

УДК 582.282

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ–ПРОДУЦЕНТОВ L-АСПАРАГИНАЗ

© 2011 г. М. В. Покровская, В. С. Покровский, Н. Н. Соколов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН Москва, 119121

e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.05.2010 г.

Разработан специфический, быстрый и простой метод выявления активных продуцентов L-аспарагиназы на твердой среде с использованием дифференциальной среды на основе LB или M9 с 1.5% агара. Каждые 100 мл среды LB или M9 дополнительно содержали 6–7 мл глицерина, 4 г L-аспарагина и 0.2 г CaCO₃, а также диагностические компоненты – 3 мл 0.2 М CuSO₄ · 5H₂O и 2.5 мл 0.1 М K₃Fe(CN)₆, pH 7.6–7.8. Результаты учитывали через 12–20 или 24–48 ч роста штамма при 37°C на соответствующих средах. Красный цвет колоний и окрашенная зона вокруг них указывали на способность исследуемого штамма разрушать аспарагиновые комплексы. Рекомендуемый метод позволяет выявлять штаммы бактерий, продуцирующих L-аспарагиназу с удельной активностью не менее 0.1–3.0 МЕ/мг белка.

L-аспарагиназы (L-аспарагин амидогидролазы, КФ 3.5.1.1) катализируют расщепление L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. Некоторые из них, например, аспарагиназы природных штаммов *Escherichia coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используются в клинической онкологии для лечения острых лимфобластных лейкозов. В последние годы появились сообщения об эффективности L-аспарагиназы при лечении НК/Т-клеточной и кожной Т-клеточной лимфом [1–3].

Повышение эффективности производства препаратов бактериальных L-аспарагиназ возможно путем создания рекомбинантных штаммов–супер-продуцентов. В частности, в последние годы получены рекомбинантные аспарагиназы *Erwinia carotovora*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pyrococcus furiosus* и др. [4–7]. В то же время при получении рекомбинантных продуцентов или мутациях в процессе пассирования возможно появление смешанных культур, что определяет необходимость отбора чистой наиболее активной культуры [8, 9].

В настоящее время стандартным методом определения активности L-аспарагиназ является фотометрический метод, основанный на качественной и количественной оценке выделяющегося аммиака при гидролизе аспарагина реактивом Несслера [10]. Менее широкое распространение получило спектрофотометрическое определение, требующее использования очищенного фермента [11]. Оба метода позволяют определять активность только в жидкой среде, что затрудняет отбор отдельных клонов. При этом для выделения чистых культур пользуются почти исключительно методом поверхностных расщепов на пластинчатом агаре в чашках Петри, т.е. на твердой среде.

Применение нами твердой дифференциальной среды Эндо, а также среды LB, содержащей различные индикаторы (бромтимоловый синий, метило-

вый красный, бромкрезоловый пурпурный, бромфеноловый синий), не дало воспроизводимых результатов. Метод определения L-аспарагиназной активности штаммов на твердой среде [12], основанный на применении синтетической среды с феноловым красным, недостаточно специфичен, поскольку учитываются не непосредственно результаты разрушения L-аспарагина, а изменение pH среды. Кроме того, синтетическая среда может оказаться неполноценной для роста ауксотрофных микроорганизмов, что может привести к потере активного продуцента.

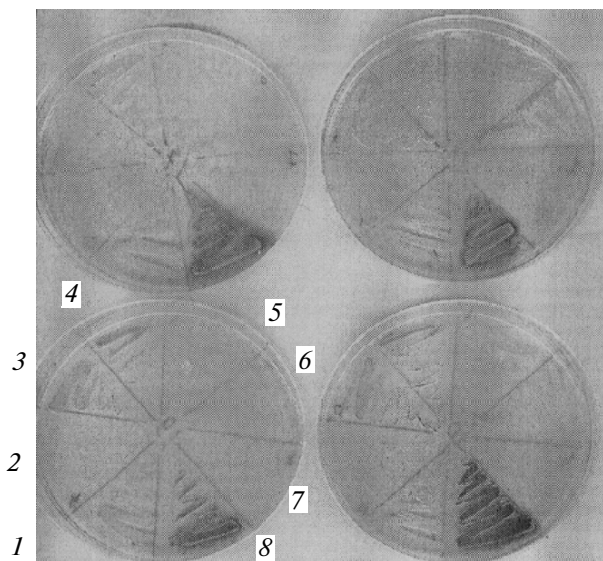
Таким образом, необходимость создания метода выявления наиболее активных штаммов при выращивании на твердой среде обусловлена сложностью либо недостаточной специфичностью существующих технологий отбора штаммов–продуцентов L-аспарагиназы. Метод может быть востребован для экспресс-оценки L-аспарагиназной активности новых рекомбинантных продуцентов или для выделения отдельных клонов из смешанных культур.

