

УДК 57.088.1

Цветков И.Л., Поликарпова Л.В., Коницев А.С.
Московский государственный областной университет

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТА

I. Tsvetkov, L. Polykarpova, A. Konichev
Moscow Regional State University (Moscow, Russia)

A NEW METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF DEOXYRIBONUCLEASE ACTIVITY USING FLUOROPHORE LABELED OLIGONUCLEOTIDES AS A SUBSTRATE

Аннотация. Разработан новый метод количественного определения активности дезоксирибонуклеаз, позволяющий исследовать кинетику ферментативной реакции. В качестве субстрата дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) предлагается синтетический двуцепочечный или одноцепочечный олигонуклеотид длиной 25-30 н., несущий флуоресцентные метки в качестве сигнального флуорофора и его тушителя (акцептора энергии испускания). Гидролиз олигонуклеотида ДНКазой в любом месте его короткой последовательности приводит к разобщению меток и появлению сигнала флуорофора, который свидетельствует о накоплении продукта ферментативной реакции. Данный метод применен для определения активности и константы Михаэлиса ДНКаз из пищеварительной железы прудовика обыкновенного.

Ключевые слова: Дезоксирибонуклеаза, определение активности дезоксирибонуклеазы, субстрат дезоксирибонуклеазы, двуцепочечный олигонуклеотид, флуоресценция, сигнальный краситель и тушитель флуоресценции

Abstract. We have developed a new method for quantitative assessment of the activity of deoxyribonucleases, which makes it possible to investigate the kinetics of enzymatic reactions. As a substrate of deoxyribonucleases (DNase) use is made of a synthetic double- or single-stranded oligonucleotide of length 25 – 30 b, which carries fluoretic labels as a reporter and quencher (emission energy acceptor). Hydrolysis of this oligonucleotide of the DNase in any place of its short sequence leads to dissociation and to appearance of the reporter signal, which indicates the accumulation of the product of the enzymatic reaction. This method is used to determine the activity and the Michaelis constant of DNase from digestive gland of the pond snail.

Key words: deoxyribonuclease, determination of deoxyribonuclease activity, substrate of the deoxyribonuclease, double-stranded oligonucleotides, fluorescence, reporter and quencher of fluorescence.

Ставшие классическими методы определения активности дезоксирибонуклеаз (ДНКаз) основываются на способности этих ферментов гидролизовать полимерную молекулу ДНК с высвобождением более коротких её фрагментов (эндонуклеазы) или отдельных нуклеотидов, отщепляемых с 5'- или 3'-конца (экзонуклеазы). В результате гидролиза полимерная молекула ДНК деградирует, и концентрация высокомолекулярной ДНК в реакционной смеси уменьшается [1; 4]. Наблюдать за ходом реакции можно разными способами, но все они сводится к определению остаточной концентрации высокомолекулярной ДНК, которую измеряют непосредственно по величине поглощения раствора при 260 нм (после освобождения от олигонуклеотидных фрагментов ДНК – продуктов ферментативной реакции) или после окрашивания специфичными красителями, позволяющими работать в видимой области спектра поглощаемого света (например, крезоловый красный).

Данные методы широко распространены в практике биохимических и медицинских исследований, однако не лишены существенных недостатков, которые связаны с физико-хими-

ческими особенностями субстрата ДНКаз – молекулы ДНК. Один из них – сложность дифференциации (разделения) олигонуклеотидов и высокомолекулярной ДНК, поскольку в ходе реакции образуется масса промежуточных продуктов – фрагментов ДНК, которые существенно меньше исходной молекулы. Присутствие этих промежуточных продуктов реакции затрудняет точное определение остаточной концентрации высокомолекулярной ДНК и приводит к значительной погрешности в расчет активности ДНКазы. Более того, методы, сопряженные с физической элиминацией олигонуклеотидов по окончании реакции, например, путем осаждения высокомолекулярных фракций этанолом, допускают неизбежные потери при осаждении и последующем растворении остаточной ДНК и как следствие, столь же неизбежную ошибку в результатах измерений.

