

ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИСТКА ПОЗАКЛІТИННОЇ ФРУКТОЗОБІСФОСТАЗИ *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII VAR. GRANULUM* 118 -ЗБУДНИКА БЛІДО-ЗЕЛЕНОЇ КАРЛИКОВОСТІ ЗЕРНОВИХ

Для отримання фруктозобісфосфатази (ФБФази) з культуральної рідини *Acholeplasma laidlawii var. granulum* 118 запропоновано декілька етапів очистки: 1 - осадження білків з культуральної рідини *A. laidlawii var. granulum* 118 1,6 М сульфатом амонію (СА) (40 % насичення); 2 — фракціонування культуральної рідини фітопатогенної ахолеплазми, переосадженої 40 % СА на гідрофобній колонці з Тойперлом HW-60; 3 — осадження білків активних фракцій 2, 8 М (NH₄)₂SO₄ (70 % насичення); 4 - десальтування на молекулярному ситі Сефадекс G-10 і останній етап — очистка ферментативного препарату на КМ-сефарозі (субстрат-специфічна хроматографія). Отримано препарат ФБФази з високим ступенем чистоти (176,4), що дасть змогу продовжити дослідження його властивостей.

Відомо, що фруктозобісфосфатаза (ФБФ) є ключовим ферментом у процесі синтезу глюкози з неуглеводних попередників - глюконогенезі, а також є життєво необхідним ферментом для мікроорганізмів, оскільки він розміщений у ключовій точці вуглеводного обміну й утворюється при їх глюконогенічному рості.

У рослини також є два ферменти фруктозобісфосфатази, один з яких задіяно у циклі Кальвіна, з яким тісно пов'язаний процес фотосинтезу.

Мікоплазми, потрапляючи у ситовидні елементи флоєми рослини, починають інтенсивно розмножуватися, неконтрольовано продукуючи цей фермент. При цьому він включається у процес фотосинтезу, знижуючи рівень рослинного ферменту і таким чином порушуючи біохімічні процеси регуляції в клітинах рослин (а саме в хлоропластах). Наявність такого чужорідного, нерегульованого рослиною ферменту призводить до безперервного накопичення крохмалю в клітинах (як запасуючої речовини), що в результаті спричинює появу хлорозу листя, що є однією з головних ознак «жовтяниці» рослин, викликані фітопатогенною мікоплазмою. Але поки що це припущення, яке при відповідному експериментальному доведенні свідчитиме про безпосередню причетність фруктозобісфосфатази фітопатогенних ахолеплазм до патогенного процесу.

Попередніми нашими дослідженнями було показано, що фітопатогенна мікоплазма *Acholeplasma laidlawii var. granulum* 118 продукує в культуральне середовище лектин, високо специфічний відносно фруктозо-бісфосфату [1; 2]. Висока специфічність цього лектину і той факт, що він був позаклітинним, вказували на його особливу роль у клітині. Можливо, цьому

лектину притаманна дуалістична природа і біфункціональна дія, тобто він може функціонувати і як лектин, і як фермент.

Враховуючи актуальність вищезазначеного та відсутність будь-яких досліджень з цих питань, виникла необхідність у виділенні й очищенні фруктозобісфосфатази з культуральної рідини *Acholeplasma laidlawii var. granulum* 118 та дослідженні його хроматографічних характеристик.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень було обрано збудник бідо-зеленої карликовості зернових *Acholeplasma laidlawii var. granulum* 118, яку вирощували на рідкому живильному середовищі СМ ІМВ-72 [3] протягом 48 годин. Центрифугуванням при 15 000 g звільняли культуральну рідину від клітин ахолеплазми. У результаті отримували 900 мл культуральної рідини, яку використовували в подальших дослідженнях.

Для осадження білків з культуральної рідини використовували 1,6 та 2,8 М сульфат амонію (СА) (40 і 70 % насичення відповідно).

Для очистки ФБФази застосовували хроматографію на колонках з різними наповнювачами - Тойперлом HW-60 (висота колонки - 10,0 см, діаметр - 5,0 см, об'єм - 100 мл), Сефадексом G-10 (висота колонки - 12,0 см, діаметр - 4,0 см, об'єм - 100 мл) та КМ-сефарозою (висота колонки - 22,0 см, діаметр - 1,0 см, об'єм - 34,54 см³).

