

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТЕАЗЫ ЕСП32 — УНИКАЛЬНОГО ИНСТРУМЕНТА В ИЗУЧЕНИИ АКТИНА

© А. В. Морозова,¹ С. Ю. Хайтлина, А. Ю. Малинин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: avmoro@gmail.com

Протеаза ЕСП32 необходима в исследованиях актина, основного белка мышц и цитоскелета. Источником фермента является природный штамм энтеробактерий, в минорных количествах накапливающий протеазу внутри клетки в постэкспоненциальной фазе роста. Биосинтез лимитируется количеством кислорода, поступающего в среду. Предложен высокоэффективный метод двухфазного культивирования продуцента с повышенным уровнем аэрирования в экспоненциальной фазе роста. Исследованы свойства фермента и показано, что возможности использования аффинного или иного одностадийного способа выделения ограничены. Разработан простой в воспроизведении метод получения и хранения препарата ЕСП32 со степенью чистоты и уровнем активности, отвечающими высоким требованиям структурно-функциональных исследований актина.

Ключевые слова: актин, протеаза ЕСП32, ограниченный протеолиз, постлогарифмический синтез, внутриклеточные ферменты бактерий, очистка белков.

Принятые сокращения: КЖ — культуральная жидкость, MWCO — предел пропускания ультрафильтрационной мембраны (molecular weight cut off).

Актин, расщепленный протеазой ЕСП32, обратимо теряет способность к полимеризации (Khaitlina et al., 1991, 1993), что сделало ЕСП32 уникальным инструментом для изучения функциональных свойств актина (Orlova, Egelman, 1995; Khaitlina, Hinssen, 1997; Negulyaev et al., 2000; Морозова и др., 2001; Khaitlina, Strzelecka-Golaszewska, 2002; Walders-Harbeck et al., 2002; Moraczewska et al., 2004; Wawro et al., 2005; Klenchin et al., 2006). Это внутриклеточная металлопротеиназа мол. массой 32 кДа, накапливаемая на постлогарифмической фазе роста природного штамма бактерий, идентифицированного в 1988 г. как *Escherichia coli* A2 (Khaitlina et al., 1988, 1991; Усманова, Хайтлина, 1989; Matveyev et al., 1996). Она ускоряет гидролиз лишь одной, не затрагиваемой другими протеазами, связи в актине Gly42—Val43 (рис. 1), которая играет ключевую роль в функционировании этого белка в клетке. Факт протеолиза однозначно устанавливается при помощи электрофореза (рис. 2).

Предметом данной статьи является разработка маломаштабного, быстрого и минимально трудоемкого метода получения ЕСП32, постлогарифмической внутриклеточной протеазы природного штамма энтеробактерий, не имеющая ранее описанных аналогов.

В литературе описаны в основном коммерчески значимые внеклеточные протеазы (Цаплина, 1979; Barrett et al., 1998). Их уровень синтеза и выброса в среду сильно зависит от ряда факторов наращивания, что позволяет значительно повысить выход ферментов за счет оптимизации условий биосинтеза. Для внутриклеточных ферментов, которые синтезируются природными штаммами в небольших количествах — в случае ЕСП32 это сотые

доли процента от белков экстракта, — обычно используют генно-инженерные методы. Создание сверхпродуцента ЕСП32 осложняется проблемами экспрессии гена постлогарифмической протеазы с неизвестной природной функцией, потенциально токсичной для бактериальной клетки-хозяина. Исследование индивидуальных свойств белка и разработка метода его получения в дальнейшем могут оказаться полезными для выделения и рекомбинантного продукта.

Материал и методика

В работе исследовали штамм *E. coli* A2 (регистрационный номер ВКПМ 3697). Бактериальную культуру выращивали при 35 °С в среде 2LBS следующего состава: пептон — 20 г/л, дрожжевой экстракт — 10 мл/л, NaCl — 10 г/л, pH 7.0. Для двухфазного культивирования (Schultz, Gerhardt, 1969) использовали колбы Эрленмейера объемом 750 мл с 2—3 ребрами (складками стеклянной стенки) в придонной части для фиксации агаризованной фазы. В колбы наливали по 200 мл стерильной среды 2LBS с 3 % агара. После затвердевания агаризованного слоя на него наливали 50 мл стерильной среды 2LBS или фильтрованной воды; в последнем случае систему оставляли уравниваться в течение ночи. В качестве инокулята использовали 18—20-часовую культуру, посевная концентрация составляла 5—7 % по объему. После засева систему инкубировали на роторной качалке при 200 об/мин 24 ч. Для более полного использования питательных веществ среды полученные 50 мл культуральной

