

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2077577** (13) **C1**
 (51) МПК⁶ **C12N1/20, C12N9/16**
C12N9/16, C12R1:01

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - может прекратить свое действие
 Пошлина: учтена за 20 год с 01.10.2013 по 30.09.2014

(21), (22) Заявка: **94036816/13, 30.09.1994**

(45) Опубликовано: **20.04.1997**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: 1. Kobori H., Taga N. 1980, **Extracellular Alkaline Phosphatase from marine bacteria : Purification and properties of extracellular phosphatase from a marine Pseudomonas sp. Can. J. Microbiol. 26:833-838.** 2. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Жигалина И.И. и др. **Высокоактивная щелочная фосфатаза из морской бактерии. - 1991, ДАН СССР. Т.320, N 2, с.485 - 487.** 3. Kobori H., Sullivan C.W., Shizuya H. 1984. **Heat-labile, alkaline phosphatase from Antarctic bacteria : Rapid 5' end-labeling of nucleic acids. Proc. Natl. Acad. sci. USA 81(21):6691-6695.**

(71) Заявитель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Автор(ы):

**Иванова Е.П.,
 Плисова Е.Ю.,
 Балабанова Л.А.,
 Федосов Ю.В.,
 Михайлов В.В.,
 Рассказов В.А.,
 Еляков Г.Б.**

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(54) ШТАММ БАКТЕРИИ DELEUYA MARINA - ПРОДУЦЕНТ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству ферментов, и может быть использовано для получения высокоактивной щелочной фосфатазы, применяемой в медицине, генной инженерии, молекулярной биологии.

Штамм бактерии *Deleuya marina* ВКМ В-2021 Д выделен из целомической жидкости дальневосточного моллюска *Strebomytilus grayanus*. Штамм обладает высокой исходной удельной активностью щелочной фосфатазы (40 - 45 ед/мг белка). Способ получения щелочной фосфатазы предусматривает выращивание штамма-продуцента на питательной среде с получением бактериальной биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости с последующим выделением целевого продукта водной экстракцией микробных клеток и трехстадийную хроматографическую очистку сырого ферментного препарата методами анионообменной, гидрофобной хроматографии и гель-фильтрацией. Удельная активность очищенной щелочной фосфатазы 14000 - 15000 ед/мг белка. 2 с.п. ф-лы, 2 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству ферментов, и может быть использовано для получения высокоактивной щелочной фосфатазы, применяемой в медицине, генной инженерии, молекулярной биологии.

Морские микроорганизмы являются перспективными источниками новых щелочных фосфатаз. В литературе имеются отдельные сведения о способности морских микроорганизмов продуцировать щелочные фосфатазы. Описаны несколько щелочных фосфатаз, выделенных из бактериальных штаммов морского происхождения. Показано, что эти ферменты отличаются от уже известных щелочных фосфатаз по некоторым физико-химическим свойствам. Так, из морской бактерии *Pseudomonas* sp. выделена внеклеточная щелочная фосфатаза, на активность которой влияют повышение давления, а также присутствие основных ионов, содержащихся в морской воде. Фермент имеет удельную активность 192 ед/мг белка [1] Из антарктической морской бактерии НК-47 выделена термолabile щелочная фосфатаза, которую используют для отщепления концевых 5'-фосфатных групп в молекулах нуклеиновых кислот, а после окончания реакции легко инактивируют прогреванием при 60°C. Удельная активность фермента 906 ед/мг белка [3]

В последние годы найдены штаммы симбионтных морских бактерий, преимущественно двусторчатых моллюсков (*Stenomytilus grayanus*), отличающиеся способностью синтезировать высокоактивные щелочные фосфатазы. Известен штамм морской бактерии, первоначально идентифицированный как *Acinetobacter* sp. позднее реклассифицированный как *Alteromonas macleodii* KMM 162 (ВКПМ В-3905, 40 МС), продуцирующий щелочную фосфатазу с высокой удельной активностью (6000 6700 ед/мг белка).

Щелочная фосфатаза штамма KMM 162 имеет молекулярную массу 90 кДа, проявляет максимальную активность при pH 9,5 9,8 в присутствии 1 mM MgCl₂, ингибируется ЭДТА. Фермент термостабилен, но в присутствии 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола полностью инактивируется при 55 - 60°C, что позволяет использовать его при мечении нуклеиновых кислот и выводить из реакционной смеси тепловой обработкой [2] Несмотря на высокую удельную активность, данная щелочная фосфатаза не была использована в иммуноферментном анализе для получения конъюгатов, так как фермент неустойчив к химическим модификациям и теряет свою активность при соответствующих обработках и хранении.

Задача изобретения выявление нового штамма, продуцирующего щелочную фосфатазу с более высокой, по сравнению с аналогами, удельной активностью.

