

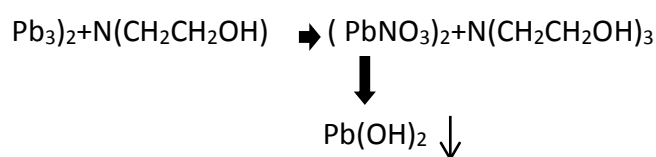
Метод электронно-микроскопического выявления гидролаз на дрожжевых экзоцеллюлярных компонентах

Дмитриев В. В., Звонарев А. Н., Русакова Т. Г.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН;
dmitriev@ibpm.pushchino.ru

Целью данной работы является подбор наиболее эффективного метода электронно-микроскопического выявления гидролаз на дрожжевых экзоцеллюлярных компонентах — структурах, наименее изученных в функциональном отношении.

В настоящее время основным подходом для обнаружения липаз и некоторых других гидролаз в электронной микроскопии является принцип Гомори, основанный на связывании продукта реакции с ионами солей свинца, в котором в качестве субстратов используются твины [1]. Однако использование твинов, являющихся поверхностно-активными веществами, для выявления ферментов на экзоцеллюлярных компонентах дрожжей связано с большими трудностями, так как это приводит к солубилизации и удалению белков и продуктов реакции в процессе цитохимического исследования (рис 2А). Оказалось, что всеми необходимыми свойствами субстрата электронно-цитохимического выявления гидролаз типа липазы обладает кремнийорганическое соединение 1-хлорметилсилатран (ХМС). Было выяснено, что триэаноламин (ТЭА), являющийся продуктом ферментативной реакции гидролиза ХМС, связывается с ионами нитрата свинца $Pb(NO_3)_2$, образуя нерастворимый в воде комплекс. В то же время показано, что ХМС в реакцию с $Pb(NO_3)_2$ не вступает.



Спектрофотометрически прослежено, что первоначально происходит образование комплекса ТЭА с нитратом свинца (максимум поглощения при 263 нм) (рис. 1), образующийся при этом комплекс неустойчив и распадается с образованием гидроокиси свинца, которая выпадает в электронно-плотный осадок, нерастворимый в воде и какодилатном буфере.

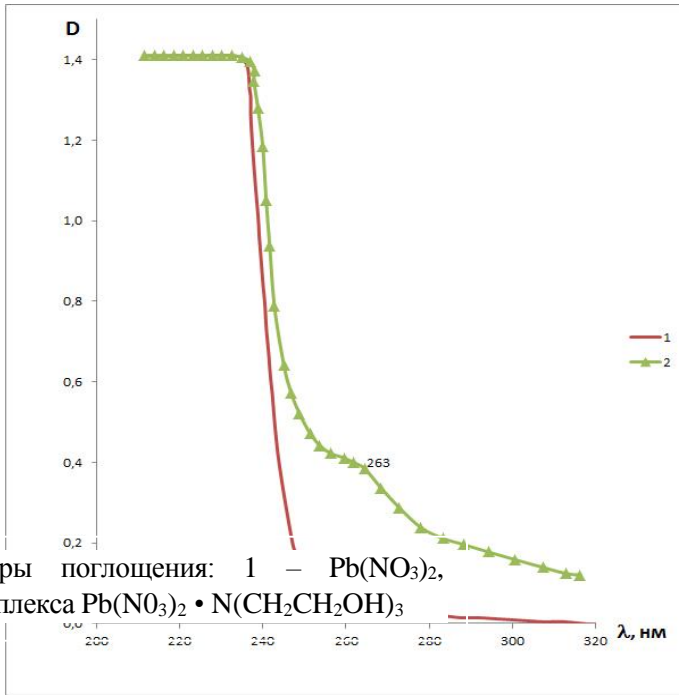


Рис 1. Спектры поглощения: 1 – $Pb(NO_3)_2$, 2- комплекса $Pb(NO_3)_2 \cdot N(CH_2CH_2OH)_3$

Спектры $Pb(NO_3)_2$ триэтаноламина (ТЭА) и продуктов их взаимодействия были получены на спектрофотометрах «Specord UV» (УФ-область) и «Specord IR» (ИК-область) фирмы «Carl Zeiss» (Германия). Строение нерастворимого продукта было доказано данными элементного анализа, проведенного на атомно-абсорбционном спектрометре ААС-1 (Германия) на свинец. Было обнаружено свинца 79,8%, а, согласно теоретическим расчетам, его содержится 85,9%, что вполне согласуется с предложенной структурой.