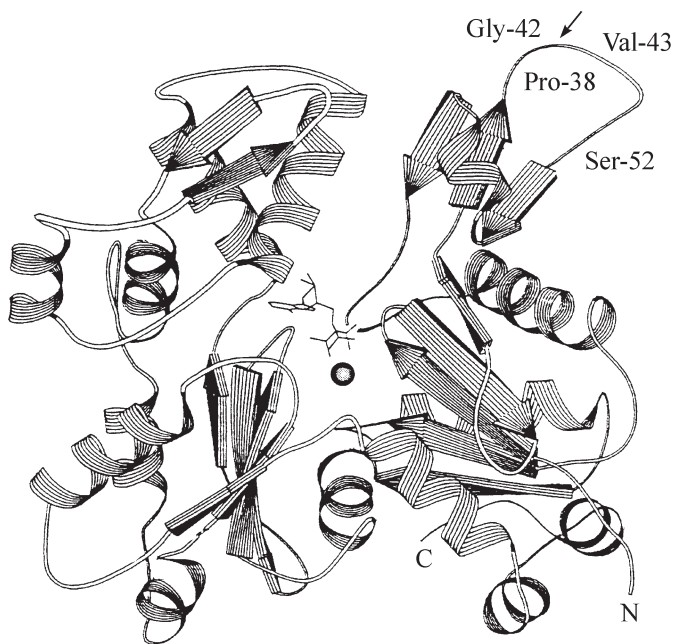


Рис. 1. Трехмерная структура мономера актина (использованы данные из работы Holmes et al., 1990).

Стрелкой указано место воздействия протеазы ЕСР32.

жидкости (КЖ) сливали в пустые стерильные колбы, агаризованный слой вновь заливали 50 мл стерильной 2LBS. Посевным материалом служили бактерии, задержавшиеся на агаризованном слое. Через 24 ч встряхивания эти вторые 50 мл КЖ сливали в другие пустые колбы, третий раз заливали 50 мл 2LBS. Слитые порции суточной КЖ инкубировали 24 ч без встряхивания.

Прирост биомассы определяли по массе осадка бактерий, отмытого буфером Т (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5) и по оптической плотности КЖ при 600 нм.

При очистке протеазы все процедуры проводили при 0 °С, хроматографические стадии — при 20 °С. Клетки осаждали центрифугированием КЖ в течение 30 мин при 5000 g. Для получения бесклеточного экстракта осадок бактерий суспендировали в буфере Т до концентрации 200 г/л. Добавляли сухой сульфат аммония до 30%-ного насыщения при 0 °С и разрушали порциями по 100 мл на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 У 4.2 при частоте 22 кГц и мощности, соответствующей 0.2 А, 40 раз по 15 с при активном перемешивании с промежутками для охлаждения. Центрифугировали при 17 500 g 30 мин. Белки супернатанта высаливали сульфатом аммония до 90%-ного насыщения и центрифугировали при 5000 g 40 мин. К осадку добавляли полтора объема буфера Т, чтобы в полученном суммарном объеме концентрация сульфата аммония составляла около 0.8 М (Скоупс, 1985).

Полученный препарат протеазы в количестве 500—600 мг белка при скорости 0.3 мл/мин наносили на гидрофобный сорбент фенилсефарозу CL-4В, уравновешенный 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в буфере Т (13 мл сефарозы в колонке диаметром 6 мм). Колонку промывали 30 мл 0.8 М и линейным градиентом от 0.80 до 0.08 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в буфере Т (объем градиента 100 мл) и далее элюировали протеазу 55—60 мл буфера Т. Отбирали первые 15 мл элюата и на выход колонки подключали колонку с уравновешенным буфером Т анионообменником Q-сефароза Fast Flow (7 мл в колонке диаметром 4 мм). После прохождения

всего объема буфера Т первую колонку отсоединяли и на Q-сефарозу наносили отобранные первые 15 мл элюата с фенилсефарозы. Элюировали ЕСР32 с Q-сефарозы 15 мл 200 мМ NaCl в буфере Т при скорости 0.4 мл/мин, концентрировали и доочищали препарат ультрафильтрацией. Использовали ячейки: для концентрирования и удаления низкомолекулярных примесей с мембранами с MWCO 30 кДа, для удаления высокомолекулярных примесей — с MWCO 100 кДа.

