

УДК 577.15.02

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАНОГРАММОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ НА МЕМБРАНЕ

К.В. Гончаренко^{1,2}, С.С. Савин^{2,3}, В.И. Тишков^{1,3}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²ООО “Инновации и высокие технологии МГУ”; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Разработана методика определения нанogramмовых количеств формиатдегидрогеназы на мембранах. Проведена оптимизация метода по типу и концентрации медиатора и по концентрации тетранитротетразолия синего. Установлено, что 5-метил-феназин-метасульфат является более эффективным медиатором по сравнению с феназинметасульфатом. В результате тестирования разных типов мембран для проведения анализа выбрана нитроцеллюлозная мембрана, обеспечивающая наименьший фон. Показано, что в оптимальных условиях чувствительность метода составляет 15 нг фермента в пробе.

Ключевые слова: формиатдегидрогеназа *Pseudomonas sp.101*, детекция, мембраны, скрининг.

NAD⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.2, ФДГ) активно исследуется в течение последних десятилетий [1]. Этот фермент представляет большой теоретический и практический интерес. Формиатдегидрогеназа играет очень важную физиологическую роль в жизнедеятельности бактерий, дрожжей, микроскопических грибов и растений. В практическом аспекте ФДГ является наилучшим биокатализатором для систем регенерации NADH, который используется в качестве кофактора сотнями дегидрогеназ.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования по изучению механизма действия и улучшению свойств ФДГ из разных источников. В течение последних лет получены многочисленные мутантные формы формиатдегидрогеназы, которые более чем в сто раз превосходят фермент дикого типа по стабильности и проявляют повышенное сродство к коферменту [2]. В настоящее время основная задача в области белковой инженерии ФДГ – повышение каталитической активности фермента. Для этого планируется использовать разные подходы, в том числе и метод неупорядоченного мутагенеза, называемый “направленная эволюция” (*directed evolution*) [3]. Этот метод не требует детальных знаний о пространственной структуре фермента и прост в исполнении. Его основным недостатком является необходимость скрининга полученной библиотеки мутантов, которая может составлять сотни тысяч колоний.

Настоящее исследование посвящено разработке высокочувствительной методики определения активной ФДГ на мембранах, которые используются для

получения реплик колоний исследуемой библиотеки с исходных чашек Петри. Мы провели расчет примерного количества целевого фермента в одной колонии клеток *E. coli*. Если аппроксимировать колонию полусферой диаметром 1 мм, что соответствует объему 0,25 мм³ и 0,25–0,30 мг сырой биомассы, и учесть, что масса сухих клеток составляет около 1/7 массы сырых клеток, а масса растворимого белка – порядка 45% сухого веса клетки, то в результате получим, что каждый клон должен содержать порядка 12–16 мкг растворимого белка. В случае используемой нами системы экспрессии формиатдегидрогеназы в клетках *E. coli* [4] содержание рекомбинантного фермента составляет не менее 45–50% от общего растворимого белка клетки, т.е. в одной колонии может находиться до 6–8 мкг ФДГ. Для количественного определения ФДГ в колонии клеток разрабатываемая методика должна быть способной определять как минимум в 10 раз меньшие количества, т.е. ее чувствительность должна быть не менее 0,5 мкг ФДГ в пробе.

Экспериментальная часть

В работе мы использовали следующие реактивы: мутантную рекомбинантную формиатдегидрогеназу из бактерии *Pseudomonas sp.101* PseFDH GAV (ООО “Инновации и высокие технологии МГУ”, Россия, www.innotech-msu.com), NAD⁺ с чистотой не менее 97% фирмы “Biomol” (Германия), ЭДТА (“extra pure”) (“Fluka”, Швейцария), тетранитротетразолий синий, феназинметофосфат, 5-метилфеназинметафосфат (“Sigma”, США), однозамещенный фосфат на-

трия $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (“ч.д.а.”), формиат натрия HCOONa (“ч.д.а.”) фирмы “Реахим” (Россия),

Измерение активности. Активность формиатдегидрогеназы определяли при 30°C на спектрофотометре “UV-1601PC” фирмы “Shimadzu” по поглощению образующегося NADH на длине волны 340 нм ($\epsilon_{340} = 6220\text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Измерения проводили в $0,1\text{ М}$ натрий-фосфатном буфере ($\text{pH } 7,0$), содержащем NAD^+ (10 мг/мл) и формиата натрия $0,3\text{ М}$. Активность ФДГ рассчитывали, исходя из коэффициента поглощения NADH .

