, значительно занижено образование уридиловых нуклеотидов от оротовой кислоты, можно отметить накопление ОМФ, что свидетельствует о нарушении процессов её обмена. Среди метаболитов оротовой кислоты появляется новый пик радиоактивности-Х. R₁ - величина этого соединения в системе I = 0,37, что несколько больше оротовой кислоты (0,32), меньше УМФ (0,41) и барбитуровой кислоты (0,46). Соединение слабо абсорбирует УФ-лучей, выделить ее в препаративных масштабах и идентифицировать нам не удалось.

Повышение концентрации 6-азаурацила в экстрактах приводила к активизации образования соединения X из оротовой кислоты. Добавление к экстрактам 6-азаурацила и ФРФФ способствовало исчезновению соединения X и активному образованию урацила. Маловероятно, что экзогенный ФРФФ в этом случае до такой степени активировал ОМФ - пирофосфатазу, что накопление урацила объяснима расщеплением УМФ, образовавшегося впоследствии слабой, хотя и заметной, активности ОМФ-декарбоксилазы экстрактов. Результаты, приведенные в рис. 2, указывают, что уже двухкратный перевес концентрации 6-азаурацила над ОМФ в присутствии ФРФФ на 90-95% ингибировал активность ОМФ-декарбоксилазы. При изучении накопления урацила в экстрактах *V. adhaerans* 9 концентрация 6-азаурацила в 10 раз превышала концентрацию оротовой кислоты.

Стимулирующее действие 6 аза УМФ на образование урацила из оротовой кислоты была обнаружена и в белковой фракции экстракта клеток, выращенных в присутствии 6-азаурацила (рис. 4). Неожиданностью явилось обнаружение нами у тиаминпирофосфата аналогического, хотя менее выраженного чем у 6 аза УМФ, свойства стимулировать образование урацила из оротовой кислоты.

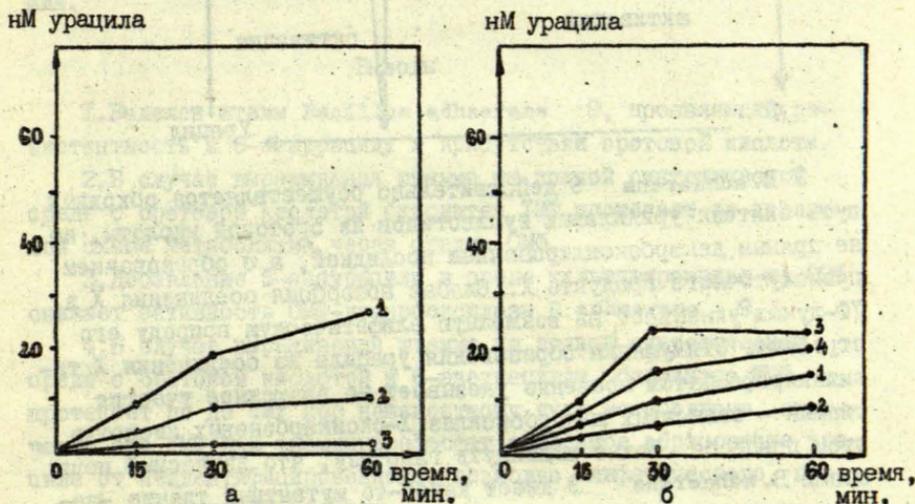
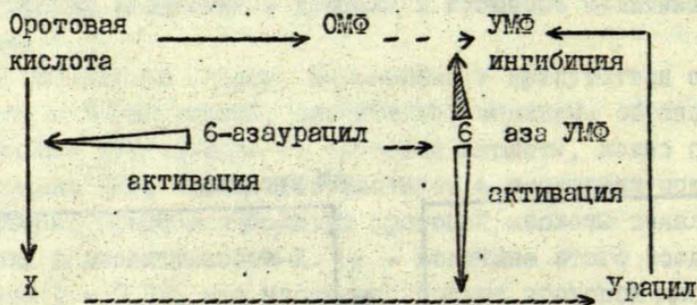


Рис.4. Накопление урацила из оротовой кислоты $2-^{14}C$, в экстрактах *Bacillus adhaerans*

- а) -экстракт клеток, выращенных в присутствии оротовой кислоты
б) -экстракт клеток, выращенных в присутствии оротовой кислоты и 6 азаурацила

- 1) инкубационная смесь с оротовой кислотой;
2) то же с 6 азаурацилом;
3) то же с 6 азаурацилом и ФРФФ;
4) то же с тиаминпиррофосфатом.