Концентрацию белка определяли микробиуретовым методом (Itzhaki, Gill, 1964).

Протеолитическую активность препаратов определяли по способности гидролизовать G-актин. Использовали свежеприготовленные (Spudich, Watt, 1991), 1 раз замороженные или свежеразведенные лиофильно высушенные препараты актина. К раствору G-актина (1 мг/мл в 0.5 мМ АТФ, 0.2 мМ CaCl_2 и 2 мМ Трис-НСl, рН 7.5) добавляли равный объем разведенного в буфере Т препарата протеазы с концентрацией белка не более 1 мг/мл. Смесь инкубировали 1 ч при 20 °С и подвергали Ds-Na-ПААГ-электрофорезу (Laemmli, 1970). Ферментативную активность вычисляли из соотношения поглощения окрашенных кумасси ярко-голубым G-250 зон продукта протеолиза (36 кДа) и интактного актина (рис. 2). За 1 ед. активно-

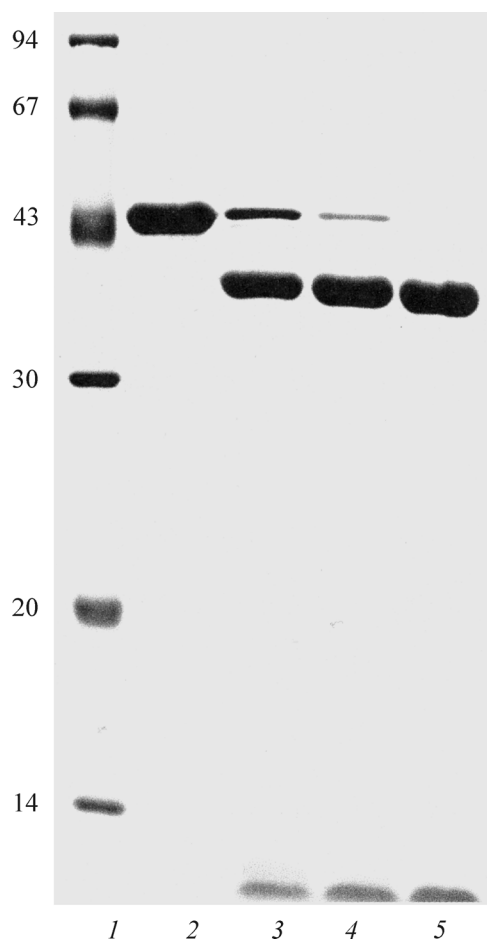


Рис. 2. Расщепление G-актина протеазой ЕСР32.

Электрофореграмма в 12.5%-ном Ds-Na-ПААГ: 1 — белки-маркеры (слева указана их молекулярная масса, кДа); 2 — интактный G-актин; 3—5 — G-актин, обработанный бесклеточным экстрактом продуцента ЕСР32 при соотношении концентраций белка-субстрата и экстракта 10 : 1. Время инкубации при 20 °С: 1 (3), 2 (4) и 24 (5) ч.

сти принимали количество протеазы, гидролизующее 100 мкг G-актина за 1 ч при 20 °С.

Поликлональные антитела к ECP32 получали по описанной ранее методике (Морозова и др., 2001). Вестерн-блоттинг проводили по стандартной методике (Towbin et al., 1979) с незначительными модификациями. В качестве вторых антител использовали IgG, конъюгированные с пероксидазой. Визуализировали результат реакции при помощи 3,3'-диаминобензидинтетраоксида.

Для выбора способа стабилизации ECP32 в разбавленных растворах очищенный препарат ECP32 разводили до концентрации 0.02 мкг/мл: в буфере Т (контрольная проба), или в 1 мг/мл БСА, или 0.01—0.05 % Тритона X-100, или 5—25 % глицерина в том же буфере и инкубировали 16 ч при 4 °С.

Использованные реактивы получены от фирм Sigma и Difco (США), Serva и Merck (Германия), Fluka (Швейцария), носители для колоночной хроматографии — от фирм LKB-Pharmacia (Швеция) и Whatman (США), мембраны для фильтрации и блоттинга — от фирм Amicon (США) и Sartorius (Германия).