Другой существенный недостаток классических методов определения активности ДНКазы – использование субстрата, в котором число гидролизуемых ферментом связей не только превышает одну, но и вообще практически ничем не ограничено, а это не позволяет исследовать кинетические характеристики работы фермента, в частности зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, что необходимо для определения константы Михаэлиса (K_m). В тоже время это весьма существенный признак, по которому можно дифференцировать отдельные изоферменты и множественные формы (в очищенных препаратах), оценивая степень их сродства к субстрату, а также характеризовать молекулярную изменчивость у организма, происходящую вследствие существования в определенных условиях обитания [2; 3].

С целью повысить точность определения активности ДНКазы, сделать эту процедуру более технологичной и получить возможность исследовать зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, мы разработали новый метод, который основан на использовании в качестве субстрата синтетического олигонуклеотидного фрагмента ДНК (одно- или двуце-

почечного), меченого парой флуорофоров: сигнальный краситель и тушитель флуоресценции, аналогично зондам типа *TaqMan* для проведения ПЦР с детекцией продуктов в реальном времени.

Материалы и методы

Материалом служили моллюски прудовик обыкновенный (*Limnaea stagnalis* L.), из пищеварительной железы которого получали экстракт водорастворимых белков путем гомогенизации с 10-кратным объемом 0,15М NaCl и последующего центрифугирования при 10000 g и 4°C для освобождения от клеточного дебриса. Концентрацию белка в полученном экстракте определяли методом Лоури. Для проведения ферментативной реакции в реакционной пробирке смешивали 20 мкл инкубационной среды (0,05М ацетатный буфер с оптимальным рН 4,2), содержащей 50 пмоль субстрата, и 0,5-1 мкг белка в 5 мкл водного раствора. Пробирку помещали в детектирующий термоциклер ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), предназначенный для проведения ПЦР с детекцией продуктов в реальном времени, где инкубировали сначала 30 сек. при 37°C для выравнивания температуры в пробирках и инициации реакции, а затем при той же температуре еще 300 циклов по 20 сек., после каждого из которых прибором регистрировалась величина флуоресценции сигнального красителя, высвобождавшегося в процессе реакции. За единицу принимали такую каталитическую активность ДНКазы, которая вызывает прирост интенсивности флуоресценции реакционной смеси на 1 ед. за 1 мин. Прирост интенсивности флуоресценции определяли по разнице между начальным (1-й цикл) и конечным (300-ый цикл или тот, после которого изменений флуоресценции не наблюдалось – кривая флуоресценции выходила на плато) ее значениями. Контролем считали разницу величин флуоресценции, полученную в тех же условиях без белка, которая практически всегда равнялась нулю. При вычислении константы Михаэлиса измерения производили

аналогично, но для каждого исследуемого образца готовили серию растворов субстрата так, чтобы его конечная концентрация составляла от 0,1 до 4 мкМ (от 2,5 до 100 пмоль на реакцию), а также раствор без субстрата в качестве начальной точки.

Субстратом ДНКазы служил синтетический двуцепочечный олигонуклеотид (олиго-дцДНК, 27-30 п.н.), одна из цепей которого несет две флуоресцентные метки. На 5'-конце (ОН-Pi) – сигнальный краситель 5(6)-карбоксих-родамин (ROX, максимум поглощения – 580 нм, испускания – 605 нм), на 3'-конце (ОН-дезоксирибоза) – его тушитель ВНQ-2 (Black Hole Quencher), который является акцептором возбуждения сигнального красителя, пока ковалентные связи между ними не нарушены, т. е. олиго-дцДНК не поврежден ДНКазой. Данная схема мечения олигонуклеотидов широко используется для конструирования олигонуклеотидных зондов на основе одноцепочечной ДНК (олиго-оцДНК) для ПЦР с детекцией продукта в реальном времени (*TaqMan*-зонды).