Для врівноваження колонки з Тойперлом HW-60 та відмивання від баластних білків застосовували забуферений фізіологічний розчин (ЗФР) з 1,6 М СА, а для елюції використовували 5 мМ натрій - малонатний буфер. Цей же ма-

лонатний буфер використовували на всіх трьох етапах (урівноваження, відмивання та елюція) при хроматографії на Сефадексі G-10, а також для урівноважування колонки з КМ-сефарозою. Елююювальним буфером при роботі на КМ-сефарозі слугував 5мМ натрій-малонатний буфер з 0,2 мМ кальцій фруктозо-1,6-дифосфатом. Для перевірки чистоти експерименту через колонку з КМ-сефарозою пропускали малонатний буфер з 0,5 М NaCl. Збирання фракцій у всіх випадках починали після виходу вільного об'єму кожної з колонок.

Активність ФБФази на кожному етапі визначали за методом Фіске - Суббароу [4]. За одиницю активності ФБФази приймали ту її кількість, яка забезпечувала звільнення 1,0 мкМ Φ_n за 1 хв. Питому активність виражали кількістю одиниць ФБФази на 1,0 мг білка. Білок визначали за методом Бредфорда [5].

Результати та їх обговорення

Для виділення та очистки ключового ферменту глюконеогенезу з культуральної рідини *Acholeplasma laidlawii van granulum* 118 застосовували декілька етапів очистки. *Перший* етап очистки полягав в осадженні білків з культуральної рідини 1,6 М сульфатом амонію (40 % насичення). Для цього до отриманого об'єму культуральної рідини додавали 1,6 М СА і зберігали протягом доби при +4 °С. При цьому в осад випадали білки, для яких не характерна ФБФазна активність. Після центрифугування (15 000 g) звільнену від осаду надосадову рідину використовували в подальших дослідженнях. На *другому* етапі, враховуючи дуалістичну природу досліджуваного ферменту, тобто наявність у його складі як білкової, так і вуглеводної частин, проведено фракціонування культуральної рідини, переосадженої 40 % СА, на гідрофобній колонці з Тойоперлом NW-60. *Третім* етапом було переосадження білків у відібраних активних фракціях 2,8 М СА (70 % насичення). Від осаду також звільнялися центрифугуванням при 15 000 g, а концентрацію СА в надосадовій рідині доводили до 2,8 М (70 % насичення). Білки, що випали в осад, розчиняли у ЗФРі (рН 7,2), доводячи концентрацію СА в ньому до 1,6 М. У наступному, *четвертому* етапі для повного виділення сульфату амонію з отриманих фракцій розчин ферментативного препарату з попереднього етапу пропускали через Сефадекс G-10, тобто здійснювали десальтування на молекулярному ситі на іонообмінній колонці із Сефадексом G-10. Для останнього *п'ятого* етапу очистки ферментативного препарату застосовано субстрат - специфічну хроматографію на КМ-сефарозі (катионна колонка).

Після кожного етапу всі фракції перевіряли на білкову та фосфорну активності і найактивніші з них відбирали для наступних етапів.

Після проведення елюції на Тойоперлі NW-60 відібрали найактивніші за неорганічним фосфором фракції. Такими виявилися з 15-ї по 20-ту фракції включно загальним об'ємом 60 мл (сумарний неорганічний фосфор становив 284,6 мг/л, сумарний білок - 1112 мкг/мл) (див. рис. 1).

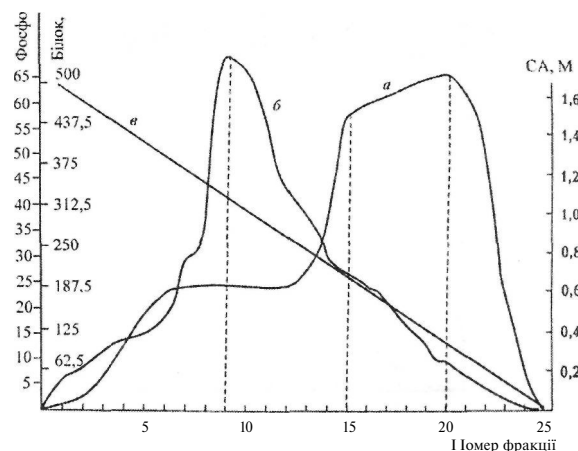


Рис. 1. Гідрофобна хроматографія ФБФази *Acholeplasma laidlawii var. granulum* 118 на колонці з Тойоперл NW-60: а - фосфор, б - білок, в - сульфат амонію