Результаты

Высокоэффективный метод получения ECP32-содержащей биомассы. При двухфазном культивировании при соотношении твердой и жидкой фаз 200 : 50 концентрация биомассы достигала 83 г/л, тогда как лучшее значение, полученное при максимально возможном уровне аэрации для обычного наращивания в жидкой среде (50 мл среды в колбе 750 мл на качалке), составляет 12 г/л. Даже при повторном использовании агаризованного слоя в двухфазной системе (см. раздел «Материал и методика») получена концентрация биомассы в жидкой среде 11—12 г/л.

Возможности быстрого выделения ECP32, основанного на индивидуальных свойствах белка. При очистке любого нового белка стратегия в целом универсальна — отделение от других белков по размеру, заряду и гидрофобности. Ранее разработанные (рис. 3, А, Б) процедуры очистки ECP32 не выходят за рамки этой стратегии. Рассматривая индивидуальные свойства белка, можно обнаружить такие, которые позволят ввести в выделение стадию с очень высокой степенью очистки.

На порядки эффективнее других аффинные методы. На базе полученных антител ранее нами был предложен метод аффинной хроматографии (Морозова и др., 2001). Выход протеазы составлял лишь 5—6 %. Возможно, это связано с нарушением функционирования антител при их иммобилизации на гранулах хроматографического носителя. Иммобилизацию можно исключить, используя, например, аффинную ультрафильтрацию с теми же антителами. Окраской в иммуноблоттинге и в Ds-Na-ПААГ-электрофорезе было показано, что при взаимодействии протеазы с антителами в растворе получался не активный, но полностью сохранивший белковую зону ECP32 препарат. К сожалению, при добавлении 1 М иодида калия для диссоциации комплекса протеаза—антитела ни активности, ни зоны ECP32 в препарате не обнаружили. Осуществить разрыв высокопрочной связи антиген—антитело без разрушения молекулы протеазы не удалось.

В случае устойчивости белка к значению рН или температуры большая часть других белков экстракта может быть удалена коагуляцией.

При рН 3.5—9.0 протеаза не теряла активности, при воздействии рН 3.0 и 9.0—11.0 восстановление активности возможно лишь при немедленной нейтрализации препарата. После 30 мин прогрева при 56 °С полностью исчезали как активность фермента, так и зона протеазы 32 кДа не только в Ds-Na-ПААГ-электрофорезе при окраске Ку-масси, но и в иммуноблоттинге с анти-ECP32-антителами. Такая же картина наблюдалась при прогреве при 43 °С в течение 15 ч. Однако при ингибировании активности ECP32 перед нагреванием до 50—56 °С добавлением к препарату ECP32 0.5 % Ds-Na, или 2 мМ *o*-фенантролина, или 4 мМ ЭДТА, или при снижении рН до 2.7 получали не активный препарат, но содержащий ECP32 белковую зону. Следовательно, при прогреве интактной протеазы происходит автопротеолиз и активность теряется необратимо.

Устойчивость к мочеvine может позволить выделять белок в одну стадию методом ПААГ-электрофореза с мочевиной (Panyim, Chalkley, 1969), устойчивость к Ds-Na — методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза (Laemmli, 1970).

При обработке протеазы 1.6 М мочевиной ECP32-активность составляла около 60 % от исходной, при обработке 4 М — менее 15 %, независимо от времени инкубации фермента с мочевиной. При последующем диализе после обработки мочевиной в концентрации от 4 до 8 М активность восстанавливалась от 90 до 55 % соответственно.

Несмотря на то что большинство ферментов необратимо инактивируется Ds-Na, многие протеазы очень устойчивы к действию этого агента даже при длительной инкубации (Wachneldt, 1975; Paech et al., 1993). Малые количества Ds-Na способны активировать протеолитические ферменты и даже влиять на их специфичность (Mukles, Haire, 1991). Методически удобным является то, что Ds-Na может быть удален из реакционной среды простым высаживанием KCl; известно, что образующийся осадок практически не увлекает с собой белок из раствора (Suzuki, Terada, 1988). При инкубировании ECP32 с 0.2—1.0 % Ds-Na наблюдали полное ингибирование фермента. После добавления к препарату с 0.3 % Ds-Na KCl в количестве, соответствующем двойному стехиометрическому отношению к Ds-Na, протеаза восстанавливала 70 % исходной активности; в случае 1 % Ds-Na активность не восстанавливалась. При обработке ECP32 Ds-Na в концентрациях ниже 0.15 % вплоть до 0.025 % при одновременном добавлении субстрата наблюдали быстрый неограниченный протеолиз последнего. При длительной (15 ч) инкубации ECP32 с 0.05 % Ds-Na при 20 °С без субстрата препарат полностью терял активность; происходило и разрушение фермента, так как при иммуноблоттинге с анти-ECP32-антителами зону протеазы в препарате не обнаруживали. Следовательно, можно говорить об активации ECP32 низкими концентрациями Ds-Na, приводящей в отсутствие субстрата к автопротеолизу фермента.