Схема метаболизма оротовой кислоты в экстрактах *V. adhaerans* 9, выращенного в присутствии 6-азаурацила нам представляется следующей:



У *V. adhaerans* 9 действительно осуществляется обходный путь синтеза уридилowych нуклеотидов из оротовой кислоты, но не прямым декарбоксилированием последней, а с образованием промежуточного продукта X. Слабая абсорбция соединения X в УФ-лучах указывает на возможную алифатическую природу его строения. Стимуляция образования урацила из соединения X тиамин-пирофосфатом косвенно указывает на возможное участие тиамин-зависимых декарбоксилаз X-оксикарбоновых кислот в этом процессе. Можно выдвинуть гипотезу, что изучаемый нами штамм *V. adhaerans* 9 имеет какой-то мутантный тиамин-зависимый фермент - декарбоксилазу, который в результате этой мутации: а) приобрел способность использовать в качестве кофактора 6-аза УМФ; б) приобрел способность декарбоксилировать какое-то производное оротовой кислоты (возможно алифатическую β -окси-карбоновую кислоту). Следовательно, добавление 6-азаурацила в среде культивирования подавляет образование УМФ из оротовой кислоты через стадию ОМФ, но открывает обходный путь биосинтеза УМФ, в котором, не исключено, участвуют тиамин-зависимые декарбоксилазы. Присутствие экзогенной оротовой кислоты для снятия ингибиторного воздействия 6-азаурацила можно объяснить недостаточной эффективностью обходного пути биосинтеза УМФ для обеспечения клетки пиримидинами за счет "внутренних ресурсов", или же подавлением *de novo* биосинтеза оротовой кислоты ОМФ, который накапливается в присутствии 6-азаурацила (табл.2). Кос-

венным подтверждением правомерности выдвинутой гипотезы служило бы выделение дефектных по тиаминовыми ферментами микроорганизмов, которые были бы 6-азаурацил-зависимы. Надо отметить, что такие мутанты в нашей лаборатории получены, изучение их свойств проводится. Для подтверждения гипотезы о участии мутантных тиаминовых ферментов в метаболизме оротовой кислоты у *B. adhaerans* 9 необходимы дальнейшие исследования.

Выводы

1. Выделен штамм *Bacillus adhaerans* 9, проявляющий резистентность к 6-азаурацилу в присутствии оротовой кислоты.

2. В случае выращивания штамма на полной синтетической среде с оротовой кислотой биосинтез УМФ протекает по известной схеме метаболизма через стадию ОМФ.

3. Добавление 6-азаурацила в среде культивирования на 90% снижает активность ОМФ-декарбоксилазы *B. adhaerans* 9.

4. В случае выращивания штамма на полной синтетической среде с оротовой кислотой и 6-азаурацилом, биосинтез УМФ протекает по до сих пор неизвестному пути метаболизма, включая 6 аза УМФ или тиаминпирофосфат зависимое образование урацила от неидентифицированного, возможно алифатического, производного оротовой кислоты.

Литература

1. Lieberman I., Kornberg A., Sinems E.S.-J.Amer.Chem.Soc., 76, p.2844, 1954.
2. O Donovan G.A., Neuhard J.-Bacteriol.Rev., 34, p.278, 1970.
3. Vogel G.B., Van der Drift C.-Bacteriol.Rev., 40, p.403, 1976.
4. Škoda J., Šorn F.-Biochem.Biophys.Acta, 28, p.659, 1958.
5. Kulhanek M., Svatek E., Tadra M.-Folia Microbiol., 10, p.142, 1965.
6. Витол М.Я., Шапошников В.М., Швачкин Ю.Р.-ДАН АН СССР, 1967, 174, с.1202.
7. Муїжницьк И.О.- В кн.: Использование и трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений микроорганизмами. Рига: ЛГУ им. П.Стучки, 1978, с.4.
8. Зинченко В.В., Бирякова И.В.-Микробиология, 1979, 48, с.28.
9. Jund R., Lacroute F., J.Bacteriol., 109, p.196, 1972.
10. Škoda J.-In: Handbook of Experimental Pharmacology, 14, p.349, 1976.
11. Муїжницьк И.О., Витолс М.Я.-В кн: Современные методы исследования нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Казань: КГУ им.В.И.Ульянова-Ленина, 1980, с.47
12. Красильников Н.А. Определитель бактерий актиноциетов, М, 1951.
13. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr F., Randall R.J.- J.Biol.Chem., 193, p.265, 1951.