Влияние феназинметасульфата и 5-метилфеназинметасульфата. Спектры поглощения реакционной смеси записывали со скоростью 60 нм/мин на спектрофотометре “UV-1601PC” фирмы “Shimadzu” при 30°C в интервале $340\text{--}800\text{ нм}$. Для измерения использовали $0,1\text{ М}$ натрий-фосфатный буфер ($\text{pH } 7,0$) и $0,3\text{ М}$ формиат натрия. В кювету спектрофотометра (рабочий объем 1 мл , оптический путь 1 см) добавляли 590 мкл премикса, приготовленного из буфера с 10 -кратным избытком формиата натрия, 50 мкл раствора NAD^+ (50 мг/мл), 330 мкл раствора $0,3\text{ мг/мл}$ тетранитротетразолия синего (ТНТ), 10 мкл раствора феназинметасульфата (ФМС) и 5 -метилфеназинметасульфата (5 -метил-ФМС) с концентрацией 1 мг/мл . Кювету термостатировали не менее 10 мин при 30°C в кюветном отделении спектрофотометра. Затем в нее добавляли 20 мкл раствора фермента и через определенные промежутки времени записывали спектры поглощения.

Влияние концентрации тетранитротетразолия синего. Условия эксперимента были аналогичны представленным выше, за исключением того, что концентрацию ТНТ в кювете варьировали в диапазоне $0,033\text{--}0,15\text{ мг/мл}$. Далее записывали кинетические кривые поглощения на длине волны 560 нм .

Детекция формиатдегидрогеназы на мембранах. Определение проводили на нитроцеллюлозной и поливинилидендифторидной (*Immobilon*, *Millipore*) мембранах (НЦ- и ПВДФ-мембраны соответственно). Из-за высокой гидрофобности ПВДФ-мембрану предварительно замачивали сначала в чистом, а затем в 50% -м спирте. Потом мембрану промывали в буферном растворе и давали немного подсохнуть. Далее на мембрану наносили пробы (по 2 мкл раствора фермента с разной концентрацией). Реакцию проводили при комнатной температуре в растворе, содержащем 4 мл $0,1\text{ М}$ натрий-фосфатного буфера ($\text{pH } 7,0$), 2 мл 3 М раствора формиата натрия, $3,3\text{ мл}$ $0,1\text{ мг/мл}$ раствора тетранитротетразолия синего, 100 мкл (1 мг/мл) раствора ФМС или 5 -метил-ФМС,

500 мкл 20 мг/мл раствора NAD^+ (общий объем 10 мл), при постоянном перемешивании около $10\text{--}20\text{ мин}$. Для остановки реакции, мембрану промывали в $0,1\text{ М}$ натрий-фосфатном буфере ($\text{pH } 7,0$).

Количественное определение фермента. После проведения реакции, мембрану высушивали и сканировали на сканере “HP ScanJet 7400c” в формат TIF с глубиной цветопередачи 32 бита и разрешением 600 точек на дюйм . Полученное изображение анализировали с помощью программы “ScanArray Express” Version 3.0 (“PerkinElmer”), при этом измерялась средняя интенсивность и площадь каждого пятна. Для количественной оценки ФДГ брали величину произведения площади пятна на интенсивность, из которой была предварительно вычтена величина фона мембраны.

Результаты и их обсуждение

Для определения ферментов на мембранах по активности в результате реакции должен образовываться окрашенный нерастворимый субстрат. В случае формиатдегидрогеназной реакции оба продукта (NADH и CO_2) растворимы и не поглощают в видимом свете. Для получения нерастворимого окрашенного продукта использовали дополнительную реакцию восстановления тетранитротетразолия синего в нерастворимый формазан образующийся в результате основной реакции NADH . Поскольку NADH не способен непосредственно восстанавливать ТНТ, реакция проводится в присутствии медиатора, в качестве которого используют феназинметасульфат или его производные. Эта реакция широко используется при окрашивании дегидрогеназ в геле при нативном электрофорезе [5] или аналитическом изоэлектрофокусировании [6]. Для обеспечения максимальной активности ФДГ использовали насыщающие ($>20 K_M$) концентрации NAD^+ и формиата ($1,5$ и 300 мМ соответственно).

Спектральные характеристики системы детекции ФДГ

Для определения оптимальных концентраций ТНТ и медиатора необходимо иметь данные о спектральных характеристиках системы. Для этого были записаны спектры поглощения реакционной смеси сразу после добавления фермента в кювету и после завершения реакции. Результаты представлены на рис. 1. На рисунке видно, что максимум поглощения продуктов реакции находится в интервале $560\text{--}600\text{ нм}$, поэтому для получения количественной оценки мы работали в этом интервале длин волн.

