



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 232 807** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **C 12 N 1/21, 15/52, 15/70**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2002131715/13, 26.11.2002
(24) Дата начала действия патента: 26.11.2002
(46) Дата публикации: 20.07.2004
(56) Ссылки: CN 1376789, 30.10.2002. US 5552313, 03.09.1996. US 5589386, 31.12.1996.
(98) Адрес для переписки:
119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1,
стр.3, Химический факультет МГУ им. М.В.
Ломоносова, научный отдел, Е.Н. Зыковой

(72) Изобретатель: Варфоломеев С.Д. (RU),
Ефременко Е.Н. (RU), Алиев Т.К.
(RU), Вотчицева Ю.А. (RU)

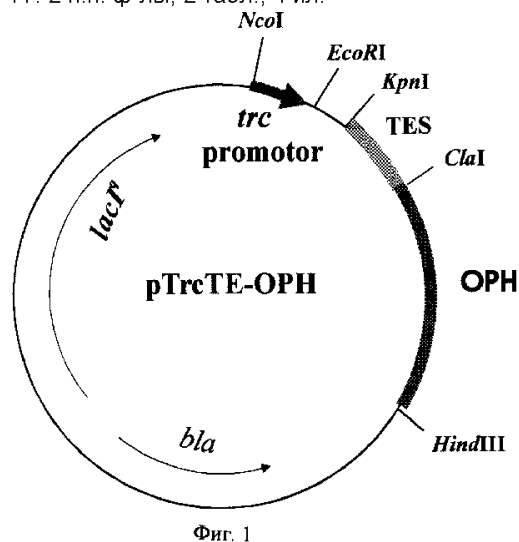
(73) Патентообладатель:
Химический факультет МГУ им. М.В.
Ломоносова (RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК РТРСТЕ-ОРН И ПРОДУЦЕНТ ФЕРМЕНТА ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии. Оно представляет собой сконструированную *in vitro* рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую ДНК процессированной формы фермента органофосфатгидролазы (ОРН), *trc*-промотор *Escherichia coli* и синтетический участок - усилитель трансляции, обуславливающие биосинтез фермента ОРН, а также штамм *Escherichia coli* - продуцент этого белка. Рекомбинантный фермент может быть использован для производства препаратов на основе ОРН, предназначенных для деградации фосфорорганических соединений, а также для их аналитического определения. Изобретение решает задачу создания генно-инженерной конструкции и штамма клеток, которые обеспечивают получение значительных количеств активной растворимой формы органофосфатгидролазы в цитоплазме клеток путем индуцибельного синтеза фермента. Поставленная задача решается путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК рТрсТЕ-ОРН, кодирующей индуцибельный синтез ОРН и штамма *Escherichia coli* DH5 α /рТрсТЕ-ОРН, обеспечивающего синтез этого белка с уровнем экспрессии,

позволяющим получать до 12 мг очищенного белка из 1 г влажной биомассы. Индуцибельный высокий уровень синтеза целевого полипептида обеспечивается тем, что предлагаемая плазмида рТрсТЕ-ОРН отличается от известной наличием *trc*-промотора *E.coli* и синтетического усилителя трансляции гена 10 бактериофага Т7. 2 н.п. ф-лы, 2 табл., 4 ил.



Фиг. 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 232 807** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 1/21, 15/52, 15/70**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002131715/13, 26.11.2002
 (24) Effective date for property rights: 26.11.2002
 (46) Date of publication: 20.07.2004
 (98) Mail address:
 119992, Moskva, GSP-2, Leninskie gory, 1,
 str.3, Khimicheskij fakul'tet MGU im. M.V.
 Lomonosova, nauchnyj otdel, E.N. Zykovo

(72) Inventor: Varfolomeev S.D. (RU),
 Efremenko E.N. (RU), Aliev T.K.
 (RU), Votchitseva Ju.A. (RU)
 (73) Proprietor:
 Khimicheskij fakul'tet MGU im. M.V.
 Lomonosova (RU)

(54) **RECOMBINANT PLASMID DNA PTRCTE-OPH AND PRODUCER OF ENZYME ORGANOPHOSPHATE HYDROLASE**

(57) Abstract:

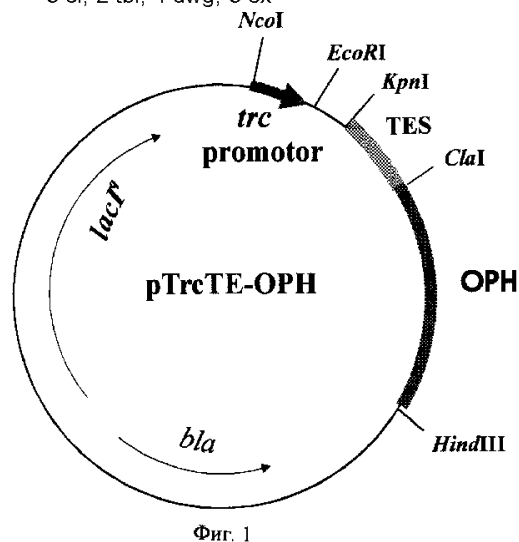
FIELD: biotechnology, genetic engineering, biochemistry.