Таким образом, ECP32 сохраняется лишь в близких к физиологическим условиям, возможности одностадийного высокоэффективного выделения ограничены.

Разработанный экспресс-метод выделения ECP32 (рис. 3, В) состоит всего из четырех стадий (лизирование, высаливание, одноэтапная двухступенчатая

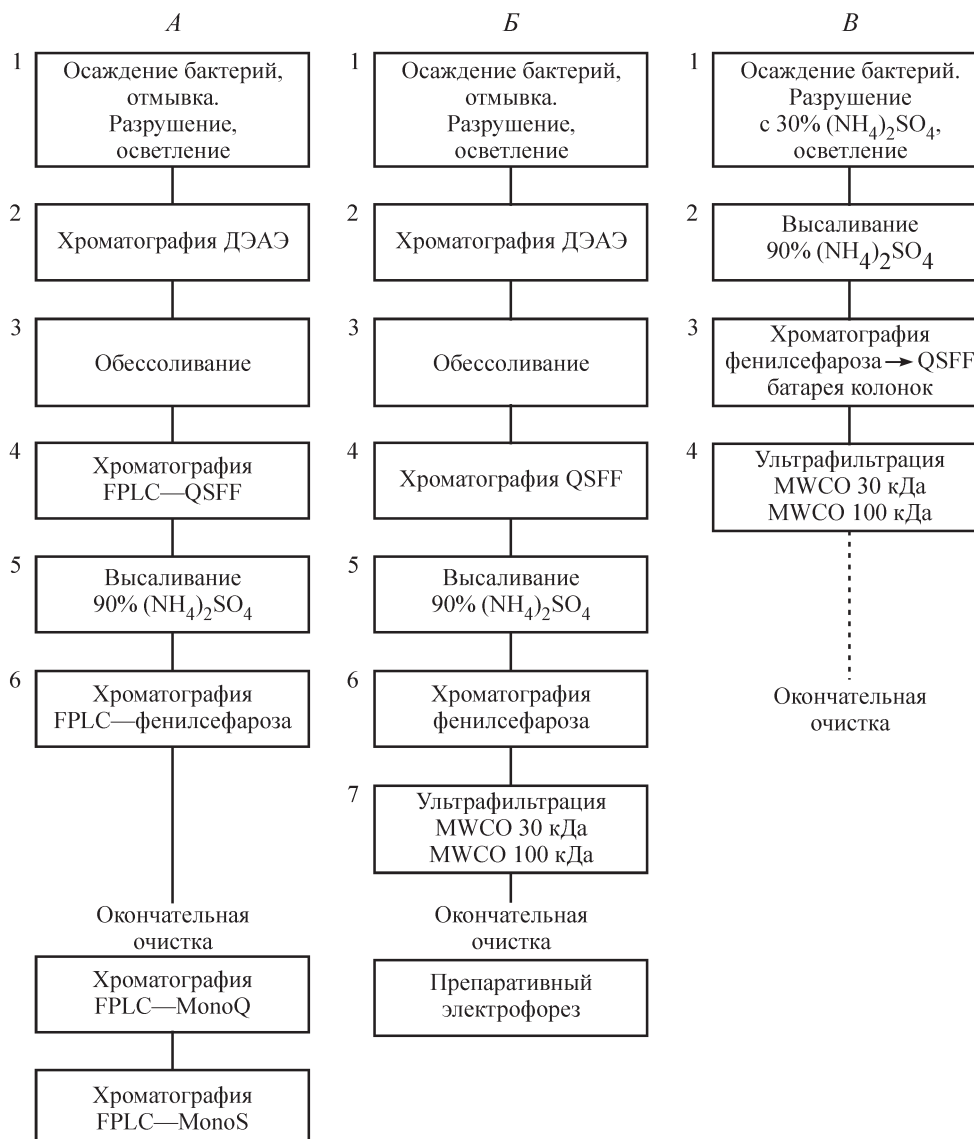


Рис. 3. Схемы очистки протеазы ECP32.

a — по: Matveyev et al., 1996; *Б* — по: Морозова и др., 2001; *В* — согласно данным настоящей работы. Фенилсефароза — носитель для распределительной хроматографии; ДЭАЭ, QSFF, MonoQ и MonoS — ионообменники; FPLC — установка для высокоскоростной жидкостной хроматографии (Pharmacia). Концентрация (NH₄)₂SO₄ выражена в процентах от концентрации насыщенного раствора при 0 °С.