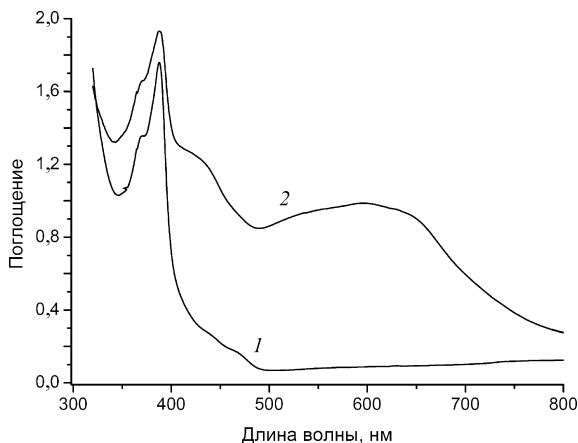


Рис. 1. Спектры поглощения реакционной смеси в начальный момент и после завершения реакции (кривые 1 и 2 соответственно). Концентрации: NAD^+ 20 мг/мл, формиат натрия – 0,6 М, феназин-метасульфат – 0,1 мг/мл, ТНТ – 0,1 мг/мл, 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0) 30°C. Скорость сканирования 60 нм/мин

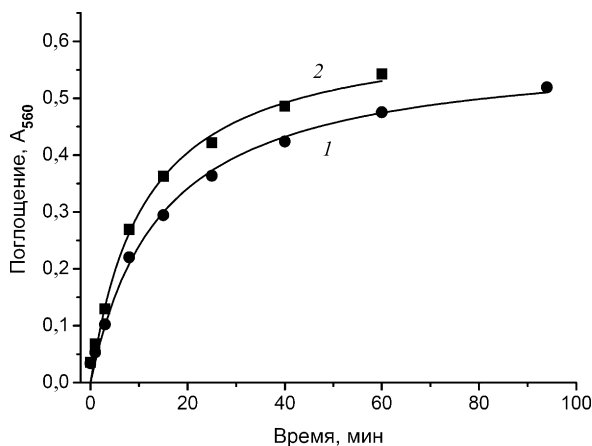


Рис. 2. Зависимость накопления продукта в ходе реакции при использовании в качестве медиаторов ФМС и 5-метил-ФМС (кривые 1 и 2 соответственно). Концентрации: NAD^+ – 20 мг/мл, формиат натрия – 0,6 М, медиатор – 0,01 мг/мл, ТНТ – 0,1 мг/мл, 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0) 30°C

Сравнение эффективности ФМС и 5-Метил-ФМС

В нашем распоряжении было два медиатора – ФМС, который, как правило, используется на практике, и его метильное производное – 5-метил-ФМС. Для сравнения их эффективности через определенные промежутки времени записывали спектры поглощения растворов в идентичных реакционных смесях, за исключением состава медиатора. Затем строили графики зависимости величины поглощения на 560 нм от времени проведения реакции (рис. 2). На рис. 2 хорошо видно, что 5-метил-ФМС более эффективен, чем ФМС, поскольку время, за которое достигается величина поглощения 0,5, отличается примерно в 1,6 раза.

Определение оптимальной концентрации ТНТ

Для определения оптимальной концентрации ТНТ были изучены зависимости накопления продукта формазана при разных концентрациях ТНТ. Оказалось, что при концентрации ТНТ в реакционной смеси больше 0,075 мг/мл скорость образования продукта оставалась практически одинаковой. Поэтому для дальнейшей работы мы выбрали концентрацию ТНТ, равную 0,1 мг/мл.

Количественное определение ФДГ на мембранах

Для детекции использовали 2 типа мембран – на основе нитроцеллюлозы (от трех производителей) и на основе поливинилидендифторида (*Immobilon*), которые нашли наиболее широкое применение в молекулярной биологии. На мембраны наносили пробы (по 2 мкл), содержащие разные количества фермента. Предварительные эксперименты по детекции ФДГ показали, что наиболее высокая чувствительность определения достигается в случае нитроцеллюлозной мембраны фирмы “BioRad”. Кроме того, для нее наблюдается самый низкий фон. Эта мембрана и была выбрана для количественной оценки чувствительности определения ФДГ. В качестве медиатора использовали как ФМС, так и 5-метил-ФМС. Результаты представлены на рис. 3. Видно, что визуальное отличие в эффективности использования ФМС и