Такой подход позволил нам показать локализацию продукта реакции на гидролазу на экзоцеллюлярных компонентах дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* при

росте на ХМС в качестве источника азота (рис. 2Б). Для выяснения универсальности этого подхода были воспроизведены ранее описанные нами электронно-цитохимические реакции, в которых в качестве субстратов вместо твинов был использован ХМС. Была подтверждена локализация липазы на экзоцеллюлярных компонентах липолитически активных дрожжей *Candida lipolytica* (рис. 2В и гидролазы у дрожжей - деструкторов поверхностно-активного вещества лаурокс-9 *Cryptococcus humicolus* (рис. 2Г) и при этом по интенсивности отложения продукта реакция превосходила реакцию с твинами (рис. 2А).

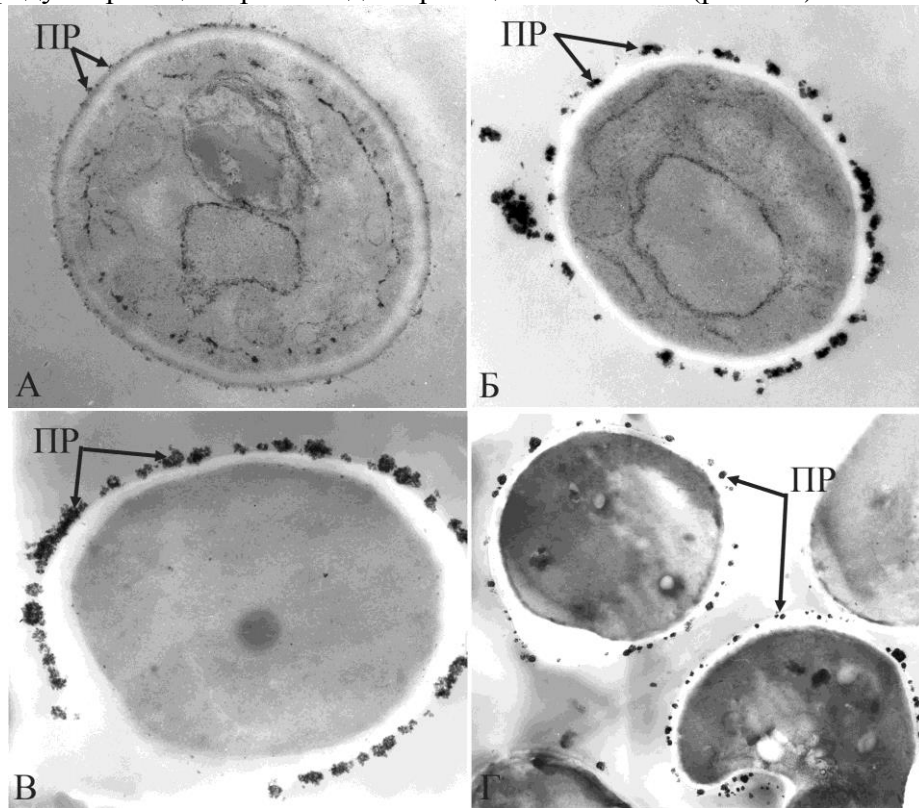


Рис 2. Электронно-микроскопическая цитохимическая реакция на гидролазы. Без дополнительного контрастирования. А. *Rhodotorula mucilaginosa*. Реакция на гидролазы ХМС. Субстрат - ПАВ; Б. *Candida lipolytica*. Реакция на липазу. Субстрат – ХМС; В. *Cryptococcus humicolus*.

Реакция на гидролазы ПАВ. Субстрат ХМС; Г. *Rhodotorula mucilaginosa*. Реакция на гидролазы ХМС. Субстрат - ХМС. ПР – продукт цитохимической реакции, образующий электронно-плотный комплекс при связывании с ионами свинца.

Таким образом, на основании изложенного, авторы рекомендуют использовать 1-хлорметилсилатран в качестве субстрата для электронномикроскопического выявления неспецифических гидролаз на экзоцеллюлярных структурах у микроорганизмов.

Литература

1. *Nagata T.* Electron Microscopy of Enzymes. V. Principles and Methods / Ed. M.A Nayat New York: Van Nostrand Reinold Co., 1974, P. 132.