хроматография и ультрафильтрация) против семи в схеме *Б* и не требует высокотехнологичного оборудования (FPLC), как в схеме *А* (рис. 3). Реализация схем *А* и *Б* требовала нескольких недель работы, по предлагаемой схеме *В* выделение занимает 3 рабочих дня. На выходе стадии 4 (схема *В*) получен препарат с почти 100-кратной степенью очистки (высаливание обеспечивало увеличение удельной активности в 1.2 раза, хроматографическая стадия — в 10 раз, ультрафильтрация — в 8 раз) при выходе 40 %.

Для увеличения степени очистки можно элюировать препарат с Q-сефарозы градиентом соли, фракционировать, как ранее (Matveyev et al., 1996; Морозова и др., 2001), а не собирать единым пулом. В силу упрощения процесса наработки биомассы можно не доочищать материал с низкой активностью, отбирая лишь лучшие фракции. Степень очистки многократно возрастает, однако высокоочищенные препараты протеазы с низкой концентрацией белка и при замораживании, и при хранении при 4 °С теряют активность.

Чтобы выявить возможности сохранения протеолитической активности, препарат ECP32 с более чем 1000-кратной степенью очистки разводили до концентрации 0.02 мкг/мл в растворах БСА, Тритона X-100 или глицерина. Через 16 ч инкубация при 4 °С в контрольной пробе активность упала до 5 % от исходной, в пробе с 1 мг/мл БСА она составляла 150 %. Тритон X-100 и глицерин заметного влияния на активность не оказывали. Следовательно, для протектирования протеазы в разбавленных растворах целесообразно использовать БСА. Но часто этого не позволяют условия последующего эксперимента с актином.

Было показано, что для исследований актина достаточно получаемая в экспресс-методе 100-кратная степень очистки фермента. Отсутствие сопутствующих примесей, искажающих результаты, подтверждено при помощи препаратов, обработанных анти-ECP32-антителами, т. е. избирательно лишенных только ECP32-активности.

Обсуждение

Известно, что количество кислорода, поступающего в среду, является основным лимитирующим фактором для роста продуцента и синтеза протеазы. Главной проблемой биосинтеза в таких случаях являются низкая растворимость кислорода в питательных средах и его медленная диффузия через границу газ—жидкость. Для увеличения аэрации необходимо увеличивать площадь раздела фаз: мы использовали метод двухфазного культивирования. Большая часть объема питательной среды фиксирована агаром на дне колбы, жидкая часть имеет малый объем, следовательно, большое соотношение поверхности контакта с воздухом к объему и потому очень интенсивно аэрируется. Культура развивается в жидкой части среды и значительно концентрируется благодаря высокой насыщенности кислородом и наличию объемного резервуара в виде агаризованной части, откуда поступают питательные вещества и куда отводятся продукты обмена. Увеличение концентрации бактерий в КЖ особенно важно в связи с очень плохой седиментацией продуцента ECP32 даже по сравнению с другими энтеробактериями.

Ранее разработанные методы очистки ECP32 (рис. 3, А, Б) имели целью получение препаративного количества максимально чистого препарата для исследования самого фермента. Для универсальных носителей достигнутой степени очистки предельно высока. Теперь, при использовании протеазы как инструмента, для большинства задач не требуется полной белковой гомогенности препаратов, необходимы лишь их высокая активность по ECP32 и отсутствие ряда других активностей, в основном протеолитических и АТФазных. Выделение ECP32 можно сделать рутинным.

