

УДК 577.151.01

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ЛИЧИНОК КОЛОРАДСКОГО ЖУКА

© 2011 В.О. Цветков, Н.Д. Рябцева, И.А. Шпирная, А.М. Басырова, К.И. Валиахметова,
Р.И. Ибрагимов

ГОУ ВПО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Поступила 27.06.2011

В статье описан способ очистки протеаз насекомых, исследованы физико-химические свойства полученных белков.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, аффинная хроматография, физико-химическая характеристика белков.

Гидролитические ферменты играют ключевую роль во взаимодействии насекомых-вредителей и растений. Для выделения протеаз колорадского жука нами был синтезирован аффинный сорбент на основе полиакриламида с иммобилизованным специфическим субстратом. Была показана возможность выделения ферментов с помощью аффинной хроматографии с высокой степенью очистки. Были определены оптимальные значения pH и температуры для данных ферментов, так, наибольшая активность исследованных ферментов проявляется при pH 8-9 и температуре около 40°C. С помощью SDS-электрофореза был исследован состав и молекулярные массы полученных ферментов, в частности, показано, что их преобладающим компонентом является белок с молекулярной массой 20-30 кДа.

Колорадский жук является одним из опасных вредителей картофеля. Гидролитические ферменты пищеварительного тракта насекомых играют ключевую роль во взаимодействии насекомых с растениями, позволяя насекомому эффективно перерабатывать растительную пищу. В соответствии с составом пищевых субстратов колорадского жука, в тканях насекомых присутствуют ферменты для расщепления белков, жиров и углеводов пищи: протеазы, преимущественно цистеиновые [1], целлюлазы и α -амилазы [2], эстеразы [3], представленные множественными формами [4]. Экспериментальные сведения о гидролитических ферментах малочисленны. В настоящее время наиболее изученными ферментами колорадского жука являются протеазы; так, известно, что основная часть их является низкомолекулярными белками, близкими по свойствам к катепсинам млекопитающих [1, 5], также выявлены протеазы других типов – аспартильная, сериновая и др. [6].

Цветков Вячеслав Олегович, e-mail: zvetkovvo@rambler.ru, *Рябцева Наталья Дмитриевна*, канд. биол. наук, e-mail: natashashch@mail.ru, *Шпирная Ирина Андреевна*, канд. биол. наук, e-mail: i-shia@yandex.ru, *Басырова Альфия Магсумьяновна*, e-mail: basirok@mail.ru, *Валиахметова Карина Ильдаровна*, e-mail: basirok@mail.ru, *Ибрагимов Ринат Исмагилович*, докт. биол. наук, проф., e-mail: ibragimov56@yandex.ru

В связи с этим актуальным представляется изучение состава и свойств гидролитических (и в частности протеолитических) ферментов колорадского жука. В данной работе были выделены протеолитические ферменты из экстракта гомогената личинок колорадского жука, а также исследованы их температурный оптимум, оптимум pH, молекулярная масса и изоэлектрическая точка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для выделения ферментов использовали личинок колорадского жука III стадии развития, собранных в Балтачевском районе РБ. Навеску замороженных личинок гомогенизировали в ступке (5 г) и экстрагировали в трехкратном объеме рабочего буфера (0.05M Трис-HCl, pH 8.0) при 4°C в течение 10 мин. Экстракт дважды центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5417R при ускорении 8000g в течение 10 мин при 4°C.

Для получения аффинного сорбента использовали полиакриламидный гель с высокой степенью сшивки. Навеску акриламида (Biochemica, Германия) с метиленбисакриламидом (Fluka, США) доводили рабочим буфером до 20 мл и растворяли при нагревании (16%-ный ПААГ, T=16, C=40). Навеску желатина растворяли в том же буфере и добавляли к ПААГ до конечной концентрации 0.1%. К раствору ПААГ при интенсивном перемешивании добавляли ТЕМЕД и ПСА (0.1%), затем раствор желатина и выдерживали в течение получаса для полимеризации. Полученный гель гомогенизировали на ножевом гомогенизаторе (MPW-302, Польша), выдерживали в карбонатном буфере (pH 9) с 0.5%-ным глутаровым альдегидом при 37 °C в течение 10 ч для образования ковалентных сшивок между ПААГ и желатином. Затем сорбент переводили в рабочий буфер, вносили в колонку и уравнивали.