В нашем случае к *TaqMan*-зонду была синтезирована комплементарная немеченая олиго-оцДНК, которая после смешивания со своим меченым гомологом в эквимольных количествах была гибридизована путем инкубации 1 мин при 95°C и 40 мин при 60°C (на 5°C ниже расчетной температуры плавления олиго-оцДНК). Синтез олиго-дцДНК был произведен с целью повышения сродства к ДНКазе, поскольку олиго-оцДНК этот фермент гидролизует с меньшей на 20-40% эффективностью. В тоже время есть сведения о ДНКазах, которые специфически гидролизуют именно одноцепочечную ДНК, таким образом, используя в качестве субстрата олиго-оцДНК (при отсутствии в первичной структуре ДНК последовательностей, образующих шпильки и гомодимеры) можно дифференцировать активность таких ферментов и исследовать субстратную специфичность не изученных ранее форм ДНКаз. По нашему предположению, активность рибонуклеаз (РНКаз) можно определять совершенно аналогичным образом, используя в качестве

субстратов как олиго-оцРНК, так и олиго-дцРНК, однако на практике это предположение мы пока не проверяли.

Результаты и обсуждение

Поскольку интенсивность флуоресценции в условиях проведения эксперимента прямо пропорциональна концентрации образовавшегося продукта – дезинтегрированного олиго-дцДНК и связанных с ним флуорофоров сигнального красителя и его тушителя, кривые изменения флуоресценции в реакционной смеси показывают, насколько быстро в ходе реакции гидролизовался субстрат и накапливался продукт (рис. 1 и 2, графики сгенерированы программным обеспечением «Real time PCR v. 7.3» к прибору ДТ-96 в отчетном протоколе о результатах анализа; условия проведенных экспериментов отличались количеством белка, взятого в реакцию, на рис. 1 – 0,5 мкг/р-цию, на рис. 2 – 1 мкг/р-цию, что отразилось на разном времени исчерпания субстрата). Поскольку статистически достоверных изменений флуоресценции в реакционной смеси без белка не наблюдалось, мы полагаем, что накопление продукта может быть обусловлено только активностью ДНКаз пищеварительной железы прудовика.

Собственно экстракт белка из пищеварительной железы прудовика флуоресценции реакционной смеси не вызывает, поскольку таковая отсутствует в пробах, где отсутствовал субстрат. Кроме того, флуоресценция проб с очень низкой концентрацией субстрата (1 мкМ и менее) хоть и улавливалась детектором, но была очень мала и менялась весьма непродолжительное время (в пределах до 50 циклов от начала реакции, т. е. в течение около 15 мин), что очевидно свидетельствует об исчерпании субстрата в реакционной смеси (см. рис. 1 и 2, соответствующие кривые изменения флуоресценции могут быть локализованы по их описанию в вышеприведенном тексте). Поскольку для количественного определения активности фермента, а точнее, скорости ферментативной реакции кроме прироста содержания продукта требуется