SUBSTANCE: invention represents the constructed in vitro recombinant plasmid DNA comprising for the processed form of enzyme organophosphate hydrolase (OPH), Escherichia coli trc-promoter and synthetic site as an enhancer of translation providing biosynthesis of enzyme OPH, and the strain Escherichia coli as a producer of this protein also. Recombinant enzyme can be used for producing OPH-base preparations designated for decomposition of organophosphorus compounds and for their analytical determination also. Invention solves the problem for the development of genetic-engineering construction and strain of cells that provide the preparing significant amounts of active soluble form of organophosphate hydrolase in cell cytoplasm by inducible synthesis of enzyme. This problem is solved by construction of recombinant DNA pTrcTE-OPH encoding inducible synthesis of OPH and the strain of Escherichia coli DH5 α /pTrcTE-OPH providing synthesis of this protein with the expression level allowing to prepare up to 12 mg of purified protein from 1 g of wetted biomass. High inducible level of synthesis

of the end polypeptide is provided by the fact that the proposed plasmid pTrcTE-OPH differs from the known one by the presence of E. coli trc-promoter and synthetic enhancer of translation for bacteriophage T7 gene 10.

EFFECT: valuable biological properties of DNA.

3 cl, 2 tbl, 4 dwg, 3 ex



Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и представляет собой сконструированную *in vitro* рекомбинантную плазмидную ДНК, содержащую ДНК процессированной формы фермента органофосфатгидролазы, *trc*-промотор *Escherichia coli* и синтетический участок - усилитель трансляции, обуславливающие биосинтез фермента органофосфатгидролазы, а также штамм *Escherichia coli* - продуцент этого белка.

Органофосфатгидролаза (OPH) (арилдиалкилфосфатаза, параоксоназа, фосфотриэстераза, ЕС 3.1.8.1) - фермент, катализирующий гидролиз эфирной связи в триэфирах фосфорной кислоты - является металлзависимым ферментом и содержит по два иона Zn^{2+} или Co^{2+} на субъединицу. Фермент в разной степени способен катализировать гидролиз P-O, P-F и P-S связей в триэфирах фосфорной кислоты [Ефременко Е.Н., Сергеева В.С. Органофосфатгидролаза - фермент, катализирующий деградацию фосфорсодержащих отравляющих веществ и пестицидов // Известия АН. Сер. Хим., №10, с.1743-1749 (2001)]. Показано, что органофосфатгидролаза не содержит гликозидных остатков [Munnecke D.M. Enzymic detoxification of waste organophosphate pesticides // J. Agric. Food Chem., V.28, p.105-111 (1980)].

Биологическая роль фермента заключается в деградации фосфорорганических нейротоксинов, таких как параоксон, паратион, кумафос, малатион и т.д.

Рекомбинантная органофосфатгидролаза находит широкое применение в лабораторных исследованиях. На основе этого фермента изготавливаются различные биосенсоры, а также изучаются возможности оптимизации условий гидролиза фосфорорганических соединений [Mulchandani P., Chen W., Mulchandani A. Flow injection amperometric enzyme biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents // Environ. Sci. Technol., V.35, p.2562-2565 (2001); Simonian A.L., Efremenko E.N., Wild J.R. Discriminative detection of neurotoxins in multi-component samples // Anal. Chemica Acta, V.444, p.179-186 (2001)].

Ген OPH первоначально был выделен из обитающих в загрязненных пестицидами почвах бактериальных клеток *Pseudomonas diminuta* и *Flavobacterium sp.* [Munnecke D.M. Enzymic detoxification of waste organophosphate pesticides // J. Agric. Food Chem., V.28, p.105-111 (1980); Mulbry W.W., Karns J.S., Kearney P.C., Nelson J.O., McDaniel C.S., Wild J.R. Identification of a plasmid-borne parathion hydrolase gene from *Flavobacterium sp.* by southern hybridization with *opd* from *Pseudomonas diminuta* // Appl. Environ. Microbiol., V.51, p.926-930 (1986); Dave K.I., Miller L.L., Wild J.R. Characterization of organophosphorus hydrolases and the genetic manipulation of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // Chem. - Biol. Interact., V.87, p.55-68 (1993)].

Природные штаммы, обладающие органофосфатгидролазной активностью, не могут быть рассмотрены в качестве

продуцентов данного фермента ввиду крайне низких уровней его синтеза в клетках (0,0085 мг белка из 1 г клеток).

5 Была предпринята попытка создания продуцента OPH на основе культуры тканей личинок насекомых (клетки sf9, *Spodoptera frugiperda*), которые были инфицированы рекомбинантным бакуловирусом A5B, несущим ген OPH [Dumas D.P., Caldwell S.R., Wild J.R., Raushel E.M. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* // J. Biol. Chem., V.264, p.19659-19665 (1989)]. Для накопления фермента внутри клеток их культивирование проводили в течение 4 суток при конечном накоплении 5-6 г/л клеточной биомассы. 10 Последующее выделение OPH позволило получить авторам этого продуцента 2,7 мг белка из 8 г клеток, что означает получение 0,34 мг белка из 1 г клеток.