Цель работы – создание нового специфического и простого способа выявления бактерий с L-аспарагиназной активностью.

МЕТОДИКА

Реактивы: бакто-триптон и бакто-дрожжевой экстракт (“Fluka”, Швейцария), бакто-агар (“Ferak”, Германия), глицерин, NaCl, NH₄Cl, CuSO₄ · 5H₂O, K₃Fe(CN)₆, MgSO₄ · 7H₂O и CaCl₂ (“Sigma-Aldrich”, США), Na₂HPO₄ и KH₂PO₄ (“Serva”, Германия), L-аспарагин (“Reanal”, Венгрия), глюкоза (“Panreac”, Испания), CaCO₃ (“Реахим”, Россия).

Среды. В качестве модифицируемых сред использовали стандартные среды LB и M9 с добавлением 1.5% агара [13, 14]. К 100 мл автоклавируван-



Рост штаммов на дифференциальных средах: 1 – *E. coli* XL-blue, 2 – *Lactobacillus plantarium*, 3 – *Erwinia carotovora*, 4 – *Bacillus subtilis*, 5 – *B. megaterium*, 6 – *E. coli* BL-21 (DE3), 7 – *E. coli* DH-52, 8 – *E. coli* BL-21(DE3)/pACYC177-LANS.

ной среды LB или M9, содержащей 0.2 г CaCO_3 , pH 7.6–7.8; добавляли 6–7 мл глицерина, 4.0 г аспарагина и доводили до кипения. Затем среду остужали до 40–50°C и в качестве диагностических компонентов вносили последовательно 3.0 мл 0.2 М $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 2.5 мл 0.1 М $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. После добавления каждого компонента смесь тщательно перемешивали. Автоклавирование питательных сред и растворов проводили в стандартных условиях. При необходимости в среду вносили антибиотики и индукторы, например, L-арабинозу до 0.0015 М или изопропил- β -D-тиогалактопиранозид до 0.001 М. Среду разливали в чашки Петри и подсушивали в течение 20 мин.

Приготовленная горячая среда имела зеленый цвет, холодная приобретала голубоватый оттенок. Покрасневшая среда вследствие неспецифического выпадения осадка $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ для диагностических целей непригодна. Герметично закрытые чашки с готовой средой могут храниться при комнатной температуре в течение 2 нед.

Контрольные чашки содержали среду LB (M9), агар и аспарагин; среду LB (M9), агар, аспарагин и сульфат меди; среду LB (M9), агар, аспарагин и гексацианоферрат калия.

Исследуемые микроорганизмы. Для тестирования сред из коллекции ИБМХ РАН были отобраны рекомбинантные штаммы *E. coli* с высокой L-аспарагиназной активностью (от 12 до 34 МЕ/мг белка): BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS (*E. coli*/pBAD) и BL-21(DE3)/pACYC177-LANS (*E. coli*/pACYC); стандартные генетически модифицированные штаммы *E. coli*, используемые в биотехнологии с низкой L-аспарагиназной активностью (до 10 МЕ/мл белка): DH-52, MC 1061, BL-21(DE3); а также природные штаммы: *Lactobacillus plantarium*,

Lactobacillus casei var. *rhannosus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* и *Erwinia carotovora* N1 (коллекция микроорганизмов БГУ, Минск) с активностью 0.003–0.007 и 0.1–0.3 МЕ/мг белка, соответственно.