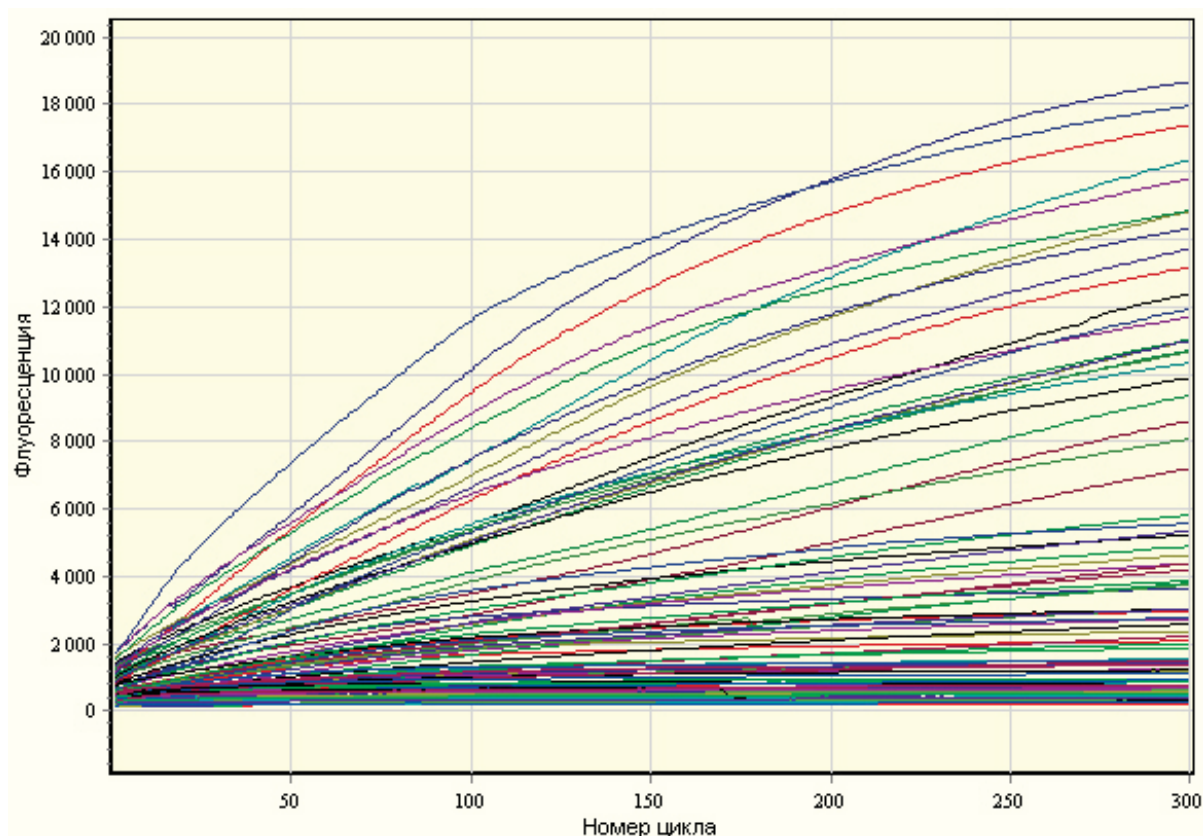


Рис. 1. Кривые флуоресценции – накопление продукта происходит в течение всех 300 циклов (100 мин).

знать время, в течение которого наблюдался этот прирост, для каждой кривой или всей группы кривых изменения флуоресценции в пределах одного опыта мы устанавливали число циклов измерения флуоресценции, прошедших до момента выхода кривой на плато. Это позволило избежать погрешности вычислений, связанных с введением временной характеристики на этапе когда ферментативная реакция уже остановилась.

Чтобы избежать подобных сложностей в дальнейшем, мы планируем измерять активность ДНКазы с заведомо избыточной концентрацией субстрата, чтобы она не лимитировала скорость ферментативной реакции, и тогда время протекания реакции можно будет устанавливать одинаковым для всех экспериментов. Впрочем, чтобы точно определить, какая концентрация субстрата является избыточной, также очень удобно использовать детекцию продукта в реальном времени. Это помогает оптимизировать условия реакции значительно

эффективнее, нежели только выявление разницы между начальным и конечным значениями интенсивности флуоресценции.

Определение K_m ДНКазы прудовика было заключительным этапом нашей работы, а её результаты стали еще одним доказательством прямой связи измеряемого нами изменения флуоресценции реакционной смеси с накоплением продукта ферментативной реакции с субстратом – флуоресцентно меченой олиго-дцДНК, а также подтверждением нашего предположения о том, что олигонуклеотид может представлять собой субстрат, отвечающий требованиям и пригодный для изучения кинетики ферментативной реакции. Действительно, чтобы зарегистрировать флуоресценцию сигнального красителя достаточно разрыва только одной нуклеотидной связи в молекуле олиго-дцДНК, тогда как последующая деградация олигонуклеотида уже не отразится на уровне флуоресценции продуктов. При условии избытка субстрата