Низкий выход фермента, длительная процедура накопления биомассы, 20 многостадийность процесса очистки белкового препарата, включающая 4 стадии различных типов хроматографии, свидетельствуют об очевидной невозможности технологической реализации процесса получения OPH с использованием 25 указанного продуцента.

Известны попытки конструирования эффективных генно-инженерных продуцентов OPH на основе клеток микроорганизмов.

30 Ген OPH был клонирован из *Flavobacterium sp.* (ATTC 27551) в клетках *Streptomyces lividans*, фермент был очищен до гомогенного состояния. Авторы разрабатывали способы увеличения выхода внеклеточной OPH из рекомбинантных клеток *Streptomyces lividans*. Для этого 35 использовались богатые питательные среды, содержащие 85 г/л триптона и 60 г/л глюкозы, с подпиткой культуры во время ее ферментации (по 0,57 л раствора, содержащего 133 г/л глюкозы и 167 г/л триптона) [Payne G.F., Delacruz N., Copella S.J. Improved production of heterologous protein from *Streptomyces lividans* // Appl. Microbiol. Biotechnol., V.33, p.395-400 (1990)]. Для обеспечения эффективной 40 секреции OPH из клеток *Streptomyces lividans* была создана генетическая конструкция, в которой нативную сигнальную последовательность β -галактозидазы из *Streptomyces* заменили на сигнальную последовательность из *Flavobacterium*. Это привело к увеличению содержания OPH во 45 внеклеточной культуральной жидкости до 25 мг/л при наличии в среде 10 г/л клеток, что означает, что выход фермента составлял 2,5 мг внеклеточного белка из 1 г клеток.

При этом секретируемый фермент 50 составлял 2% от всех секретируемых в среду клеточных белков, что приводило к серьезным технологическим трудностям и увеличению числа стадий при его выделении. Дополнительные сложности в процесс очистки внеклеточного фермента вносила 55 богатая по своему белковому составу питательная среда. Секретируемый белок содержал дополнительную сигнальную последовательность, удаление которой требовало проведения дополнительной 60 стадии обработки белка.

Для создания продуцента рекомбинантной OPH в ряде работ были использованы клетки

E.coli.

Для создания генно-инженерного штамма, обладающего ОРН активностью, клетки E.coli трансформировали плазмидой pJK33, содержащей ген ОРН [Omburo G.A., Kuo J.M., Mullins L.S., Raushel F.M. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase // J. Biol. Chem., V.267, p.13278-13283 (1992)]. Исползованная плазида обеспечивала внутриклеточный синтез модифицированного белка ОРН, в котором первые 33 были заменены на 5 следующих аминокислот: Met-Ile-Thr-Asn-Ser-. Синтезируемый фермент накапливался в растворимом виде в клетках, при этом его выход после очистки и выделения в гомогенном состоянии составил 298 мг из 160 г клеток, что означает, что удельный выход был 1,87 мг белка из 1 г клеток.

Для накопления необходимого количества биомассы требовалось длительное культивирование клеток (38 часов), а для индукции синтеза фермента необходимо было применение высокой концентрации дорогостоящего индуктора - изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) - 1 мМ. Последние два фактора определяли экономическую неэффективность этого продуцента.

Наиболее близким к заявляемому техническому решению (прототипом) является генно-инженерная конструкция и штамм для получения органофосфатгидролазы, предложенные авторами изобретения (United States Patent No.5589386; кл. С 12 S 13/00; С 12 N 15/00; С 12 N 01/20; С 12 N 01/14, 1996). Для реализации способа гидролиза фосфорорганических соединений авторами прототипа предлагаются сконструированные экспрессионные плазмиды с термоиндукцибельным промотором для получения ОРН и ее метионинового аналога, синтез которого кодируется ДНК последовательностью ОРН с делецией 29 аминокислот с N-конца последовательности, которыми трансформируют клетки E.coli, Bacillus и Streptomyces. Предлагаемые в прототипе плазмиды pCMS75 (ATCC №67778) и pCMS77 (ATCC №67779), трансформированные в клетки E.coli Fm5, позволяют получать наибольшее количество ОРН, причем в случае плазмиды pCMS77 фермент синтезируется в виде телец включения. Суммарная активность клеточного экстракта E.coli (pCMS75) в 10 раз выше, чем активность клеточного экстракта E.coli (pCMS77). В данном прототипе предлагается метод гидролиза ингибиторов холинэстеразы, состоящих из фосфорорганических соединений, заключающийся в том, что проводится обработка этих ингибиторов выделенной и очищенной зрелой формой ОРН и ее аналогом, не содержащим иницирующего аминокислотного остатка метионина. Удельная активность ОРН, выраженная в ед/мг белка, увеличивается в случае продуцирования ее микроорганизмами при их культивировании в среде, содержащей более чем 0,15 мМ, но не больше 3,0 мМ любого из металлов, выбранного из ряда: кобальт, цинк или смеси кобальта с цинком. Заявленный в прототипе метод позволяет гидролизовать следующие ингибиторы холинэстеразы: диизопропилфторфосфат,

изопропилметилфторфосфат и пинаколилметилфторфосфат.