Протеолитическую активность белков определяли по скорости гидролиза Na-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида, БАПНА (Sigma, США) [7]. К 70 мкл раствора БАПНА (1 мг/мл) в лунке иммунологического планшета (Helicon,

Германия) добавляли равный объем исследуемого раствора и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в реакционную смесь 35 мкл 30%-ной уксусной кислоты. Оптическое поглощение полученного раствора измеряли на фотоколориметре Labsystems Uniskan (Финляндия) при длине волны 405 нм. За единицу активности фермента (Е) принимали такое количество фермента, которое катализировало расщепление 1 мкмоль субстрата в мин.

Концентрацию белка определяли по Бредфорд [8].

Для определения молекулярного состава полученных ферментов проводили SDS-электрофорез в 12%-ном ПААГ (0.75 мм) по Лэммли [9] в камере для вертикального электрофореза (Biorad, США). Электрофорез вели при постоянном напряжении 90 В и силе тока 70 мА.

Для определения изоэлектрической точки полученных ферментов проводили изоэлектрическое фокусирование в 12%-ном ПААГ (1 мм). Изоэлектрическое фокусирование вели при напряжении 1000 В и силе тока 2 мА.

После электрофореза гели фиксировали в 15%-ной ТХУ в течение 10 ч, затем окрашивали раствором Кумасси R-250 в 8%-ной уксусной кислоте и 25%-ном этаноле в течение 20 мин. Окрашивание проводили при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аффинное выделение протеолитических ферментов осуществляли с использованием сорбента на основе полиакриламидного геля с высокой степенью сшивки.

В качестве лиганда нами был предложен желатин, представляющий собой субстрат протеолитических ферментов. Желатин иммобилизовали в ПААГ, а после гомогенизации ковалентно пришивали к нему с помощью глутарового альдегида. Преимуществами такого

сорбента являются широкая доступность исходных компонентов (по сравнению с высококачественными носителями, такими как бромциан-активированная сефароза) и простота приготовления, при этом полученный сорбент обладает достаточной емкостью и стойкостью. Вместе с тем, недостатками данного сорбента являются необходимость тщательной гомогенизации и при этом заметно сниженная по сравнению с фабричными носителями емкость [10].

На рис. 1 представлена хроматограмма выделения протеаз на аффинном сорбенте. Как видно из рисунка, основная масса белка гомогената личинок выходит во время промывки, тогда как во фракциях, соответствующих этапу элюции, содержится незначительное количество белка.

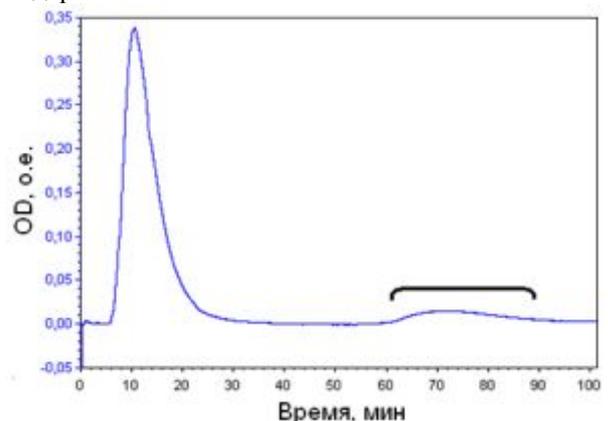


Рис. 1. Аффинная очистка протеаз личинок колорадского жука. Оптическую плотность определяли при длине волны 280 нм. Большому пику соответствуют не связавшиеся с сорбентом компоненты экстракта (стадия промывки); малому – белки, специфически связывающиеся с сорбентом. Прим. Скобкой отмечена стадия элюции

В таблице представлены результаты определения протеолитической активности и концентрации белка в исходном гомогенате и фракциях хроматографического выделения.