У результаті хроматографії на Тойоперлі NW-60 встановлено, що сходження досліджуваного ферменту відбувалося в діапазоні від 1,2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 0,8 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При цьому слід зазначити, що досліджуваний фермент сховався після білкового піку.

Після хроматографії на Сефадексі G-10 відібрано активні фракції за неорганічним фосфором з 6-ї по 9-ту включно загальним об'ємом 21 мл. При цьому сумарний фосфор у цих фракціях становив 106 мг/л, а сумарний білок - 168 мкг/мл (див. рис. 2).

У результаті субстрат-специфічної хроматографії на КМ-сефарозі виявлено, що найбільшу активність за фосфором спостерігали у 4-й фракції, у якій вміст фосфору становив 43 мг/л (вміст білка - 27 мкг/мл). Вміст фосфору у 3-й та 5-й фракціях був 6 і 5 мг/л відповідно. Білок при цьому становив 31 мкг/мл у 3-й фракції та 15 мкг/мл - у 5-й (див. рис. 3).

Отже, нами отримано препарат ФБФази із загальним об'ємом 3,0 мл із сумарною активністю за фосфором 54 мг/л. Вміст білка в препараті становив 336 мкг/мл.

Таким чином, у результаті проведених досліджень вперше отримано позаклітинну ФБФазу збудників «жовтяниць» рослин та хроматографічні профілі ферментативного препарату

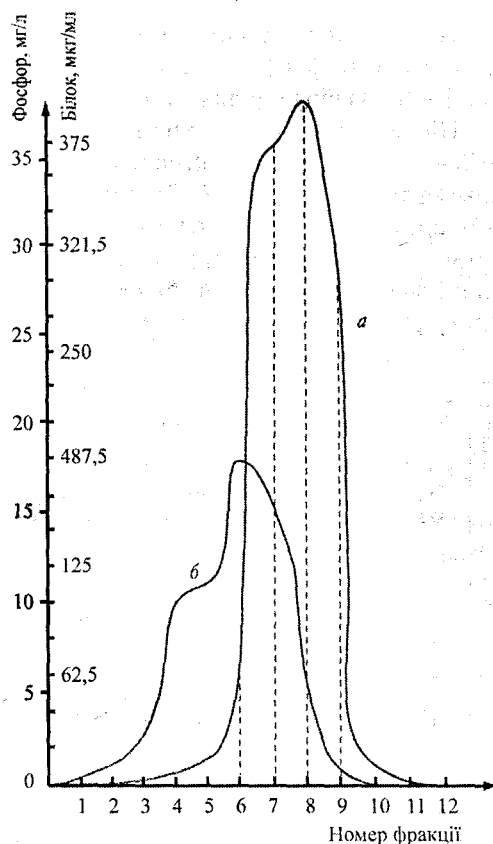


Рис. 2. Десальтування препарату фруктозо-1,6-бісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 на колонці з молекулярним ситом Сефадекс G-10: а - фосфор, б - білок

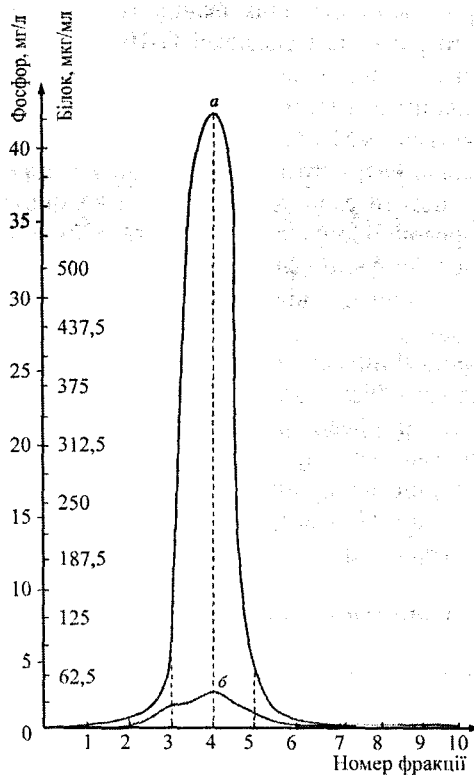


Рис. 3. Субстратзалежна хроматографія фруктозо-1,6-бісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* 118 на колонці з КМ-сефарозою: а - фосфор, б - білок