Поставленная задача решена тем, что из целомической жидкости дальневосточного двусторчатого моллюска *Stenomytilus grayanus* выделен штамм бактерии *Deleya marina*, отобранный по признаку высокой исходной удельной фосфатазной активности.

Штамму бактерии *Deleya marina* авторами присвоен номер KMM 296 (4 МС 37), он депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ В-2021 Д.

Штамм выделен методом прямого посева на агаризованную среду следующего состава (г/л): пептон 5 г, дрожжевой экстракт 2,5 г, глюкоза 1 г, MgSO₄ 0,5 г, K₂HPO₄ 0,2 г; морская вода 750 мл, дистиллированная вода 250 мл, pH 7,5.

Культуру хранят в пробирках под слоем минерального масла на полужидкой среде приведенного выше состава, при температуре 10°C.

Характеристика штамма.

Культурально-морфологические признаки:

а) бактерии образуют круглые с ровными краями, выпуклые колонии до 5 мм в диаметре, поверхность колоний гладкая, консистенция слизистая. Пигмент не накапливается;

б) штамм KMM 296 (4 МС 37) представляет собой небольшие грамотрицательные палочки, подвижные с помощью жгутиков. У бактерии формируется 1 2 полярных жгутика и 1 2 латеральных. Хемоорганотрофы с окислительным типом метаболизма. Оксидазо-отрицательные, каталазо-положительные, без NaCl в среде не растут, пигмента не накапливают. Люминесценция и флюоресценция отсутствуют. Растут при 4°C, при 41°C рост отсутствует.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм KMM 296 (4 МС 37) желатин, крахмал, твин-80 не гидролизует. Аргининдегидролаза отсутствует, не денитрификатор. Индол и сероводород не образует. Лактозу, мелибиозу, мальтозу, сахарозу, глицерин не утилизирует. Молярный процент Г+Ц оснований в ДНК 65,5.

Штаммы рода *Deleya* не патогенны и не токсичны для теплокровных животных.

Штамм *Deleya marina* KMM 296 (4 МС 37) отличается от известного штамма-прототипа *Alteromonas macleodii* KMM 162 (40 МС) по культурально-морфологическим признакам: формирует беловатые непрозрачные колонии, у клеток образуется от 1 до 4 полярных жгутиков, включая латеральные; по физиолого-биохимическим признакам: оксидазо-отрицательный, практически не утилизирует углеводы, а также имеет высокий молярный процент Г+Ц оснований в ДНК.

Задачей изобретения является также разработка способа получения щелочной фосфатазы из штамма KMM 296, позволяющего получить фермент с более высокой, по сравнению с аналогами, удельной активностью и более высокой устойчивостью к химическим модификациям.

Поставленная задача решена тем, что предложен способ, позволяющий получить щелочную фосфатазу с удельной активностью 14000-15000 ед/мг белка, обладающую также высокой стабильностью, что делает возможным использование фермента в иммуноферментном анализе.

Предлагаемый способ получения щелочной фосфатазы предусматривает выращивание штамма-продуцента на питательной среде, отделение биомассы от культуральной жидкости, разрушение микробных клеток с последующим выделением целевого продукта водной экстракцией, а также хроматографическую очистку сырого ферментного препарата. В качестве продуцента используют штамм бактерии *Deleya marina* KMM 296 (4 МС 37; ВКМ В-2021 Д). Очистку фермента осуществляют сначала анионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе, затем гидрофобной хроматографией на бутил-тоиоперле и гель-фильтрацией на сефадексе G-100.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

ПРИМЕР 1. Свежепересеянную культуру смывают с косяка питательной средой в колбу емкостью 1000 мл, содержащей 500 мл питательной среды следующего состава (г/л): пептон 5,0; дрожжевой экстракт 2,5; глюкоза 1; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4$ 0,05; 750 мл натуральной морской воды (допустима замена 25 г/л NaCl); 250 мл дистиллированной воды; pH среды 7,5-7,8 и выращивают 24 часа в термостате при 28°C. Приготовленным таким образом посевным материалом инокулируют колбы емкостью 1000 мл (с 500 мл питательной среды). Выращивают в течение 24-28 часов на качалке (120 об/мин) при 24°C.

Для получения фермента бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин. Выход бактериальной биомассы 5 г с 500 мл культуральной жидкости. Продуктивность по белку 95 мг/л. Удельная активность щелочной фосфатазы в водном экстракте 45 ед/мг белка. Общая фосфатазная активность водного экстракта 4275 ед. с 1 л культуральной жидкости.

