

## Выделение и характеристика протеаз *Phytophthora infestans*

В. О. МаксUTOва\*, В. О. Цветков, И. А. Шпирная, Р. И. Ибрагимов

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

\*Email: vilenka312@yandex.ru

В ходе работы был получен аффинноочищенный на специфичном субстрате суммарный препарат протеаз из экстракта гомогената мицелия *Phytophthora infestans* с высокой степенью очистки. Показано присутствие высокой протеолитической активности во множестве фракций. Также были проведены опыты по определению температурной стабильности протеаз. Методом электрофореза в иммобилизованном субстрате исследована протеолитическая активность отдельных молекулярных форм протеаз в клетках и культуральной жидкости *P. infestans*.

**Ключевые слова:** *Phytophthora infestans*, аффинная хроматография, протеолитические ферменты.

Существенный интерес представляет изучение механизмов взаимоотношения растений с организмами-фитофагами. Способность фитопатогенных грибов к проникновению в растительные ткани во многом зависит от активности их гидролитических ферментов [1].

Фитопатогенные грибы продуцируют смесь экстрацеллюлярных гидролитических ферментов, включая протеазы, благодаря которым преодолевают защитный барьер растительной клетки [2]. С помощью экспериментов из мицелия трех рас гриба *Phytophthora infestans* были выделены нативные водорастворимые белки, которые при электрофорезе в полиакриламидном геле разделяются на 6–8 молекул. Белковые препараты способны вызывать некротические пятна на листьях картофеля [3]. Бесклеточный препарат, полученный из суспензии спор и прорастающих цист фитофторы, вызывал некроз растительной ткани при инъекции в листья картофеля, при этом наблюдалась корреляция между уровнем протеолитической активности препарата и его некротическим действием [4].

В данный момент изучены гидролитические ферменты, продуцируемые оомицетами *Phytophthora infestans*, и получены экспериментальные данные о физиологических свойствах и структуре именно протеаз. Протеолитические ферменты фитофторы преимущественно представлены сериновыми протеиназами: трипсин и химотрипсин I. При анализе субстратной специфичности и чувствительности к воздействию синтетических и белковых ингибиторов было выявлено, что они относятся к субтилизино- и трипсиноподобным ферментам [5, 6].

Предварительное культивирование гриба проводили в среде Чапека. Для получения экстракта использовали мицелий *P. infestans*. Навеску мицелия гомогенизировали в эппендорфе с кварцевым песком и экстрагировали в течение 10 минут при 4 °С однократным объемом рабочего буфера. Затем экстракт центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С на центрифуге Eppendorf 5417R (Германия). Супернатант использовали для определения активности и выделения протеаз. В качестве рабочего буфера служил Tris-HCl-буфер (0.05М трис-HCl до pH 8.2).

Выделение ферментов производили на жидкостном хроматографе низкого давления BioLogic LP (Biorad, США) при 4 °С. Ход хроматографии контролировали с помощью проточного УФ-детектора при 280 нм. Объем фракций составлял 2 мл. На колонку (2\*6 см, объем колонки – 20 мл) с иммобилизованным лигандом, уравновешенную рабочим раствором, наносили 5 мл супернатанта экстракта. В качестве лиганда нами был использован широко распространенный субстрат данных ферментов – желатин. Выдерживали в течение 10 минут и промывали рабочим буфером до исчезновения поглощения раствора. Элюцию активного белка производили буферным раствором, pH которого отличается от оптимального для данного фермента на 2–3 единицы. Скорость тока буфера составляла 2 мл/мин.

На рисунке 1 представлена хроматограмма, демонстрирующая процесс выделения протеолитических ферментов на аффинном сорбенте. Как видно из рисунка, основная масса белка гомогената мицелия выходит во время промывки, а во фракциях, которые соответствуют этапу элюции (с 72 по 136 минуту), содержится на порядок меньшее количество белка.