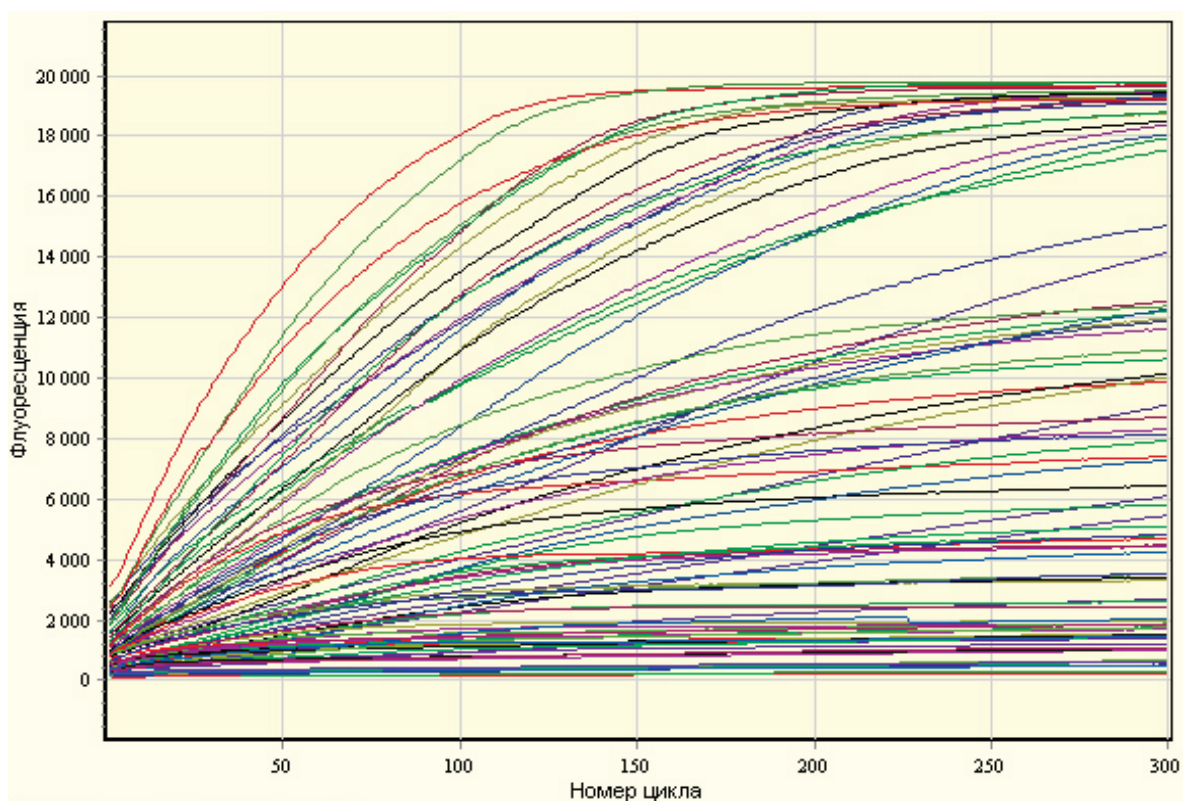


Рис. 2. Кривые флуоресценции – накопление продукта в значительной части проб происходит до максимального значения, далее не изменяется. Конечным циклом для всей серии опытов назначен 150-й; по величине флуоресценции на этом цикле рассчитывали активность фермента во всех реакциях.

вероятность того, что одна и та же молекула будет атакована ДНКазой неоднократно теоретически невелика, поскольку размеры олиго-дцДНК относительно малы. Из этого следует, что пока субстрат не будет исчерпан полностью, зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации субстрата будет оставаться линейной, а после его исчерпания дальнейший распад фрагментов исходного меченого олиго-дцДНК на результаты измерения скорости реакции не повлияет.

На практике результаты измерений активности ДНКаз прудовика с серией концентраций субстрата вполне соответствовали ожидаемым (рис. 3). Максимальная активность ДНКаз, определенная у трех особей прудовика, различалась довольно существенно в соответствии с индивидуальными особенностями животных (пол, возраст, упитанность и пр.), в тоже время K_m у них оказалась практически равной, что свидетельствует о фундаменталь-

ных видоспецифичных молекулярных особенностях ДНКаз, на которых не сказывается функциональное состояние организма и срочная адаптация к условиям обитания, таких, как сродство к субстрату, характеристикой которого и является константа Михаэлиса.

Заключение

Таким образом, разработанный нами метод количественного определения активности ДНКаз принципиально отличается от используемых в настоящий момент тем, что позволяет исследовать кинетические особенности нуклеаз совершенно аналогично другим ферментам, для которых уже известны подходящие для таких целей субстраты. Более того, измерение флуоресценции продукта не требует остановки реакции, а значит, позволяет непосредственно наблюдать за ходом превращения субстрата. Это