В тексте прототипа не указан выход фермента из 1 г клеток, но приведена его максимальная удельная активность, которая составляет 1000 ед/мг белка.

Недостатками конструкции pCMS77 является преимущественное накопление фермента в неактивном нерастворимом состоянии в составе телец включения, а также технологические сложности, связанные с использованием термоиндукцибельного промотора и требующие изменения температурного режима ведения процесса в ходе культивирования.

Предлагаемое изобретение решает задачу создания генно-инженерной конструкции и штамма клеток, которые обеспечивают получение значительных количеств активной растворимой формы органофосфатгидролазы в цитоплазме клеток путем индукцибельного синтеза фермента с помощью индуктора ИПТГ.

Поставленная задача решается путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pTrcTE-ОРН, кодирующей индукцибельный синтез фермента органофосфатгидролазы, и штамма Escherichia coli DH5 α /pTrcTE-ОРН, обеспечивающего синтез этого белка с уровнем экспрессии, позволяющим получать не менее 12 мг очищенного белка из 1 г влажной биомассы.

Индукцибельный высокий уровень синтеза целевого полипептида обеспечивается тем, что предлагаемая плазида pTrcTE-ОРН отличается от известной наличием trc-промотора E.coli и синтетического усилителя трансляции гена 10 бактериофага Т7.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pTrcTE-ОРН, кодирующая фермент органофосфатгидролазу, характеризуется следующими признаками:

имеет молекулярную массу 3,46 Md (5,243 т.п.о.);

кодирует аминокислотную последовательность фермента органофосфатгидролазы;

состоит из Cla I/Hind III - фрагмента ДНК плазмиды pTrcTE-Lep (Патент RU 2185438 С2, кл. С 12 N 15/12, 1/21, 2002) длиной 4,682 т.п.о., содержащего trc-промотор E.coli, синтетический усилитель трансляции TREN гена 10 бактериофага Т7, ген bla β -лактамазы, определяющий

устойчивость трансформированных плазмидой pTrcTE-ОРН клеток к ампициллину, и участок ori инициации репликации; а также из ДНК фермента органофосфатгидролазы длиной 1,011 т.п.о., фланкированного сайтами рестрикции Cla I и Hind III;

содержит: trc-промотор E.coli, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами, имеющими следующие координаты: Nco I - 265, Eco M - 270, Kpn I - 286, Xba I - 340, Cla I - 377, Hind III - 1389.

Особенностью предложенной плазмидной конструкции является наличие trc-промотора E.coli, контролирующего синтез ДНК фермента ОРН, а для усиления трансляции используется синтетический усилитель трансляции, что в совокупности обеспечивает индукцибельный синтез целевого белка с

надежной регуляцией и высоким выходом, достигаемым при малых концентрациях индуктора.

Для получения штамма-продуцента фермента органофосфатгидролазы трансформируют компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 α рекомбинантной плазмидой pTrcTE-ORN.

Полученный штамм *Escherichia coli* DH5 α /pTrcTE-ORN характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки. Клетки мелкие палочковидной формы, грамотрицательные, неспороносные, 1 $\times$ 3-5 мкм, подвижные.

Культуральные признаки. При росте на агаризованной среде LB (Состав среды LB: триптон - 10,0 г/л; дрожжевой экстракт - 5,0 г/л; NaCl - 5,0 г/л; и 1,7% бактоагара) колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие, серые, край ровный, диаметр колоний 1-3 мм; консистенция пастообразная. Рост в жидкой среде LB (триптон - 10,0 г/л; дрожжевой экстракт - 5,0 г/л; NaCl - 5,0 г/л) характеризуется ровным помутнением с образованием легкого осадка.

Физико-биохимические признаки. Клетки растут при температуре 4-42 $^{\circ}$ C при оптимуме pH 6,8-7,2. В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной форме, так и органические соединения в виде пептона, триптона, дрожжевого экстракта, аминокислот. В качестве источника углерода используют аминокислоты, глицерин, углеводы.

Устойчивость к антибиотикам. Клетки проявляют устойчивость к ампициллину (до 200 мкг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β -лактамазы.

Штамм *E.coli* DH5 α /pTrcTE-ORN обеспечивает индуцибельный синтез фермента органофосфатгидролазы с высоким содержанием растворимой формы фермента в цитоплазме, что позволяет получать не менее 12 мг очищенного белка из 1 г влажной биомассы. В данном штамме достигается более высокий выход растворимой формы целевого белка при использовании небольших количеств индуктора. При этом в процессе индукции не требуется изменение температурного режима культивирования клеток. Совокупность перечисленных свойств штамма *E.coli* DH5 α /pTrcTE-ORN делает получение рекомбинантной органофосфатгидролазы высокотехнологичным процессом.