Сравнение полученных для штамма KMM 296 данных с характеристиками штамма KMM 162 показывает, что данный штамм в аналогичных условиях дает больший выход общей фосфатазной активности с 1 л питательной среды, а также щелочную фосфатазу с более высокой удельной активностью (табл.1).

ПРИМЕР 2.

Штамм выращивают как описано в примере 1.

К 200 г сырой биомассы, полученной из 20 л жидкой питательной среды, описанной в примере 1, добавляют 1000 мл 0,02 М трис-НСl буфера, pH 7,5, содержащего 0,01% NaN_3 (буфер А) и суспензию клеток дезинтегрируют порциями по 80 мл в течение 5x30 сек, охлаждая во льду. Затем центрифугируют при 3000 об/мин в течении 30 мин. Надосадочную жидкость собирают и полученный водный экстракт перемешивают с 700 мл уравновешенной буфером А ДЭАЭ-целлюлозой в холодной комнате в течение 1 часа. Затем ДЭАЭ-целлюлозу промывают на фильтре Шотта 0,2 М NaCl в буфере А. Фермент элюируют 0,4 М NaCl в буфере А. К элюату добавляют сухую соль сульфата аммония до конечной концентрации 1,5 М; после растворения соли раствор белка наносят на колонку (V 32 мл) с бутил-тоиоперлом, уравновешенную 1,5 М сульфатом аммония на буфере А, и проводят элюцию градиентом сульфата аммония от 1,5 М до 0,5 М (по 250 мл каждого раствора), со скоростью 40 мл/ч, отбирая фракции по 6 мл. Фермент выходит при концентрации сульфата аммония 1,1 М-0,9 М. Активные фракции собирают, концентрируют ультрафильтрацией на мембране PM-30 (Amersham) и наносят на колонку (V 140 мл) с сефадексом G-100, уравновешенную буфером: 0,01 М трис-НСl, 0,005 М $MgCl_2$, 0,05 М NaCl, 0,01% NaN_3 , pH 8,0. Фермент элюируют этим же буфером со скоростью 12 мл/ч, отбирая фракции по 4 мл. Активные фракции собирают и концентрируют на мембране PM-30. В табл.2 приводятся характеристики продукта в процессе очистки. Данный способ выделения обеспечивает высокую стабильность препарата щелочной фосфатазы.

Активность щелочной фосфатазы определяют по расщеплению п-НФФ. Стандартная инкубационная смесь в объеме 500 мкл содержит 15 мМ паранитрофенилфосфата (п-НФФ), 1 М диэтанолamina (ДЭА), pH 10,3 и фермент. После 30 мин инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 2 мл 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции п-НФФ определяют спектрофотометрически при 400 нм. За единицу активности щелочной фосфатазы принимают количество фермента, катализирующего освобождение 1 мкМ п-НФФ ($E_{400 \text{ нм}} 18600$) в течение 1 мин инкубации. Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Брэдфорд.

Исследование свойств щелочной фосфатазы, продуцируемой штаммом KMM 296 и выделяемой согласно изобретению, показало, что фермент имеет молекулярную массу 55 кДа, стабилен в области pH 6,0-11,0, проявляет максимальную активность в 1 М ДЭА буфере при pH 10,3 в присутствии катионов двухвалентных металлов. Данная щелочная фосфатаза термостабильна и не теряет первоначальной активности после 15 мин прогрева в интервале температур 20-50°C. Аналогичная преинкубация при 60°C приводит к потере 80% исходной активности. Фермент не требует присутствия катионов двухвалентных металлов для проявления своей максимальной активности, причем добавление 5 мМ ЭДТА в инкубационную смесь не приводит к заметному уменьшению активности щелочной фосфатазы. Фермент с одинаковой скоростью расщепляет п-НФФ 5'-АМФ, 5'-ЦМФ и 5'-дЦМФ. Щелочная фосфатаза штамма KMM 296 успешно использована на первой стадии ферментативного мечения ДНК фага лямбда, а также для получения ферментных конъюгатов.

Все вышеперечисленное свидетельствует в пользу широкого применения выделенного фермента в практике лабораторных исследований, а также в иммунодиагностике.

Формула изобретения

1 1. Штамм бактерии *Deleya marina* ВКМ В-2021 Д продуцент щелочной фосфатазы. 2 2. Способ получения щелочной фосфатазы, предусматривающий выращивание штамм-продуцента на питательной среде с получением биомассы, отделение биомассы от культуральной жидкости с последующим выделением целевого продукта водной экстракцией микробных клеток и хроматографическую очистку сырого ферментного препарата, отличающийся тем, что в качестве продуцента используют штамм бактерии *Deleya marina* ВКМ В-2021 Д, а очистку осуществляют сначала анионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе, затем гидрофобной хроматографией на бутил-тойоперле и гель-фильтрацией на сефадексе G-100.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#)