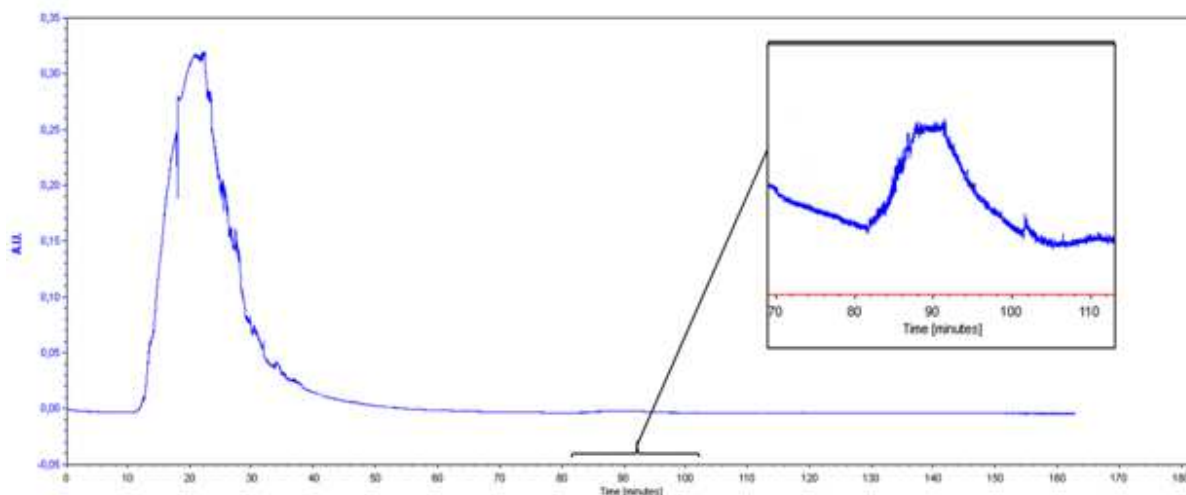


Рис. 1. Хроматограмма аффинного выделения протеаз. По вертикальной оси – поглощение при 280 нм, по горизонтальной оси – время.

Для дальнейших исследований полученные фракции подвергали лиофильному концентрированию и хранили при –20 °С.

Активность протеаз в полученных фракциях определяли методом гидролиза субстрата, иммобилизованного в ПААГ. Суть метода заключается в иммобилизации субстрата в полиакриламидный гель, инкубации геля с исследуемыми растворами, помещенные в лунки иммунологического планшета, и последующем определении активности ферментов по гидролизу окрашенного субстрата. Во время инкубации молекулы фермента из раствора диффундируют в гель и гидролизуют субстрат.

Для определения активности протеолитических ферментов использовали полиакриламидный гель (6%) с иммобилизованным желатином (1%). Обработка бромфеноловым синим или кумасси позволяла выявить участки геля с гидролизированным субстратом. На рисунке 2 представлены результаты определения протеолитической активности во фракциях аффинной хроматографии.