Полученный штамм депонирован в коллекции культур микроорганизмов Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина - Ю.А.Овчинникова Российской Академии Наук под номером 25.

На фиг.1 представлена физическая карта рекомбинантной плазмиды pTrcTE-ORN; на фиг.2 - нуклеотидная последовательность ДНК фермента органофосфатгидролазы с прилегающими регуляторными элементами: trc - промотор (1-30 п.о.), усилитель трансляции TREN (93-186 п.о.), ген органофосфатгидролазы (190-1201 п.о.); иницирующий и терминирующий кодоны подчеркнуты, в рамки взяты сайты рестриктаз: Eco RI, Cla I и Hind III; на фиг.3 - аминокислотная последовательность фермента органофосфатгидролазы, кодируемого рекомбинантной плазмидой

pTrcTE- ORN; на фиг.4 - электрофореграмма лизатов клеток штамма-реципиента *E.coli* DH5 α (дорожка 1), штамма-продуцента *E.coli* DH5 α /pTrcTE-ORN (дорожка 2), белковых стандартов молекулярного веса (дорожка 3) в 10%-ном полиакриламидном геле (стрелкой указан фермент органофосфатгидролаза).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК pTrcTE-ORN.

Культуру *Pseudomonas diminuta* VKM В-1297 объемом 100 мл центрифугируют 15 мин 3000 об/мин и осадок ресуспендируют в 10 мл ТЕ буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ЭДТА). После этого добавляют 1 мл раствора лизоцима (10 мг/мл). Суспензию замораживают при -70 $^{\circ}$ C, инкубируют на водяной бане при 20 $^{\circ}$ C до полного оттаивания клеток и выдерживают во льду 1 ч для разрушения клеточных стенок бактерий. Добавляют 2 мл 0,5% раствора SDS, содержащего 0,4 М ЭДТА и 2 мл раствора протеиназы К (1 мг/мл). Инкубируют 1 ч при 60 $^{\circ}$ C, проводят фенольную экстракцию, после чего осаждают ДНК этиловым спиртом. Осадок растворяют примерно в 1 мл ТЕ буфера (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА).

Добавляют РНКазу А до концентрации 50 мкг/мл, инкубируют 2 ч при 4 $^{\circ}$ C, осторожно перемешивая. Повторяют фенольную экстракцию, переосаждают ДНК этанолом, растворяют осадок в 1 мл ТЕ буфера.

Полученную ДНК из *Pseudomonas diminuta* VKM В-1297 используют для амплификации методом полимеразной цепной реакции гена органофосфатгидролазы. Для этого к 5 мкл раствора ДНК (10 нг/мкл) прибавляют по 100 пмоль праймера FOR-Cla с нуклеотидной последовательностью CTT CCA TCG ATA TGA GAG GAT CGC ATC и 100 пмоль праймера REV-Hind с нуклеотидной последовательностью CCA CAA AGC TTC ATG ACG CCC GCA AGG TC, 8 мкл смеси, содержащей 2,5 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10 мкл 10-кратного буфера (100 мМ трис-HCl, pH 8,8, 500 мМ KCl, 15 мМ MgCl₂), 2 ед. Taq ДНК-полимеразы и воду до 100 мкл. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводят в следующем режиме: денатурация - 1 мин, 94 $^{\circ}$ C; отжиг - 1 мин., 55 $^{\circ}$ C; достройка - 1 мин 30 с, 72 $^{\circ}$ C; количество циклов - 35. Праймер FOR-Cla представляет собой 27-звенный олигонуклеотид, в состав которого входят сайт узнавания рестриктазы Cla I, стартовый ATG-кодон и 13 нуклеотидов 5'-области ДНК органофосфатгидролазы. Праймер REV-Hind представляет собой 29-звенный олигонуклеотид, содержащий сайт узнавания рестриктазы Hind III, а также последовательность, комплементарную стоп-кодону гена органофосфатгидролазы и прилегающим 15 нуклеотидам кодирующей области.

Реакционную смесь после прохождения ПЦР экстрагируют равным объемом хлороформа, после чего осаждают этиловым спиртом. После центрифугирования и высушивания ДНК растворяют в 20 мкл 10 мМ триса-HCl, 1мМ ЭДТА (pH 8,0).

Амплифицированную ДНК (5 мкл) обрабатывают 10 ед. рестриктазы Cla I и 15

ед. рестриктазы Hind III (Fermentas, Литва) в течение 1 ч при 37°C в 20 мкл буферного раствора, содержащего 33 мМ трис-ацетата (pH 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, и из полученного гидролизата выделяют фрагменты ДНК органотрифосфатгидролазы длиной 1,011 т.п.о. (Cla I - Hind III фрагмент) переносом их из 1,5%-ного агарозного геля на DEAE-мембрану NA-45.