Условия выращивания микроорганизмов. Исследуемые штаммы выращивали на среде LB со скоростью перемешивания 180 об/мин при 37°C до D_{600} 1.5–2.0 ОЕ. После стандартных 10-кратных разведений бактериальную культуру шпателем или петлей высевали на поверхность приготовленной диагностической среды. Посевы выдерживали в термостате при 37°C в течение 12–20 ч (среда на основе LB) или 24–48 ч (среда на основе M9), после чего результаты учитывали по окраске выросших колоний.

Определение активности L-аспарагиназы. Результаты, полученные при изучении использованных сред, были сопоставлены с данными стандартного метода с использованием реактива Несслера [10]. За единицу активности L-аспарагиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице сопоставлены результаты оценки L-аспарагиназной активности штаммов с применением предлагаемого метода с данными, полученными при использовании стандартного метода с реактивом Несслера (метод прямой несслеризации) [10]. Видно, что окрашивание колоний коррелирует с активностью штамма, определенной при помощи стандартного метода. Штаммы, демонстрирующие невысокую активность, окрашивались в розовый цвет. Рекомбинантные штаммы *E. coli* BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS и *E. coli* BL-21(DE3)/pACYC177-LANS, активность которых составила 28 и 34 МЕ/мг белка, соответственно, были ярко красными. Розовое окрашивание колоний *E. coli* JM-109, обладающих невысокой активностью, возможно, связано с особенностями метаболизма штамма. Колонии *Lactobacillus plantarium*, *Lactobacillus casei* var. *rhannosus*, *Bacillus subtilis* и *B. megaterium* с активностью 0.007 МЕ/мг белка оставались неокрашенными при любых сроках инкубации (рисунок). Контрольные чашки на протяжении всех опытов оставались зеленовато-серыми или желтыми без очагов покраснения.

Метод основан на известной способности аспарагина и аспарагиновой кислоты образовывать прочные цветные комплексы с металлами (Cu, Ni, Co) и получении ярко окрашенных продуктов разложения этих комплексов при взаимодействии с гексацианоферратом калия [15]. Выявление активных продуцентов L-аспарагиназы основано на образовании красных комплексов меди с анионом гексацианоферрата при ферментативном разрушении синих комплексов с L-аспарагином и L-аспарагиновой кислотой. Использование солей Ni или Co менее информативно из-за слабого внешнего эффекта (неяркие продукты реакции).

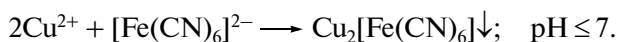
Сравнительная характеристика штаммов микроорганизмов на дифференциально-диагностической среде

Тестируемый штамм	Цвет отдельных колоний	Время инкубации**		Активность, с реактивом Несслера, МЕ/мг белка
		среда на основе М9	среда на основе LB	
<i>E. coli</i> BL-21(DE3)/pBAD/ECARLANS	Красный с индукцией, розовый без индукции	24	12–15	28.0
<i>E. coli</i> BL-21(DE3)/pACYC177-LANS	Красный с индукцией и без индукции*	24	13–16	34.0
<i>E. coli</i> XL-blue	Розовый	48	16–18	4.3
<i>E. coli</i> BL-21 (DE3)	Розовый	48	16–18	5.2
<i>E. coli</i> DH-52	Розовый	48	16–18	3.4
<i>E. coli</i> MC 1061	Розовый	48	16–18	3.2
<i>E. coli</i> JM-109	Розовый	48	16–18	0.12
<i>Bacillus megaterium</i>	Белый	48	48	0.007
<i>B. subtilis</i>	Белый	48	48	0.006
<i>Erwinia carotovora</i>	Белый	48	48	0.3
<i>Lactobacillus plantarium</i>	Белый	48	48	0.003
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i>	Белый	48	48	0.005

* Красный ореол вокруг колоний, наблюдаемый в отсутствие индуктора, связан с подтеканием промотора; в присутствии индуктора ореол значительно больше, чем без него.