Межиня Г.Р., Каминска Э.В.
ЛПУ им. П. Стучки, Ин-т микробиол. -
гии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР

Изучение различных способов стерилизации отрубей

В последние годы резко возрос интерес к получению различных биологически активных препаратов путем поверхностного культивирования микроорганизмов на твердых субстратах - отходах сельского хозяйства и пищевой промышленности. Широкое применение нашли отруби, которые характеризуются высоким содержанием питательных веществ. Они содержат экстрактивные вещества - около 51%, белок - 12%, жиры - 3%, целлюлозу - 16%, зола - 6%, в значительных количествах калий, фосфор и витамины (тиамин, рибофлавин пантотеновая кислота и др). Отруби богаты разнообразными микроорганизмами - 1 г отрубей содержит несколько сотен тысяч плесневых грибов и несколько миллионов бактерий (1).

Отруби являются сравнительно трудным объектом стерилизации по сравнению с соломой, травяной мукой и др. жидкими отходами.

При производстве ферментных препаратов применяется паровая стерилизация под давлением (2). Влажное тепло в виде насыщенного пара под давлением является наиболее верным легкоуправляемым средством уничтожения всех видов микроорганизмов. При этом влажное тепло по бактерицидным свойствам значительно превосходит сухое тепло. Поэтому стерилизация паром по степени ее распространения в практике занимает первое место (3). Однако стерилизация питательных сред паром в промышленных условиях сравнительно длительный процесс (5-8 ч.). Для стерилизации отрубей требуется специальная аппаратура с перемешиванием. Во время стерилизации происходит клейстеризация крахмала и среда на основе отрубей становится тестообразной, что является отрицательным явлением не только при транспортировке ее, но и для культивирования аэробных микроорганизмов.

Целью настоящей работы явилось изучение различных способов стерилизации отрубей и их сравнительная оценка.

Материалы и методы

Объектом исследования служили пшеничные отруби. Агентом стерилизации служили тепло и различные химические вещества: перекись водорода, перуксусная кислота, муравьиная кислота, серная кислота, формальдегид. Условия стерилизации представлены в таблице.

После стерилизации пшеничные отруби внесли в стерильную питательную среду Хотингера. Колбы ставились в термостате при 28°C на качалке в течение 24 ч. После этого проверялась стерильность питательной среды высевом на чашках Петри.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты изучения различных способов стерилизации пшеничных отрубей представлены в таблице.

Данные таблицы свидетельствуют, что 6%-ный раствор перекиси водорода в сочетании с нагреванием до 55°C в течение 1 ч. обеспечивает стерильность отрубей. Более низкие температуры и концентрации раствора перекиси водорода не обладают бактерицидными свойствами при обработки пшеничных отрубей. Добавление муравьиной кислоты в концентрации 1% значительно повышает стерилизационную способность перекиси водорода.

Положительной стороной является то, что перекись водорода полностью расходуется в процессе окисления, не давая побочных продуктов. Перекись водорода разлагается с образованием воды и кислорода.

Перуксусная кислота или надуксусная кислота по бактерицидным свойствам в 5 раз выше уксусной кислоты (3). Механизм действия перуксусной кислоты имеет много общего с механизмом действия перекиси водорода. Перуксусная кислота является мощным окислителем. При этом она разлагается с образованием уксусной кислоты, воды, кислорода. Особую популярность как бактерицид перуксусная кислота приобрела в Чехословакии, где она применяется в сочетании с перекисью водорода.

да и серной кислоты ("Перстерил"). Перстерил содержит 36-40% перуксусной кислоты, 7-8% перекиси водорода и максимум 1% серной кислоты. Под воздействием 0,05 - 1,00% раствора перстерила погибают все виды микроорганизмов и их споры (3).

Эти литературные данные подтвердились и в наших опытах при обработке пшеничных отрубей (табл.)

Действие перуксусной кислоты проявляется очень быстро - 1% раствор при комнатной температуре в течение 0,5 ч. обладает высоким бактерицидным свойством (табл.). Кроме того остатки уксусной кислоты в отрубях могут быть использованы микроорганизмами как источник углерода.