Плазмидную ДНК pTrcTE-Lep длиной (5 мкг) размером 4,682 т.п.о., содержащей trc-промотор и усилитель транскрипции TREN бактериофага T7, обрабатывают 10 ед. рестриктазы Cla I и 15 ед. рестриктазы Hind III в течение 2 ч при 37°C в 30 мкл буферного раствора, содержащего 33 мМ трис-ацетата (pH 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, и из полученного гидролизата выделяют векторную часть плазмидной ДНК длиной 4,232 т.п.о. переносом ее из 0,8%-ного агарозного геля на DEAE-мембрану NA-45.

Clal I - Hind III фрагмент ДНК фермента ОРН длиной 1,011 т.п.о. (0,02 мкг) и 0,05 мкг векторной части плазмидной ДНК рTrcTE-Lер длиной 4,232 т.п.о. соединяют при помощи лигазной реакции в течение 3 ч при 10°C в 15 мкл раствора, содержащего 40 мМ трис-HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитола, 0,5 мМ аденозинтрифосфата и 2 ед. Вейса Т4 ДНК-лигазы.

Реакционную смесь (5 мкл) используют для трансформации 200 мкл компетентных клеток XL-1 Blue. 1/10 клеток, использованных для трансформации, высевают на LB-агар, содержащий 75 мкг/мл ампициллина. Из выросших клонов выделяют плазмидную ДНК, содержащую фрагмент ДНК фермента ORN.

Окончательно структуру рекомбинантной ДНК рTrcTE-OPH подтверждают определением нуклеотидной последовательности в области встроенной ДНК фермента органофосфатгидролазы.

Пример 2. Получение штамма-продуцента фермента органофосфатгидролазы.

Рекombинантной плазмидной ДНК рTrcTE-OPH трансформируют компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 α [F⁻ (Φ 80d Δ (lacZ)M15) recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17($\bar{n}_{km}^+$) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA $\bar{argF}$)] и получают штамм-продуцент фермента орнанофосфатгидролазы.

Пример 3. Выделение, очистка и исследование свойств рекомбинантного фермента органофосфатгидролазы.

Для накопления биомассы клеток используют жидкую питательную среду ТУУЕ (триптон - 12,0 г/л, дрожжевой экстракт - 24,0 г/л, глицерин - 4,0 мл/л, K_2HPO_4 - 6,95 г/л, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 12,54 г/л, pH среды 7,0), в которую добавляют $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ до концентрации 237 мг/л. Перед посевом клеток в среду добавляют раствор ампициллина (концентрация в среде 100 мкг/мл).

Для получения инокулята производят посев культуры петлей с чашек Петри в 20 мл среды LB. 12-часовой инокулят вносят в колбу, содержащую 100 мл полноценной питательной среды, культуру выращивают при 30°C и постоянном перемешивании (200

об/мин) до тех пор, пока оптическая плотность при длине волны 540 нм не достигнет 0,6, после чего добавляют ИПТГ до концентрации 0,2 мМ. Клетки культивируют в течение 21 ч. Полученную биомассу отделяют центрифугированием (5000 г, 15 мин), взвешивают и ресуспендируют в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,0 (массовое соотношение биомасса:буфер - 1:5). Клетки разрушают обработкой ультразвуком (частота 44 кГц) 4 раза по 45 с, между обработками биомассу выдерживают в течение 1 мин во льду. Осадок отделяют центрифугированием (15000 г, 30 мин). К супернатанту добавляют 10% раствор сульфата стрептомицина в 25 мМ TRIS буфере, pH 7,0 (соотношение объемов супернатанта и раствора сульфата стрептомицина - 1:9), выпавший осадок отделяют центрифугированием (15000 г, 30 мин). К супернатанту добавляют сульфат аммония до его конечной концентрации 45% (258 мг/мл раствора белка), затем образовавшийся осадок отделяют центрифугированием (15000 г, 40 мин). Ресуспендируют осадок, содержащий OPH, в 40 мл фосфатного буфера (10 мМ, pH 7,0). Полученный раствор подвергают диализу против 2 л 10 мМ фосфатного буфера, pH 6,9. Раствор, содержащий OPH, наносят на 100 мл колонку с SP-сефарозой (Pharmacia) (скорость нанесения 0,5 мл/мин), уравновешенной тем же фосфатным буфером (pH 6,9), затем через колонку пропускают градиент раствора KCl (от 0 до 0,5 М в фосфатном буфере, pH 6,9).

Полученные фракции, содержащие ОРН, объединяют и подвергают диализу против 50 мМ трис-НСl буфера, (рН 8,3), затем наносят на 10 мл колонку с DEAE (Pharmacia), предварительно уравновешенную тем же буфером.

В процессе очистки из 1 г влажной биомассы получают 12 мг высокоочищенного фермента со средней удельной активностью 5820 ед/мг белка. Выход фермента составляет 69% от исходного количества ОРН, синтезированного клетками (табл. 1).