Таблица. Протеолитическая активность фракций аффинной хроматографии

	Объем, мл	Ферментативная активность, Е/мл	Концентрация белка, мкг/мл	Удельная ферментативная активность, Е/мкг
Исходный экстракт	8	7	600	0,012
Очищенный препарат	10	30	56	0,536

Из таблицы видно, что было достигнуто повышение удельной активности ферментов более чем в 30 раз, что соответствует показателям эффективности аффинной хроматографии. Так, при использовании в качестве сорбента для выделения протеаз бромциан-активированной сефарозы было достигнуто повышение удельной ферментативной активности в 18 раз [11], очистка минорной бактериальной металлопротеазы на силихроме повышает удельную активность в 50 раз [12], отдельными авторами предложен способ

использования сорбента на основе хитозана со степенью очистки фермента в 9 раз [13].

Таким образом, нами была показана возможность использования аффинного сорбента на основе полиакриламида для эффективного выделения ферментов из гомогената насекомых.

Важными свойствами ферментов насекомых, обеспечивающими их устойчивость к неблагоприятным условиям среды и к защитным реакциям растения, являются термостабильность и способность функционировать при различных

уровнях кислотности среды. Для определения оптимума pH к аликватам препарата в четырехкратной повторности добавляли соответствующее количество соляной кислоты или гидроксида натрия до достижения требуемого значения pH и выдерживали в течение 10 мин при 4°C. Для определения температурного оптимума раствор выдерживали в течение 10 мин при нужной температуре. Затем определяли ферментативную активность по БАПНА.

На рис. 2 показаны результаты определения ферментативной активности полученных препаратов при различных значениях pH. Максимальная активность отмечена при pH 8-9, что отличается от оптимумов аналогичных по функциональности протеаз млекопитающих – как катепсиноподобных (7.4-7.5), так и трипсиноподобных (7.8) цистеиновых протеаз [14, 15].

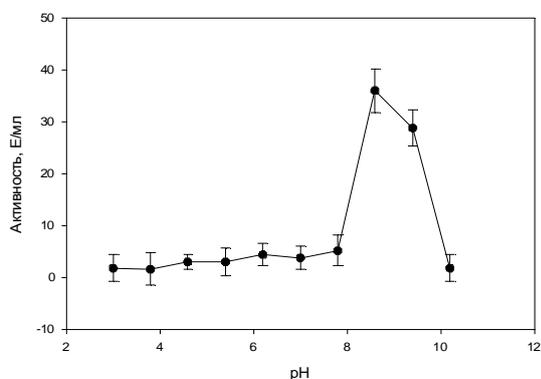


Рис. 2. Ферментативная активность протеаз личинок колорадского жука при различных значениях pH. Величину активности определяли при четырехкратной повторности опытной и контрольной проб методом гидролиза БАПНА. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего

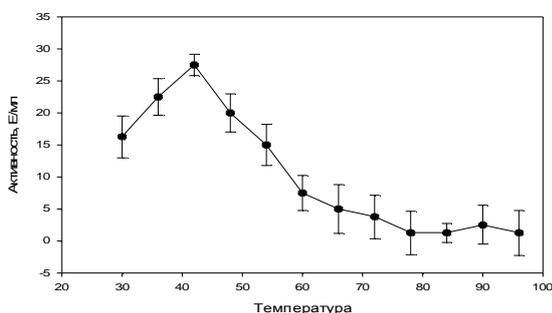


Рис. 3. Ферментативная активность протеаз личинок колорадского жука, выдержанных при различной температуре. Величину активности определяли при четырехкратной повторности опытной и контрольной проб методом гидролиза БАПНА. В качестве величины погрешности показан доверительный интервал выборочного среднего.

Температурный оптимум протеолитической активности полученных ферментов составляет

около 40°C (рис. 3), что примерно соответствует оптимуму трипсина (37°C), химотрипсина (45-55°C) [16] и различных форм катепсиноподобных ферментов (45°C) [17] млекопитающих.

Для выяснения молекулярного состава полученных ферментов проводили SDS-электрофорез по Лэммли. Препараты ферментов осаждали 2-кратным объемом ацетона при температуре -20 °C в течение 10 ч, ресуспендировали в буферном растворе с 5% меркаптоэтанолом и 0.1% SDS и наносили на 12%-ный ПААГ (0.75 мм). Было показано (рис. 4), что выделенные образцы представлены белками с молекулярными массами около 70 кДа, а также (большая часть) около 20-30 кДа и, по всей вероятности, представляют собой различные формы катепсин-подобных цистеиновых протеаз [1, 6, 18, 19], в том числе высокомолекулярный катепсин-L-подобный термостабильный белок [20], и химотрипсин-подобную цистеиновую протеазу [21, 22]. Изоэлектрические точки исследуемых белков (рис. 5) лежат около pH 4.5, что отличается от изоэлектрической точки протеаз подобного типа у млекопитающих – катепсинов (pH 6-7) и химотрипсина (8.7) [23, 24].