** Время инкубации до появления цвета при высеве истощающим мазком.

В результате реакции с восстанавливающими ингредиентами агара, входящего в состав твердой среды LB или М9, из гексацианоферрата(III) образуется гексацианоферрат(II). При ферментативном гидролизе аспарагина и разрушении прочного хелатного комплекса этой аминокислоты с Cu(II), катионы меди связываются с анионами гексацианоферрата(II), что сопровождается выпадением красно-коричневого осадка.



Красный цвет колоний и красный ореол вокруг них указывают на способность исследуемого микроорганизма разрушать аспарагиновые комплексы, в то время как неактивные свой естественный цвет не изменяют. Покраснение колоний и диаметр окрашенной зоны вокруг них находятся в прямой зависимости от аспарагиназной активности изучаемых штаммов, концентрации реагирующих компонентов, а также времени инкубации.

При использовании рекомендуемых концентраций реагентов повторные эксперименты позволяют получить сопоставимые данные. Увеличение концентрации $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ приводит к появлению свободных ионов меди и неспецифическому красному окрашиванию, уменьшение — снижает чувствительность среды. Уменьшение концентрации глицерина до 3 г на 100 мл снижает яркость окрашивания колоний, при увеличении более 9 г на 100 мл вызывает неспецифическое окрашивание среды.

Конечный результат реакции зависит не только от ферментативного разрушения комплекса меди с аспарагином, но также и от значения pH среды. Так, продукты неполного окисления, метаболиты, выделяемые в среду в процессе жизнедеятельности кле-

ток, влияют на pH и окислительно-восстановительный потенциал системы, а, следовательно, и на процесс тестирования. Поэтому длительная инкубация может привести к неспецифическому окрашиванию среды. Добавление в среду CaCO_3 предупреждает закисление среды и диффузию кислот из области роста активных колоний и ограничивает зону покраснения.

Автоклавирование в жестких условиях может вызывать разрывы полисахаридных цепей агара и появление альдегидных форм. Ионы кальция, по-видимому, связывают полуацетальную форму восстанавливающих сахаров и тем самым блокируют образование альдегидных форм, что препятствует нежелательному восстановлению меди, разрушению комплексов с аспарагином и выпадению неспецифического красного осадка.

Незначительное изменение концентрации хлоридов или нитратов заметно не влияет на результат. Существенное изменение ионного состава осложняет анализ, поэтому для приготовления среды желательно использовать бакто-триптон и дрожжевой экстракт с контролируемым содержанием примесей. В то же время, несмотря на колебания химического состава некоторых компонентов питательных сред (бакто-триптон и дрожжевой экстракт), небольшие изменения концентраций реагентов позволяют получать хорошо воспроизводимые результаты не только на синтетических средах, такой, как М9, но даже в среде LB.

Гексацианоферрат калия является не только необходимым компонентом основной реакции, но и индикатором, свидетельствующим о наличии или отсутствии токсичных количеств ионов меди. Ионы гексацианоферрата по мере дезамидирования аспа-

рагина удаляются в виде осадка с медью, а ионы меди постоянно находятся в связанном состоянии и на скорость и характер роста культуры не влияют, поэтому испытываемые колонии сохраняются живыми и могут использоваться в дальнейшей работе.

К преимуществам предложенного метода определения L-аспарагиназной активности перед аналогами можно отнести следующие:

1) метод позволяет проводить первичный отбор единичных активных колоний прямо с чашки, что невозможно при использовании других известных способов;

2) метод позволяет оценивать чистоту культуры по активности в отношении L-аспарагина;

3) дифференциальная среда содержит основной субстрат фермента — L-аспарагин, что определяет более высокую специфичность предлагаемого метода по сравнению с аналогами;

4) метод позволяет выявлять активные штаммы не только на синтетических средах, но и на традиционной среде LB, на которой растет большинство микроорганизмов, и, наиболее вероятно, сможет расти модифицированный штамм;

5) метод достаточно прост в применении, используются доступные и недорогие реактивы.