За скоростью исследуемой реакции следят спектрофотометрически на спектрофотометрах, снабженных термостатируемыми кюветными отделениями, по накоплению продукта 4-нитрофенолят аниона ($\epsilon=17000 \text{ моль}^{-1}\text{см}^{-1}$, pH 9,0, $\lambda=405 \text{ нм}$). Для определения каталитической активности органофосфатгидролазы в водных растворах используют 0,05 М CHES буфер (pH 9,0). В качестве субстрата используют 1 мМ водные растворы параоксона, паратиона и метил-паратиона.

Каталитическую реакцию инициируют внесением в кювету с буфером и субстратом раствора органотрифосфатгидролазы в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,0). Концентрация фермента в кювете составляет 10^{-10} - 10^{-9} М.

За единицу ферментативной активности принимают такое количество фермента, которое необходимо для того, чтобы гидролизовать 1 мМ субстрата за 1 мин при pH 9,0 и 20°C.

Расчет скоростей ферментативной реакции проводят по начальным линейным участкам кинетических кривых ($V_0 = t g \alpha$). Максимальную скорость ферментативной реакции (V_m) и константу Михаэлиса (K_m) определяют с использованием двойных

Таблица 1.
Баланс процедуры очистки и выделения органофосфатгидролазы

из 1 г влажной биомассы.

Этап очистки	Суммарный белок мг	Суммарная активность ед	Удельная активность ед/мг	Очистка раз	Выход %
Обработка клеток ультразвуком	341	101217	297	1	100
Стрептомицин сульфат	85,2	86034	1010	4	85
Сульфат аммония	40	78949	1974	8,5	78
Колонка SP-sepharose	19,3	73888	3828	17,7	73
DEAE-колонка	12	69840	5820	28,4	69

Кинетические характеристики рекомбинантной органофосфатгидролазы приведены в табл.2. pH-оптимум действия фермента составляет 9,0.

Таблица 2
Каталитические характеристики рекомбинантной ОРН.

Субстрат	K_{cat} / c^{-1}	K_m / mM	$K_{cat}/K_m / M^{-1}c^{-1}$
Параоксон	3100 ± 200	$0,06 \pm 0,005$	$5,5 \times 10^7$
Паратион	620 ± 30	$0,24 \pm 0,01$	$2,6 \times 10^6$
Метил-паратион	75 ± 5	$0,84 \pm 0,03$	$1,9 \times 10^5$

Таким образом, заявляемое техническое решение представляет собой плазмиду уникальной конструкции для микробного синтеза ОРН и штамм *E.coli*, обеспечивающий экспрессию данной плазмиды, позволяющий получить полипептид со свойствами, идентичными свойствам природной ОРН, и обеспечивающий супервысокий выход растворимого высокоактивного фермента (не менее 12 мг из 1 г влажной биомассы) в течение довольно короткого периода времени (21 ч). Биосинтез полипептида индуцируется добавлением в среду невысоких концентраций ИПТГ (0,2 мМ), при этом не требуется изменения температурных условий

культивирования клеток. Предлагаемое решение позволяет получать ОРН в виде растворимого белка с высокой активностью и в таком количестве, которые более чем в 5 раз превосходят все известные аналоги и решение, заявленное в прототипе. Все это позволяет значительно повысить технологичность и экономичность процесса получения высокоактивного рекомбинантного фермента органофосфатгидролазы.

Рекомбинантный фермент может быть использован для приготовления наборов для аналитического определения фосфорорганических соединений, а также для производства препаратов на основе ОРН, предназначенных для деградации фосфорорганических соединений.

Формула изобретения:

1. Рекомбинантная плазмидная ДНК рTrcTE-ОРН, кодирующая полипептид со свойствами органофосфатгидролазы с молекулярной массой 3,46 Md (5,243 т.п.о.), включающая *Cla* I/*Hind* III-фрагмент ДНК плазмиды рTrcTEGF длиной 4,232 т.п.о., *trc* - промотор *E.coli*, синтетический усилитель трансляции TREN гена 10 бактериофага T7, ген *bla* β -лактамазы, определяющий устойчивость трансформированных плазмидой рTrcTE-ОРН клеток к ампициллину, участок *ori* инициации репликации, ДНК длиной 1,011 т.п.о., кодирующую аминокислотную последовательность зрелой формы органофосфатгидролазы, представленную на фиг.3, фланкированную сайтами рестрикции *Cla* I и *Hind* III, и содержащая уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: Neo I - 265, Eco RI - 270, Kpn I - 286, Xba I - 340, *Cla* I - 377, *Hind* III-1389.