Формальдегид - альдегид муравьиной кислоты по данным таблицы в концентрации 2% раствора и выше обеспечивает стерильность пшеничных отрубей. Формальдегид ядовит; поэтому в опытах обработанные отруби формальдегидом выдерживали при 105°C сравнительно длительное время (12-24 ч.), чтобы создавать возможность более полной летучести формальдегида. В связи с этим формальдегид не может быть рекомендован для стерилизации отрубей, предназначенных для выращивания микроорганизмов.

По данным таблицы видно, что при стерилизации отрубей паром под давлением важную роль играет содержание воды. Воздушносухие отруби, выдержанные при 120°C в течение 1 ч., нестерильны. При увлажнении отрубей стерилизационная способность тепла увеличивается.

Для сухого жара время термической гибели значительно продолжительнее и температура выше по сравнению с влажным теплом. Сухожарная стерилизация гарантирует стерильность пшеничных отрубей при их стерилизации в течение 2 ч. при температуре 150°C. При этом структура отрубей практически не меняется.

Таким образом проведенные опыты показывают, что такие химические вещества, как перуксусная кислота и перекись водорода в сочетании с нагреванием позволяют получить практически стерильный материал для выращивания микроорганизмов. При этом структура отрубей практически не меняется и сокращается время, стерилизации и расходы тепловой и электрической

энергии по сравнению с стерилизацией паром под давлением.

Таблица

Стерилизационная способность различных физико-химических средств при обработке пшеничных отрубей

Агент стерилизации	Концентрация, %	Время обработки, мин.	Температура, °C	Эффект воздействия
Перекись водорода -H ₂ O ₂	8	6	18	нестерильно
"-	6	1	40	"-
"-	6	1	55	стерильно
"- +1% муравьиная кислота	3	1	55	"-
Перуксусная кислота CH ₃ COOOH	1	0,5	18	стерильно
"- + 0,1% перекись водорода + 0,1% серной к-ты	0,5	0,5	18	нестерильно
Формальдегид - HCHO	3	0,5	18	стерильно
"-	1	24	105	нестерильно
"-	2	24	105	стерильно
"-	5	12	105	"-
Влажное тепло под давлением				
воздушносухие отруби		1	120	нестерильно
отруби: вода 1:1		1	120	стерильно
"- 1:2		1	120	"-
Сухожарная стерилизация				
воздушносухие отруби		2	150	стерильно

Литература

1. Межня Г.Р., Дунце М.Э. Новые виды сырья для микробиологических производств. М., 1978. - 72 с.
2. Калунянц К.А., Голтер Л.И. Микробные ферментные препараты. Технология и оборудования. М., 1979. - 304 с.
3. Валиков В.И. Средства и методы стерилизации, применяемые в медицине. М.: Медицина, 1973 - 368 с.

Межняя Г.Р., Суйне О.Э.
ЛГУ им. П. Стучки ВНИИ МорГео (Рига)

Оценка пригодности фуцелларана для микробиологических целей

Для выращивания микроорганизмов широко используют плотные питательные среды. Основными компонентами их являются гелеобразующие вещества, среди которых главное место принадлежит агар-агару (1,2).

Потребность на агар-агар в разных отраслях народного хозяйства, в т.ч. и в микробиологии возрастает с каждым днем, хотя уже в настоящее время он является резко дефицитным сырьем, часть которого за высокую стоимость закупается за границей.

Несмотря на широкую применяемость, агар-агар имеет ряд существенных недостатков, таких как, чувствительность к низким значениям pH питательных сред, к действию высоких температур и к повторным термическим обработкам.

В связи с вышесказанным данная работа посвящена решению двух вопросов - поиску нового заменителя агар-агара, лишенного упомянутых недостатков, и определению оптимальных условий приготовления плотных питательных сред с использованием нового гелеобразующего компонента.

На основе ранее проведенных работ (3) для этой цели нами был выбран фуцелларан - агароподобное гелеобразующее вещество, получаемое из водорослей **Балтийского** моря фуцелларий (*Furcellaria fastigiata*), производимое в СССР (Эстонская ССР, Латвийская ССР и др.). До сих пор фуцелларан находит применение только в кондитерской промышленности для изготовления жележных кондитерских изделий.

Химический состав и физико-химические свойства фуцелларана и агар-агара даны в таблицах 1-3 (3,4).