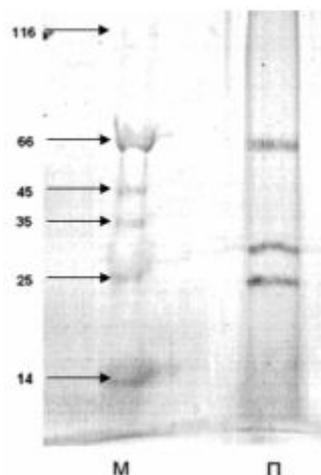


Рис. 4. SDS-электрофорез протеаз личинок колорадского жука. Обозначения: «М» — белки-маркеры, «П» - протеазы. Слева указаны молекулярные массы маркерных белков, кДа.

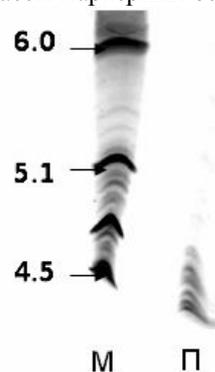


Рис. 5. Изоэлектрофокусирование протеаз личинок колорадского жука. Обозначения: «М» — белки-

маркеры, «П» — препараты протеаз. Слева указаны изоэлектрические точки маркерных белков.

Сходные результаты дает двумерный электрофорез полученных белков (рис. 6).

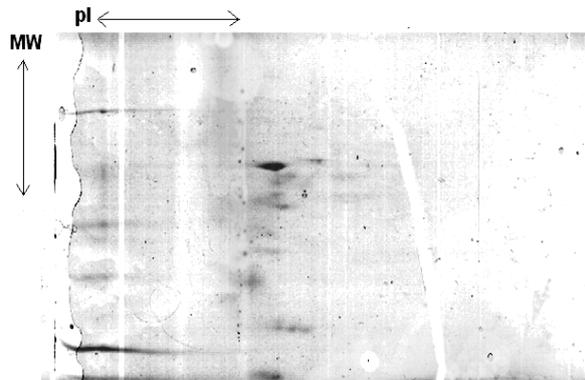


Рис. 6. Двумерный электрофорез протеаз личинок колорадского жука. Стрелками показано направление изменения изоэлектрической точки (pI) и молекулярной массы (MW) белков. Как видно из рисунка, основная часть белков располагается в слабокислой области pI и в области низких молекулярных масс, что согласуется с данными SDS-электрофореза и изоэлектрического фокусирования.

Таким образом, в данных исследованиях нами были выделены и очищены протеолитические ферменты личинок колорадского жука с использованием аффинного сорбента на основе полиакриламида, показана эффективность данного подхода. Получены новые данные о составе и физико-химических свойствах протеаз личинок колорадского жука, проведено их сравнение с родственными белками других видов животных. Полученные данные подтверждают имеющиеся литературные данные о некоторых протеазах насекомых.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (ГК № 16.740.110061); ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (ГК № 16.512.11.2014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thie N.M, Houseman J.G. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae) // *Insect Biochem.* 1990. V. 20, № 3. P. 313-318.
2. Фомичева Ю.А. Пищеварительные α -амилазы и протеиназы насекомых как элемент специфического взаимодействия в системе растение – насекомое-фитофаг: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1992. 15 с.
3. Рославцева С.А., Еремينا О.Ю., Костырко И.Н. Исследование эстеразных систем насекомых // *Агрохимия.* 1990. № 10. С. 117-123.
4. Филлипович Ю.Б., Коничев А.С.. Множественные формы ферментов насекомых и проблемы