К недостаткам рекомендуемого метода можно отнести многокомпонентный состав среды и использование соединений, потенциально способных провоцировать мутагенез, а также необходимость учитывать особенности метаболизма исследуемых штаммов при оценке результатов.

Таким образом, теоретической основой предлагаемого метода выявления штаммов—продуцентов L-аспарагиназы является химическая цветовая индикация ферментативного гидролиза аспарагина. Метод позволяет выявлять штаммы бактерий, продуцирующих L-аспарагиназу с удельной активностью не менее 0.1–3.0 МЕ/мг белка, и отбирать наиболее активные клоны на твердой среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Obama K., Tara M., Niina K. // *Int. J. Hematol.* 1999. V. 69. № 4. P. 260–262.
2. Yong W., Zheng W., Zhang Y., Zhu J., Wei Y., Zhu D., Li J. // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 163–167.
3. Jaccard A., Petit B., Girault S., Suarez F., Gressin R., Zini J.M., Coiteux V., Larroche C., Devidas A., Thiüblemont C., Gaulard P., Marin B., Gachard N., Bordessoule D., Hermine O. // *Ann. Oncol.* 2009. V. 20. № 1. P. 110–116.
4. Krasoikina J., Borisova A.A., Gervaziev Y.V., Sokolov N.N. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2004. V. 39. № 2. P. 215–221.
5. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А. Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. // *Биомедицинская химия.* 2008. Т. 54. № 6. С. 712–719.
6. Cappelletty D., Chiarelli L.R., Paschetto M.V., Stivala S., Valentini G., Scotti C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 377. № 4. P. 1222–1226.
7. Бансал С., Гнасевари Д., Мишра П., Кунду Б. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 3. С. 457–464.
8. Gilbert H.J., Blazek R., Bullman H.M., Minton N.P. // *J. Gen. Microbiol.* 1986. V. 132. № 1. P. 151–160.
9. Harms E., Wehner A., Jennings M. Pugh K.J., Beacham I.R., Ruhm K.H. // *Protein Expr. Purif.* 1991. V. 2. № 2. P. 144–150.
10. Meister A. *Methods in enzymology II.* New York: Academic Press, 1955. 496 p.
11. Howard J.B., Carpenter F.H. // *J. Biol. Chem.* 1972. V. 247. № 4. P. 1020–1030.
12. Gulati R., Saxena R.K., Gupta R. // *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. V. 24. № 1. P. 23–26.
13. Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С., Холодилов Н.Г., Блинов А.Г., Кузьминов А.В., Головин С.Я., Наякишин А.М., Соловьев В.В., Ямщиков В.Ф., Козкоза В.А., Иванов С.В., Потанов В.А., Санарбаев М.К., Дианов Г.Л., Протопопов М.О., Калачиков С.М., Богачев С.С., Чикаев Н.А. *Методы молекулярной генетики и геномной инженерии.* Новосибирск: Наука, 1990. 248 с.
14. Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 23. P. 8746–8749.
15. Sillen L.G., Martell A.E. *Stability Constants of Metal-ion Complexes.* London: Chemical Soc, 1971. 865 p.

Differential Medium for Revelation of Bacterial Producer Strains of L-asparaginases

M. V. Pokrovskaya, V. S. Pokrovskii, and N. N. Sokolov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119121 Russia

e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

Received May 24, 2010

Abstract—A specific, fast, and easy method for revelation of active plate producers of L-asparaginase using differential medium on the basis of LB or M9 with 1.5% agar was developed. Each 100 ml of LB or M9 medium additionally contained 6–7 ml of glycerol, 4 g of L-asparagine, 0.2 g of CaCO₃, and diagnostic components: 3 ml of 0.2 M CuSO₄ · 5H₂O and 2.5 ml of 0.1 M K₃Fe(CN)₆, pH 7.6–7.8. The results were counted 12–20 or 24–48 h after strain growth at 37°C in corresponding mediums. Red color of colonies and colored zone around them showed the ability of the strain under study to destroy asparaginic complexes. The recommended method allows revealing bacterial strains producing L-asparaginase with specific activity of not less than 0.1–3.0 MU/mg of protein.