Сопоставляя основные химические показатели фуцелларана и агар-агара из водорослей анфельций (*Ahnfelita plicata*) следует сказать, что фуцелларан отличается более высоким содержанием общей золы, азота и азотистых веществ (табл. I).

Результаты исследований углеводного состава фуцелларана и литературные данные о составе агаров советского и японского производства (табл.2) свидетельствуют о том, что по углеводному составу фуцелларан не имеет большого отличия от агаров, полученных из других видов водорослей.

Физико-химические данные показывают (табл.3), что по прочности, температурам плавления и застывания 0,85%-ного студня фуцелларан уступает студням агара. Но увеличение содержания сухого вещества до 1,7% дает возможность получить студни фуцелларана, соответствующие требованиям ГОСТ № 17206-71 (5). Температура плавления слизиевой кислоты для фуцелларана и других видов агара колеблется в пределах 214-223°C (3,4).

Оценка пригодности фуцелларана для микробиологических целей проводилась со следующими штаммами: *Brevibacterium* sp. 22, *Brevibacterium flavum* RC- II5, *Micrococcus glutamicus* 95, *Escherichia coli* ML-52, *Escherichia coli* II-12, *Pichia fermentans* ВКМ у - 296, *Zygosaccharomyces mognolium* ВКМ у - 879, *Trichosporon cutaneum* R-3, дрожки винодельческие. Первые пять штаммов выращивали на бульоне, а последние четыре - на солодовом сусле при введении в количестве 1,4 - 3,0% гелеобразующего компонента - фуцелларана (отбеленного или неотбеленного) или бактоагара фирмы "Ферак". Результаты экспериментов показали, что все проверенные штаммы хорошо растут и образуют колонии на средах, содержащих фуцелларан отбеленный в концентрации 2,2% и выше, или неотбеленный 2,0% и выше. Особенно ценным показателем фуцелларана, имеющим огромное значение в микробиологии при изготовлении плотных питательных сред, является термо- и рН стойкость, т.е. при повторном нагревании и при сравнительно низких значениях рН среды (до 3) прочность студня практически не меняется, что не наблюдается на средах, содержащих агар-агар. Кроме того, фуцелларан имеет способность образовывать менее твердую поверхность питательной среды по сравнению с агар-агаром, что способствует лучшему росту микроорганизмов.

Таблица I

Химический состав фуццелларана и агар-агара
из анфальции

Наименование	Содержание, % от сод. сухих веществ	
	Фуццелларан	агар-агар
Влажность	18,25	18,00
Азот общий	0,43	-
Азотистые вещества	2,69	1,0 - 2,0
Сырая клетчатка	0,29	-
Органические вещества	66,46	-
Зола общая	15,29	6,55
Зола растворимая в воде	14,33	-
Зола нерастворимая в воде	0,93	-
Зола нерастворимая в 10% HCl	0,34	-
Элементный состав зола:Ca	2,95	1,44
Mg	0,21	0,125
Fe	0,02	0,087
P	0,003	0,003
SO ₄	16,45	не опред.
J	следи	-

Таблица 2

Углеводный состав фуццелларана и разных агаров советского и японского производства

Наименование	Содержание, % от сод. сухих веществ			
	Клетчат- ка	РВ пос- ле ги-	Галак- тоза	Глюкоза
	прод.			
Фуццелларан	0,29	45,35	29,88	неопр.
Агар беломорский	0,09	54,36	27,20	13,80
Агар приморский	0,36	59,26	29,50	11,90
Агар сахалинский	0,06	45,60	35,90	9,8
Агар курильский	0,09	44,90	-	-
Агар японский	0,03	56,70	27,00	14,2

Таблица 3

Физико-химические свойства фуццелларана и агар-агара (0,85%-ного студня)

Наименование	Фуццелларан	Агар-агар
Прочность студня в г на сухое в-во	66	не менее 200-300
Падение прочности студня в % после нагревания в течение 2 ч.	5,6	не менее 1000 - 1400
Температура застывания раствора агара в °С	27	не ниже 30
Температура плавления студня в °С	51	не ниже 80
Содержание веществ, нерастворимых в горячей воде в %	0,26	не более 0,3-0,5
Содержание веществ, растворимых в холодной воде	15,27	не более 10-14
Прочность 1,7%-ного студня фуццелларана в г	236	-

Выводы

Результаты химических, физико-химических и микробиологических исследований дает возможность считать фуцелларан из балтийских водорослей достойным заменителем агар-агара при изготовлении плотных питательных сред. Особенно ценными показателями фуцелларана является его термо- и рН стойкость, а также способность образовать менее плотную поверхность студня. В связи с этим использование фуцелларана в микробиологической практике может расширить сырьевую базу и удешевить стоимость плотных питательных сред.