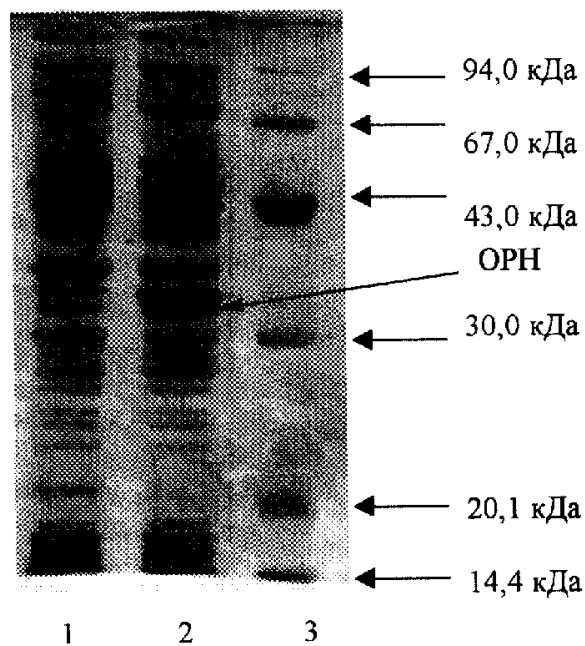
2. Штамм бактерии *Escherichia coli* DH5 α /рTrcTE-ОРН №25 (Центральная коллекция микроорганизмов Института биорганической химии им. М.М.Шемякина - Ю.А.Овчинникова РАН) - продуцент полипептида со свойствами органофосфатгидролазы.

1 TTGACAATTA ATCATCCGGC TCGTATAATG TGTGGAATTG TGAGCGGATA
 51 ACAATTTTAC ACAGGAAACA GACCATGGAA TTCGAGCTCG GTACCGCATG
 101 CTTGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTTCCTCT
 151 AGAAAATAAT TTTGTTTAAAC TTTAAGAAGG AGAATCGATA TGTCGATCGG
 201 CACAGGCGAT CGGATCAATA CCGTGCGCGG TCCTATCACA ATCTCTGAAG
 251 CGGGTTTAC ACTGACTCAC GAGCACATCT GCGGCAGCTC GGCAGGATTC
 301 TTGCGTGCTT GGCCAGAGTT CTTGCGTAGC CGCAAAGCTC TAGCGGAAAA
 351 GGCTGTGAGA GGATTGCGCC GCGCCAGAGC GGCTGGCGTG CGAACGATTG
 401 TCGATGTGTC GACTTTCGAT ATCGGTCGCG ACGTCAGTTT ATTGGCCGAG
 451 GTTTCGCGGG CTGCCGACGT TCATATCGTG GCGGCGACCG GCTTGTGGTT
 501 CGACCCGCCA CTTTCGATGC GATTGAGGAG TGTAGAGGAA CTCACACAGT
 551 TCTTCCTGCG TGAGATTCAA TATGGCATCG AAGACACCGG AATTAGGGCG
 601 GGCATTATCA AGGTCGCGAC CACAGGCAAG GCGACCCCCT TTCAGGAGTT
 651 AGTGTTAAAG GCGGCCGCCC GGGCCAGCTT GGCCACCGGT GTTCCGGTAA
 701 CCACTCACAC GGCAGCAAGT CAGCGCGATG GTGAGCAGCA GGCCGCCATT
 751 TTTGAGTCCG AAGGCTTGAG CCCCTCACGG GTTTGTATTG GTCACAGCGA
 801 TGATACTGAC GATTTGAGCT ATCTCACCGC CCTCGCTGCG CGCGGATACC
 851 TCATCGGTCT AGACCACATC CCGCACAGTG CGATTGGTCT AGAAGATAAT
 901 GCGAGTGCAT CAGCCCTCCT GGGCATCCGT TCGTGGCAAA CACGGGCTCT
 951 CTTGATCAAG GCGCTCATCG ACCAAGGCTA CATGAAACAA ATCCTCGTTT
 1001 CGAATGACTG GCTGTTTCGGG TTTTCGAGCT ATGTCACCAA CATCATGGAC
 1051 GTGATGGATC GCGTGAACCC CGACGGGATG GCCTTCATTC CACTGAGAGT
 1101 GATCCCATTC CTACGAGAGA AGGGCGTCCC ACAGGAAACG CTGGCAGGCA
 1151 TCACTGTGAC TAACCCGGCG CGGTTCTTGT CACCGACCTT GCGGGCGTCA
 1201 TGAAGCTT

Фиг. 2

MSIGTGDRINTVRGPITISEAGFTLTHEHICGSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVR
 GLRRARAAGVRTIVDVSTFDIGRDVSLLAEVSRADVHIVAATGLWFDPPPLSMRL
 RSVEELTQFFLREIQYGIEDTGIRAGIIKVATTGKATPFQELVLKAAARASLATGVP
 VTTHTAASQRDGEQQAIFESEGLSPSRVCIGHSDDTDDLSYLTALAARGYLIGLD
 HIPHSAIGLEDNASASALLGIRSWQTRALLIKALIDQGYMKQILVSNDWLFQFSSY
 VTNIMDVMDRVNPDGMAFIPLRVIPFLREKGVQPQETLAGITVTNPARFLSPTLRAS

Фиг. 3



Фиг. 4