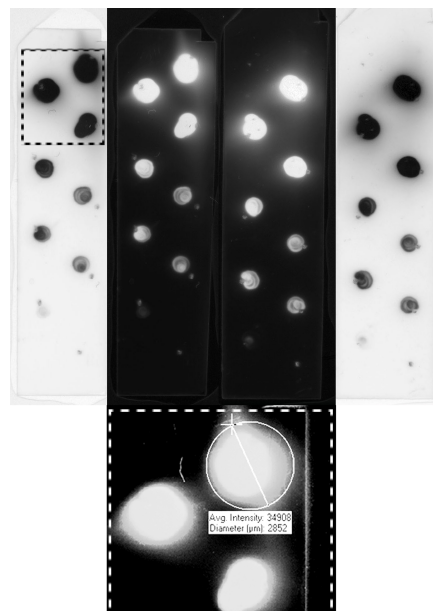


Рис. 3. Детекция формиатдегидрогеназы на нитроцеллюлозной мембране. Окрашивание проводили с использованием в качестве медиаторов ФМС и 5-метил-ФМС (левая и правая мембраны соответственно). В середине приведены инвертированные изображения мембран, использованные для количественного обседа с помощью программы *ScanArray Express*. В нижней части рисунка приведен пример обседа области, выделенной квадратом на левой мембране

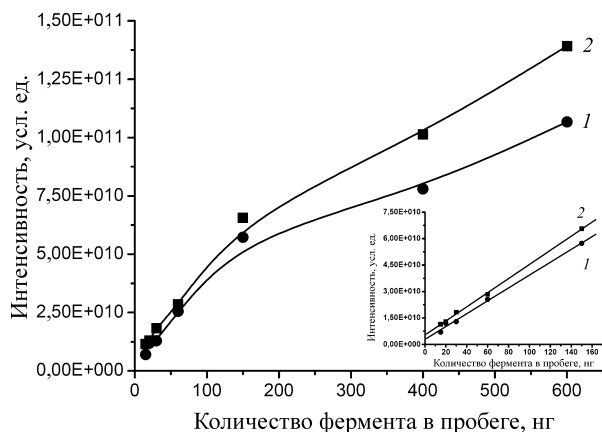


Рис. 4. Зависимость интенсивности окраски от концентрации форматдегидрогеназы в пробе с использованием в качестве медиаторов ФМС и 5-метил-ФМС (кривые 1 и 2 соответственно). Вставка – линейный участок зависимости интенсивности от концентрации на начальном участке

5-метил-ФМС отсутствует, хотя несколько больший фон на пробах с большим количеством фермента позволяет предположить, что 5-метил-ФМС и на мембране более эффективен, чем ФМС. Для количе-

ственной оценки изображение было инвертировано, а интенсивности были переведены в 256 градаций серого. Для расчета интенсивности окраски была использована программа *ScanArray Express* фирмы “Perkin Elmer”, разработанная для количественного обчета ДНК-чипов. Интенсивность окраски пятна рассчитывали как площадь, умноженную на среднюю интенсивность. Размер пятна и среднюю интенсивность рассчитывали самой программой (рис. 3). На рис. 4 представлены зависимости интенсивности окраски от концентрации фермента в пробе при использовании в качестве медиаторов 5-метил-ФМС и ФМС. Видно, что в случае 5-метил-ФМС получается более сильный сигнал. Общий график зависимости интенсивности от количества фермента в пробе не линеен, однако на начальном участке наблюдается хорошая корреляция между величиной сигнала и количеством фермента в пробе. Минимальное количество определяемого фермента в пробе составило 15 нг, что как минимум в 30 раз лучше, чем это требуется для количественной детекции ФДГ в колониях клеток *E. coli* при скрининге мутантных библиотек.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-04-01589-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Попов В.О. // Биохимия. 2004. **69**. С. 1537.
2. Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Engineering*. 2006. **23**. P. 89
3. Arnold F.H., Volkov A.A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999. **3**. P. 54.
4. Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.-R. // *Biotechnol. Bioengineering*. 1999. **64**. P. 187.
5. Sorger H., Aurich H., Fricke B., Vorisek J. // *J. Basic Microbiol.* 1986. **26**. P. 541.
6. Тишков В.И., Галкин А.Г., Гладышев В.Н., Карзанов В.В., Егоров А.М. // *Биотехнология*. 1992. С. 52.

Поступила в редакцию 20.01.10

MEMBRANE DETECTION OF NANOGRAMM AMOUNTS OF FORMATE DEHYDROGENASE

K.V. Goncharenko, S.S. Savin, V.I. Tishkov

(Division of Chemical Enzymology)

The method for detection of nanogram amounts of formate dehydrogenase on membranes was developed. The optimization of the method was carried out for determination of the best mediator and concentration and *tetranitrotetrazolium blue*. It is found that 5-methyl-phenazine methosulfate is more effective mediator than phenazine methosulfate. Different types of membranes were tested and it was shown that nitrocellulose membrane provides the lowest background and the highest sensitivity. Under optimal conditions the detection limit was 15 ng of the enzyme in probe.

Key words: *formate dehydrogenase. Pseudomonas sp.101, detection, membranes, screening.*

Сведения об авторах: Гончаренко Кристина Вадимовна – студентка химического факультета МГУ (vitishkov@gmail.com); Савин Святослав Сергеевич – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН (savinslava@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ и зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).