При изготовлении плотных питательных сред рекомендуется использовать фуцелларан отбеленный в концентрации 2,2% и выше, а фуцелларан неотбеленный - 2,0% и выше.

Литература

1. Хвирблянская А.Ю. Микробиологический контроль производства пива и безалкогольных напитков. - М., 1970. - 158 с.
2. Schroder H. Mikrobiologischer Praktikum. Berlin, "Volk und Wissen Volkseigener Verlag", 1975, S. 39-42.
3. Суйне О.Э. Агароподобные продукты из водорослей Балтийского моря Фуцелларан - изучение свойств и способов получения. Дисс. на соиск. учен. степ. канд. техн. наук. - М., 1962.
4. Кизеветер И.В. Технология дальневосточного агара. - Владивосток, Известия ТИПРО, 1952, т.36.
5. Агар микробиологический. ГОСТ 17206-71.

СОДЕРЖАНИЕ

I. Иващенко М.Е., Камрадзе А. Выделение и некоторые свойства Внутриклеточных РНКаз микроскопического гриба <i>Penicillium lanoso-viride</i>	3
2. Знаменская Л.В., Красноперова И.А., Михайлова Л.А. Образование щелочной внеклеточной РНКазы и рост <i>Bacillus intermedius</i> на разных средах	15
3. Знаменская Л.В., Краснов С.И. Метод математического планирования эксперимента применительно к оптимизации биосинтеза бактериальной РНКазы	26
4. Матюшкова Н.А., Калинина Л.Н. Изучение стабильности плазмид группы рВР в некоторых штаммах <i>Escherichia coli</i> . 33	
5. Матюшкова Н.А., Макаренкова Г.Н. Условия трансформации некоторых штаммов <i>Escherichia coli</i> дезоксирибонуклеиновой кислотой группы	42
6. Шарипова Ф.Р., Филатова С.В., Коробкова В.Д. Получение сфероластов и исследование внутриклеточного пула белков и ферментов <i>Bacillus intermedius</i> 7Р	53
7. Иващенко М.Е., Эзе Д.И., Шпрунка И.К. Разработка иммунологической тест-системы детекции ферментативного дезаминирования поли-А	62
8. Вульфа Л.Я., Вилкс С.Р., Романова Н.А. Дезаминирование аденозина культурами ризосферных микроорганизмов	70
9. Ревелиня В.Р. Аденилатдезаминаза <i>Penicillium lanoso-viride</i> . Изменение активности в процессе роста и в зависимости от условий культивирования	74
10. Шафранский А.Б. Аденилатдезаминаза <i>Penicillium lanoso-viride</i> . Выделение и очистка фермента	86
II. Ревелиня В.Р., Шафранский А.Б., Муйжниекс И.Ю. Аденилатдезаминаза <i>Penicillium lanoso-viride</i> . Некоторые свойства фермента	92

12. Звилна Р.Ц., Витол М.Я. Влияние гипоксантина на токсичность аденина у мышей101
13. Муйжниекс И.О. Метаболизм оротовой кислоты у *Bacillus adhaerens* 9 в присутствии 6-азаурацила109
14. Межия Г.Р., Каминска Э.В. Изучение различных способов стерилизации отрубей125
15. Межия Г.Р., Суйне О.Э. Оценка пригодности фуруцелларана для микробиологической целей130

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ МИКРООРГАНИЗМАМИ
Межузовский сборник научных трудов

Редактор проф. Х.Мауриня
Технический редактор И.Фридберга
Корректор И.Фридберга

Подписано к печати 05.II.1981. ЯТ II223. Ф/6 60x84/16.
Бумага №1. 8,8 физ.печ.л. 8,1 усл.печ.л. 6,7 уч.-изд.л.
Тираж 400 экз. Зак. № 2076. Цена 67 к.

Латвийский государственный университет им. П.Стучки
Рига 226098, б. Райниса, 19
Отпечатано на ротапринтере, Рига 226050, ул.Вейденбаума, 5
Латвийский государственный университет им. П.Стучки

399618

44 / 3279

LATVIJAS UNIVERSITĀTES BIBLIOTĒKA



0509013206