ФБФази на колонках з різними наповнювачами. Застосування субстрат-специфічної хроматографії дало можливість отримати практично індивідуальний білок.

Внаслідок запропонованого 5-етапного методу виділення та очистки позаклітинної ФБФази з 900 мл культуральної рідини із загальною ФБФазною активністю 29 500 од. отримано 3,0 мл

препарату ФБФази із загальною активністю 5040 од., питомою активністю 148,2 од./мг білка та 176-разовим ступенем очистки (див. табл. 1).

У результаті застосованих етапів очистки одержано практично індивідуальний білок з високим ступенем чистоти (176,4), що дасть змогу проводити подальше дослідження його властивостей.

Таблиця 1. Виділення та очистка фруктозо-1,6-бісфосфатази з культуральної рідини *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118

Етап очищення	Об'єм розчину препарату, мл	Загальна активність, од.	Вміст білка, мкг/мл	Питома активність, од. на 1 мг білка	Ступінь очистки	Вихід ферменту, %
Одержання культуральної рідини	900	29 500	35 000	0,84	—	100
Осадження білків 1,6 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 % насичення)	800	20 560	19 750	1,04	1,24	70
Гідрофобна хроматографія на колонці з Тойоперл HW-60	60	15 897	1 112	14,3	17,0	54
Осадження білків з активних фракцій 2,8 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % насичення)	54	9 684	499	19,4	23,1	33
Десальтування на колонці з Сефадексом G-10	20	7 573	168	45,1	53,7	26
Субстрат-специфічна хроматографія на колонці з КМ-сефарозою	3	5 040	33,6	148,2	176,4	17

1. Токовенко И. П., Скрипеть И. Г., Малиновская Л. П. Вещества с лектиновой активностью, продуцируемые в среду культивирования // Микробиол. журн. - 1992. - Т. 54. - № 3. - С. 24-31.
2. Скрипаль И. Г., Токовенко И. П., Бабічев В. В. Позаклітинний лектин збудника «жовтяниці» зернових, специфічний до фруктозо-1,6-дифосфату: хроматографічні і молекулярно-біологічні властивості // Микробиол. журн. - 1996. - Т. 58. - № 1. - С. 10-22.
3. Скрипаль И. Г., Малиновская Л. П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. - 1984. - Т. 46. - № 2. - С. 71-75.
4. Лур'є Ю. Ю. Метод Фиске-Суббароу // Унифицированные методы анализа вод. - М.: Химия, 1985. - С. 206-208.
5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Т. 71. - № 2. - P. 248-254.

I. Tokovenko, L. Malinovskaya, I. Skripal'

OBTAINING AND PURIFYING OF THE FRUCTOSOBISPHOSPHATASE OF THE *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* VAR. *GRANULUM* 118 - THE AGENT OF PALE-GREEN DWARFNESS OF CEREALS

Several purification stages for obtaining FBP ase from cultural liquid of the Acholeplasma laidlawii var. granulum 118 were suggested: 1 -precipitation of proteins from cultural liquid of the A. laidlawii var. granulum 118 with ammonium sulphate (AS) (1,6 M)(40 % saturation); 2 —fractioning of the cultural liquid of the phytopathogenic acholeplasma, which was re-precipitated by 40 % of AS on hydrophobic column with Toyopearl HW-60; 3 -precipitation of proteins of active fractions by 2,8M (NH₄)₂SO₄ (70 % saturation); 4 - desalting on the molecular filter Sephadex G-10 and final step -purification of fermentative sample on the column with CM-sepharose (substrate-dependent chromatography). As a result, FBPases were obtained with high purification degree (176,4), which allowed to continue investigation of their properties.