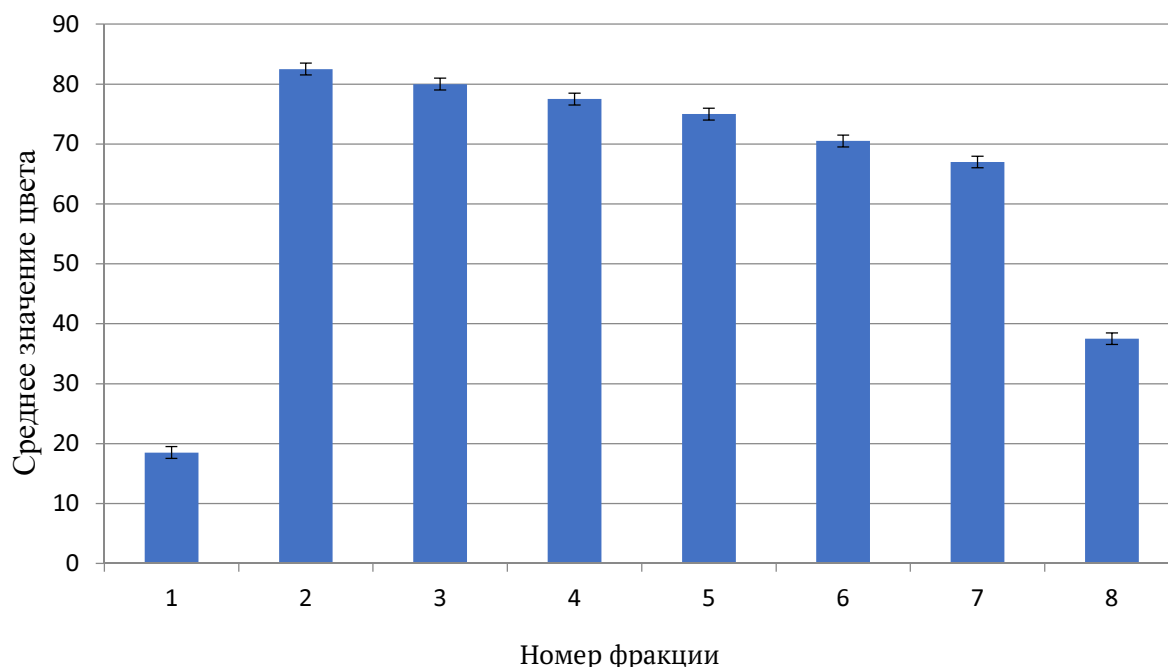


Рис. 2. Активность протеаз во фракциях аффинной хроматографии, определенная по гидролизу субстрата, иммобилизованного в ПААГ. По горизонтальной оси – номер фракции; по вертикальной оси – средняя яркость участка геля относительно воды.

Как видно из полученных результатов, во множестве фракций отмечена высокая активность протеаз. Удельная протеолитическая активность после аффинной очистки повысилась в 250 раз.

Высокая протеолитическая активность во множестве фракций, по-видимому, обусловлена присутствием различных форм фермента, различающихся по степени сродства к лиганду.

Для определения молекулярного состава протеолитических ферментов в клетках и культуральной жидкости *P. infestans*. Использовали электрофоретический метод – зимографию. Для обнаружения ферментативной активности субстрат сополимеризуют с полиакриламидным гелем. Активность ферментов визуализируется после их разделения в денатурирующих условиях (SDS-электрофорез) в соответствии с их молекулярной массой и последующей ренатурации.

На рисунке 3 показаны результаты разделения протеаз фитофторы из мицелия и культуральной жидкости с последующей визуализацией протеолитической активности с помощью полиакриламидного геля с иммобилизованным желатином.



Рис. 3. Разделение протеаз *Phytophthora infestans* методом зимографии. Гель окрашен кумасси, исходное изображение геля переведено в черно-белый режим и обработано в графическом редакторе для усиления контрастности.

Полученные результаты свидетельствуют о присутствии четырех молекулярных форм протеаз в клетках фитофторы. В культуральной жидкости были выявлены три различные молекулярные формы фермента. Полученные результаты подтверждают сделанное ранее предположение о присутствии различных молекулярных форм протеаз в образце, а также согласуются с литературными данными [7, 5, 8].

Для исследования температурной стабильности протеаз супернатант экстракта гомогената мицелия выдерживали при различной температуре в течение 20 минут, затем

определяли активность с использованием полиакриламидного геля с иммобилизованным желатином (Рис. 4).