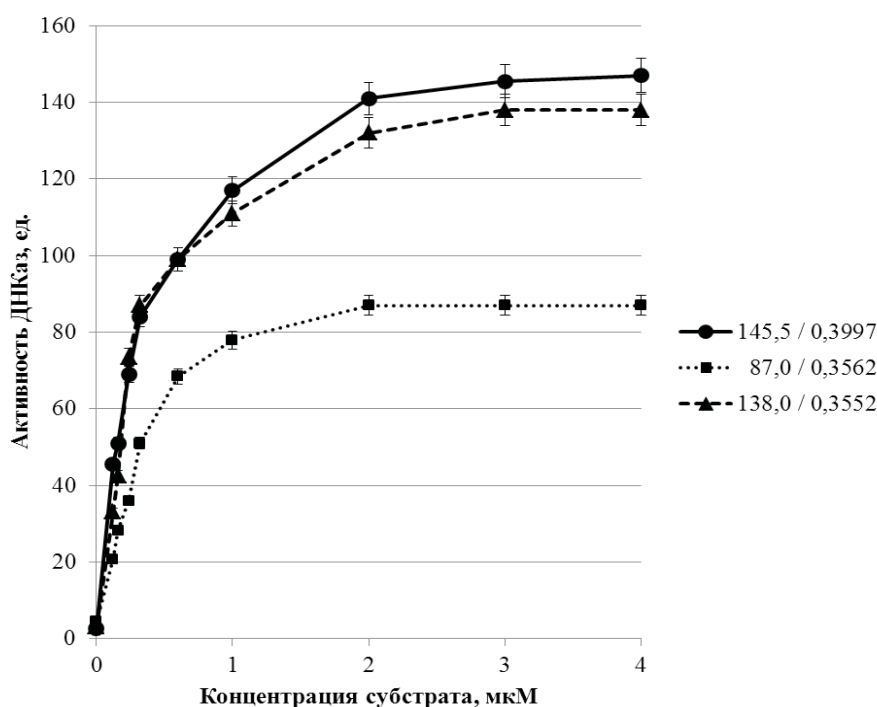


Рис. 3. График зависимости активности ДНКаз пищеварительной железы прудовика от концентрации субстрата – флуоресцентно меченой олиго-дцДНК. Три кривые соответствуют результатам измерений для трех особей прудовика, справа указаны V_{max} , ед. / Км, 10^{-6} М.

обстоятельство не только важно для выявления кинетики ферментативной реакции, оно создает дополнительное удобство для оптимизации условий ее протекания. Предложенный нами метод отличается рядом других преимуществ, а именно большей точностью, основанной на измерении флуоресценции реакционной смеси, высокими технологичностью и пропускной способностью ввиду специфики используемого оборудования, а также прост для реализации и экономичен в отношении количества используемых реагентов. Его применение может существенно расширить круг решаемых научных и прикладных задач, а также повысить плотность и качество результатов исследований в самых разных областях биологии, химии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бочкова А.П., Филиппович Ю.Б., Коничев А.С. Выделение, очистка и свойства кислой дезоксирибонуклеазы грены тутового шелкопряда // Биохимия. – 1982. – Т. 47. – Вып. 3. – С. 489-496.
2. Поликарпова Л.В. Константа Михаэлиса кислой фосфатазы как критерий внутривидовой дифференциации гидробионтов открытых водоемов Московской области // Сб. науч. тр. Междунар. заоч. науч.-практ. конф. «Наука сегодня: теоретические аспекты и практика применения» Тамбов, 28 октября 2011 г. – С. 98-100.
3. Поликарпова Л.В., Цветков И.Л., Коничев А.С. Константа Михаэлиса–Ментен кислой фосфатазы, как критерий антропогенного влияния на внутривидовую дифференциацию леща (*Abramis brama*) в Рыбинском водохранилище // Мат. IV Всерос. конф. по водной экотоксикологии, посв. памяти Б.А. Флерова «Антропогенное влияние на водные организмы и экосистемы» 24-29 сентября 2011 г. Ч. 1. Борок: Изд-во ИБВВ им. И.Д. Папанина, 2011. – С. 203-207.
4. Соловьев В. Б. Практикум по энзимологии: учебно-методическое пособие / Ред. В.Б. Соловьев, М.Т. Генгин. – Пенза: Изд-во ПГПУ им. В.Г. Беллинского, 2007. – 52 с.