Плохая седиментация штамма продуцента и клеточных оболочек затрудняет процесс получения бесклеточного экстракта. Известно, что при высаливании белков экстракта сульфатом аммония при 30%-ном насыщении протеаза количественно остается в растворе. Перед обработкой ультразвуком в суспензию клеток добавили сульфат аммония, объединив время дезинтеграции и инкубации лизата с сульфатом для формирования осадка (рис. 3, В, стадия 1). Осадок клеточных оболочек получился более плотным, в результате время центрифугирования лизата снизили в 2 раза. Потери ECP32-активности не было, а концентрация общего белка в полученном экстракте стала на 3—5 % ниже контрольной. Последующее высаливание (90 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) целевого компонента из экстракта позволило ликвидировать еще одну стадию центрифугирования — первоначальную отмывку бактерий от компонентов нативного раствора буфером Т. Проверили, что при высаливании белков нативного раствора сульфатом аммония в интервале 30—90 % насыщения осадок не образовывался.

Получение бесклеточного экстракта и очистка фермента обычно разнесены во времени, при этом хранение замороженных экстрактов всегда связано с риском. Экстракт в виде осадка с 90 % сульфата аммония хранится при 4 °С в течение нескольких лет без потери активности.

Из эффективных методов выделения белков (Скоупс, 1985) большинство можно использовать лишь после предварительной очистки экстракта, так как для них недопустимо присутствие клеточных органелл, фрагментов мембран, небелковых биологически активных соединений. Обычно это высаливание и(или) бэтч-ионообмен

(ДЭАЭ, рис. 3, А, Б). С другой стороны, традиционная последовательность хроматографической очистки включает в себя вначале более производительную, но менее ограниченную по объему и составу препарата ионообменную (QSFF, рис. 3, А, В), а затем распределительную (фенилсефароза) стадии. Тогда высаливание или бэтч-хроматография исходного препарата при малой эффективности еще и добавляет стадию обессоливания перед ионообменом. Соединить хроматографические колонки в батарею также невозможно, потому что распределительная хроматография тем эффективнее, чем меньше объем наносимой пробы, и разбавленный после ионообмена препарат приходится концентрировать (высаливанием, рис. 3, А, Б).

Нам удалось, по-видимому, добиться соосаждения мелких фрагментов мембран и органелл с осадком клеточных оболочек при 30%-ном насыщении сульфатом аммония и удаления критического количества небелковых примесей с супернатантом после высаливания (90 % насыщения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) целевого белка. Протеазу количественно сорбировали и элюировали с фенилсефарозы, проточные характеристики сорбента не нарушали. Полученный препарат концентрировали и эффективно доочищали на ионообменнике.

Разработан простой в воспроизведении экспресс-метод получения бактериальной протеазы ECP32 со степенью чистоты и уровнем активности, отвечающими высоким требованиям структурно-функциональных исследований актина. Все используемые сегодня в лабораториях России, Европы и США препараты фермента получены согласно данной разработке (Moraczewska et al., 2004; Wawro et al., 2005; Klenchin et al., 2006).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-48253 и 05-04-49604).

Список литературы

- Морозова А. В., Сквородкин И. Н., Хайтлина С. Ю., Малинин А. Ю. 2001. Бактериальная протеиназа ECP 32, специфически расщепляющая актин, и ее воздействие на цитоскелет *in vivo*. Биохимия. 66 (1) : 105—113.
- Скоупс Р. 1985. Методы очистки белков. М.: Мир, 358 с.
- Усманова А. М., Хайтлина С. Ю. 1989. Протеаза из штамма бактерий *E. coli* A2, специфически расщепляющая актин. Биохимия. 54 (8) : 1308—1314.
- Цаплина И. А. 1979. Синтез нейтральных протеаз микроорганизмов. В кн.: Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука. 197—243.
- Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F. (Eds.). 1998. Handbook of proteolytic enzymes. New York: Acad. Press. 476 p.
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W. 1990. Atomic model of the actin filament. Nature. 374 : 44—49.
- Izhaki R. F., Gill D. M. 1964. A microbiuret method for estimating proteins. Anal. Biochem. 9 : 401—407.
- Khaitlina S. Yu., Collins J. H., Kusnetsova I. M., Pershina V. P., Synakevich I. G., Turoverov K. K., Istamanova A. M. 1991. Physico-chemical properties of actin cleaved with bacterial protease from *Escherichia coli* A2 strain. FEBS Lett. 279 : 49—51.
- Khaitlina S. Yu., Hinssen H. 1997. Conformational changes in actin induced by its interaction with gelsolin. Biophys. J. 73 : 929—937.
- Khaitlina S. Yu., Moraczewska J., Strzelecka-Golaszewska H. 1993. The actin-actin interactions involving the N-terminal portion of the DNase I-binding loop are crucial for stabilization of the actin filament. Eur. J. Biochem. 218 : 911—920.