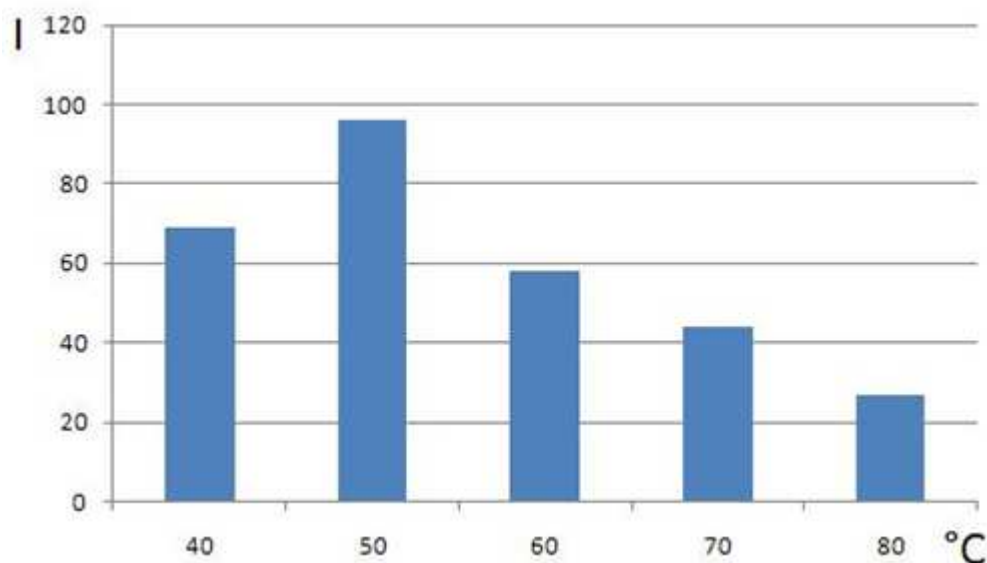


Рис. 4. Компьютерный анализ протеолитической активности ферментов *Phytophthora infestans* при прогревании до различной температуры. По горизонтальной оси – температура; по вертикальной оси – среднее значение цвета участка геля.

Анализ результатов показал, что наибольшая активность проявляется при прогревании до 50 градусов. При дальнейшем увеличении температуры происходит значительное снижение ферментативной активности.

## Литература

1. Яруллина Л. Г., Ахатова А. Р., Касимова Р. И. Гидролитические ферменты и их белковые ингибиторы в регуляции взаимоотношений растений с патогенами // Физиология растений. 2016. Т.63. №2. С.205–217.
2. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. М.: Мир, 1987. 117 с.
3. Савальева О. Н., Васюкова Н. И. Токсические вещества и ферменты *Phytophthora infestans* / Под общ. ред. Л. В. Метлицкий // Биохимический основы защиты растений. М.: Наука, 1966. 231 с.
4. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов / М.: Высшая школа, 2003. 251 с.
5. Валуева Т. А. Роль ингибиторов протеиназ в защите картофеля / Т. А. Валуева, Т. А. Ревина, Е. Л. Гвоздева, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская // Биоорганическая химия. 2003. Т.29. №5. С. 499–504.

6. Кудрявцева Н. Н. Секреция протеолитических ферментов тремя фитопатогенными микроорганизмами / Н. Н. Кудрявцева, А. В. Софьин, Т. А. Ревина, Е. Л. Гвоздева, Е. В. Иевлева, Т. А. Валужева // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т.49. №5. С. 513–521.
7. Валужева Т. А. Ингибиторы химотрипсина в клубнях картофеля, инфицированных возбудителем фитофтороза / Т. А. Валужева, Г. В. Кладницкая, Л. И. Ильинская, Н. Г. Герасимова, О. Л. Озерецковская, В. В. Мосолов // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. №5. С. 346–349.
8. Валужева Т. А. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений / Т. А. Валужева, В. В. Мосолов // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского Государственного университета (д-р. биол. наук, проф. Р. Г. Фархутдинов)

## **Extraction and characterization of proteases from *Phytophthora infestans***

V. O. Maksutova\*, V. O. Tsvetkov, I. A. Shpirnaya, R. I. Ibragimov

*Bashkir State University*

*32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*\*Email: vilenka312@yandex.ru*

In the course of the work, a total protease preparation purified from an extract of homogenate of mycelium of *Phytophthora infestans* with a high degree of purification was obtained using a specific substrate. The presence of high proteolytic activity in a variety of fractions was shown. Also, experiments were conducted to determine the temperature stability of proteases. The method of electrophoresis in an immobilized substrate showed the proteolytic activity of individual molecular forms of proteases in cells and *P. infestans* culture fluid.

**Keywords:** *Phytophthora infestans*, affine chromatography, proteolytic enzymes.