- сельскохозяйственной энтомологии. М.: Наука, 1987. 168 с.
5. Michaud D, Nguyen-Quoc B., Yelle S. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II // *FEBS Lett.* 1993. V. 331. P. 1–2. P. 173-176.
6. Валуева Т, Мосолов В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // *Успехи биол. химии.* 2002. Т. 42. С. 193-216
7. Гофман Ю.Я., Вайсблай И.М. Определение ингибиторов трипсина в семенах гороха // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1975. Т. 2. № 5. С. 777-783.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1-2. P. 248-254.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 4. № 227. P. 680-685.
10. Kolarz B, Wojaczynska M., Herman B. Polyacrylamide sorbents. Synthesis and sorption properties // *Reactive Polymers.* 1989. V. 11. P. 29-35.
11. Кузнецова А.В., Руденская Г.Н., Богачева А.М., Воюшина Т.Л., Степанов В.М. Аффинные сорбенты для выделения протеиназ, содержащие в качестве лигандов морфолиды трипептидов // *Биоорганическая химия,* 1997. Т. 23, № 11. С. 868-876.
12. Рудакова Н.Л., Данилова Ю.В. Выделение и очистка металлопротеазы *B. intermedius* из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* BG 2036 // *Междунар. научн. конф. «Ломоносов-2010»:* Материалы. М., 2010. С. 378-379.
13. Иголкина Л.А., Руденская Ю.А., Руденская Г.Н. Аффинные сорбенты на основе хитозана для выделения протеолитических ферментов // *Вестник Московского ун-та.* 2000. Т. 41. № 6. С. 398-401.
14. Turk B., Dolenc I., Turk V., Bieth J. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 1. P. 375-380.
15. Zeng F., Zhu Y., Cohen A. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris* // *Comparat. Biochem. Physiol.* 2002. V. 131. P. 453-463.
16. Castillo-Yanez F., Pacheco-Aguilar R., Lugo-Sanchez M. et al. Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin // *Food Chemistry.* 2009. V. 112. № 3. P. 634-639.
17. Aranishi F., Hara K., Ishihara T. Purification and characterization of cathepsin H from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio* // *Comparat. Biochem. Physiol.* 1992. V. 102. № 3. P. 499-505.
18. Lopez-Ordóñez T., Rodríguez M., Hernández-Hernández D. Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus* // *Insect Mol. Biol.* 2001. V. 10. № 5. P. 505-511.
19. Michaud D., Nguyen-Quoc B., Vrain T. et al. Response of digestive cysteine proteinases from the colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1996. V. 31. № 4. P. 451-464.
20. Yamaguchi N., Chung S., Shiroeda O. et al. Characterization of a Cathepsin L-like Enzyme Secreted from Human Pancreatic Cancer Cell Line HPC-YP // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 658-663.
21. Zhang J., Pelletier Y., Goyer C. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect

- cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say) // *Insect Mol. Biol.* 2008. V. 17. № 3. P. 209-216.
22. *Novillo C., Castanera P., Ortego F.* Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 29. № 2. P. 177-184.
23. *Lapresle C., Puizdar V., Porchon-Bertoloto C. et al.* Structural differences between rabbit cathepsin D and cathepsin E // *Biol. Chemistry Hoppe-Seyler.* 1986. V. 367. № 1. P. 523-526.
24. *Kirschke H.* Cathepsin H: an endoaminopeptidase // *Acta Biol. Med. Ger.* 1977. V. 36. № 11-12. P. 1547-1548.

EXTRACTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEOLYTIC ENZYMES OF COLORADO POTATO BEETLE LARVAE

© 2011 V.O. Tsvetkov, N.D. Ryabtseva, I.A. Shpirnaya, A.M. Basyrova, K.I. Valiakhmetova, R.I. Ibragimov

Bashkir State University, Ufa

In this article we described a method of purification of insects proteases, researched physico-chemical properties of purified proteins.

Key words: *proteolytic enzymes, affine chromatography, physico-chemical characterization of proteins.*

Tsvetkov Vyacheslav Olegovich, e-mail: zvetkovvo@rambler.ru,
Ryabtseva Natalia Dmitrievna, Candidate of Biology, e-mail: natashashch@mail.ru,
Shpirnaya Irina Andreevna, Candidate of Biology, e-mail: i-shia@yandex.ru,
Basyrova Alfiya Magsumyanovna, e-mail: basirok@mail.ru,
Valiakhmetova Karina Ildarovna, e-mail: basirok@mail.ru,
Ibragimov Rinat Ismagilovich, Doctor of Biology, Professor, e-mail: ibragimov56@yandex.ru.