- Khaitlina S., Smirnova T., Usmanova A. 1988.* Limited proteolysis of actin by a specific bacterial protease. *FEBS Lett.* 228 : 172—174.
- Khaitlina S. Yu., Strzelecka-Golaszewska H. 2002.* Role of the DNase-I-binding loop in dynamic properties of actin filament. *Biophys. J.* 82 : 321—324.
- Klenchin V. A., Khaitlina S. Yu., Rayment I. 2006.* Crystal structure of polymerization-competent actin. *J. Mol. Biol.* 362 : 140—150.
- Laemmli U. K. 1970.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Matveyev V. V., Usmanova A. M., Morozova A. V., Khaitlina S. Yu. 1996.* Purification and characterization of the protease ECP-32 from *Escherichia coli* A2 strain. *Biochim. biophys. acta.* 1296 : 56—62.
- Moraczewska J., Gruszczynska-Biegala J., Redowicz M. J., Khaitlina S. Yu. 2004.* The DNase-I-binding loop of actin may play a role in the regulation of actin-myosin interaction by tropomyosin/troponin. *J. Biol. Chem.* 279 : 31 197—31 204.
- Mykles D. L., Haire M. F. 1991.* Sodium dodecyl sulfate and heat induce two distinct forms of lobster muscle multicatalytic protease: the heat-activated form degrades myofibrillar proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 288 : 543—551.
- Negulyaev Yu. A., Khaitlina S. Yu., Hinssen H., Shumilina E. V., Vedernikova E. A. 2000.* Sodium channel activity in leukemia cells is directly controlled by actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 275 : 40 933—40 937.
- Orlova A., Egelman E. H. 1995.* Structural dynamics of F-actin. I. Changes in the C terminus. *J. Mol. Biol.* 245 : 582—597.
- Paech C., Christianson T., Blasig S. 1993.* Enhanced zymograms of proteases. *Anal. Biochem.* 213 : 440—441.
- Panyim C., Chalkley R. 1969.* The heterogeneity of histones. I. Quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry.* 8 : 3972—3979.
- Schultz J. S., Gerhardt P. 1969.* Dialysis culture of microorganisms: design, theory and results. *Bacteriol. Rev.* 33 : 1—47.
- Spudich J. A., Watt S. 1991.* The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies on the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 266 : 4866—4871.
- Suzuki H., Terada T. 1988.* Removal of dodecyl sulfate from protein solutions. *Anal. Biochem.* 172 : 259—263.
- Towbin H., Staehelin Th., Gordon J. 1979.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76 : 4350—4354.
- Waehneltd T. V. 1975.* Sodium dodecyl sulfate in protein chemistry. *BioSystems.* 6 : 176—187.
- Walders-Harbeck B., Khaitlina S. Yu., Hinssen H., Jockusch B. M., Illenberger S. 2002.* The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerization through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* 529 : 275—280.
- Wawro B., Khaitlina S. Yu., Galinska-Rakoczy A., Strzelecka-Golaszewska H. 2005.* Role of actin DNase-I-binding loop in myosin subfragment 1-induced polymerization of G-actin: implications for the mechanism of polymerization. *Biophys. J.* 88 : 2883—2896.

Поступила 8 IX 2008

THE EXPRESS-METHOD OF OBTAINING PROTEASE ECP32, THE UNIQUE INSTRUMENT IN ACTIN INVESTIGATIONS

A. V. Morozova,¹ S. Yu. Khaitlina, A. Yu. Malinin

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: avmoro@gmail.com

The protease ECP32 is significant in investigations of actin, the basic protein of muscles and the cytoskeleton. The enzyme originates from the natural enterobacteria strain, which accumulates minor amounts of the protease intracellularly at the post-exponential growth phase. The limiting factor for biosynthesis is the amount of oxygen that has entered the medium. The highly effective method of two-phase cultivation with vigorous aeration at the exponential growth phase was recommended. Based upon the enzyme properties studied, there is a decreased potential for success when using either the affinity or one-stage purification methods. In order to overcome obstacles in the aforementioned methods, a simple method for ECP32 preparation and storage was developed, with purity and activity levels satisfying the requirements of actin structure and function investigations.

Key words: actin, ECP32 protease, limited proteolysis, post-logarithmic synthesis, bacterial intracellular enzymes, protein purification.