



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012142209/10, 03.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.10.2012

(45) Опубликовано: 20.01.2014 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2113479 C1, 20.06.1998. SU 1431681 A3, 15.10.1981. DATABASE GenBank DQ530422.1, 05.06.2006 [Найдено в Интернет 25.06.2013],
Найдено по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. EP 1261697 B1, 28.07.2004.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский
институт биоорганической химии им. Г.Б.
Елякова Дальневосточного отделения РАН,
зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

**Балабанова Лариса Анатольевна (RU),
Голотин Василий Александрович (RU),
Бакунина Ирина Юрьевна (RU),
Рассказов Валерий Александрович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)**

(54) ПЛАЗМИДА 40Gal, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ СИНТЕЗ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ α -PsGal, ШТАММ E.coli Rosetta(DE3)/40Gal - ПРОДУЦЕНТ ХИМЕРНОГО БЕЛКА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО АМИНОКИСЛОТНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ α -PsGal, И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и представляет собой плазмиду, определяющую синтез α -галактозидазы α -PsGal, включающую NcoI/SalI - фрагмент плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмент ДНК, размером 2142 пар оснований, содержащий химерный ген, состоящий из структурной части гена α -PsGal, адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках E. coli, и нуклеотид, кодирующий специфическую последовательность для энтеропептидазы. Изобретение относится также к штамму E. coli Rosetta (DE3), трансформированному указанной плазмидой, - продуценту химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal и

последовательность, специфичную для энтеропептидазы. Предложен также способ получения рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal, включающий стадии: инкубирования указанного штамма-продуцента в жидкой питательной среде LB в течение 12 ч при 16°C, осаждения бактериальных клеток центрифугированием, дезинтеграции суспензии клеток в буфере, центрифугирования экстракта, хроматографии надосадочной жидкости на колонке с металлоафинной смолой, элюции белка, концентрирования активных фракций с помощью ионообменной смолы, инкубирования с энтеропептидазой и выделения целевого продукта гель-фильтрацией. Изобретение позволяет получать более активную и стабильную рекомбинантную альфа-галактозидазу с

R U 2 5 0 4 5 8 3 C 1

R U 2 5 0 4 5 8 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2012142209/10, 03.10.2012

(24) Effective date for property rights:
03.10.2012

Priority:

(22) Date of filing: 03.10.2012

(45) Date of publication: 20.01.2014 Bull. 2

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let
Vladivostoku, 159, FGBUN Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN, zav. patentnym
otdelom N.I. Stadnichenko

(72) Inventor(s):

Balabanova Larisa Anatol'evna (RU),
Golotin Vasilij Aleksandrovich (RU),
Bakunina Irina Jur'evna (RU),
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)

(54) **PLASMID 40Gal DETERMINING SYNTHESIS OF α -GALACTOSIDASE α -PsGal, STRAIN Ecoli Rosetta(DE3)/40Gal - PRODUCER OF CHIMERIC PROTEIN CONTAINING AMINO-ACID SEQUENCE α -PsGal, AND METHOD FOR ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention represents plasmide determining synthesis of α -galactosidase α -PsGal, which includes NcoI/Sall - fragment of plasmid pET-40b(+) (Novagen) and DNA fragment, with the size of 2142 pairs of bases, which contains a chimeric gen consisting of structural part of gene α -PsGal, which is adapted on N-end for expression in E. coli cells, and a nucleotide coding a specific sequence for enteropeptidase. The invention also refers to strain E. coli Rosetta (DE3) transformed with the above plasmid - producer of chimeric protein containing amino-acid sequence of recombinant α -galactosidase α -PsGal and sequence specific for enteropeptidase. The invention also refers to a method for obtaining

recombinant α -galactosidase α -PsGal, which involves the following stages: incubation of the above strain-producer in liquid nutritional medium LB during 12 hours at 16°C, deposition of bacterial cells by centrifugation, disintegration of a suspension of cells in a buffer, centrifugation of an extract, chromatography of above-deposit liquid on a column with metal affine resin, elution of protein, concentration of active fractions by means of ion-exchange resin, incubation with enteropeptidase and separation of a target product by gel-filtration.

EFFECT: invention allows obtaining more active and stable recombinant alpha-galactosidase with high efficiency degree.

3 cl, 1 dwg, 3 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и касается способа получения рекомбинантного белка α -галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. штамма КММ 701 ВКМ В-2135Д (α -PsGal), а также плазмиды для его получения и рекомбинантного штамма *Escherichia coli*. Изобретение
5 позволяет производить высокоактивную рекомбинантную α -галактозидазу для использования в трансфузионной и клинической медицине, генной инженерии и молекулярной биологии.

α -D-галактозидаза (Е.С.3.2.1.22) катализирует гидролиз α -галактозидной связи в
10 таких олигосахаридах, как раффиноза, мелибиоза, стахиоза, и в таких полисахаридах, как галактоманнаны, а также в гликоконъюгатах, включая гликопротеины и гликолипиды. α -PsGal рекомендована для использования в трансфузионной медицине как фермент, способный удалять α -1,3-связанные остатки галактозы из
15 гликопротеинов групповых веществ В-крови с превращением последних в вещества группы Н (О); в клинической медицине как профилактический и лечебный антибактериальный препарат для обработки слизистых и раневых поверхностей; в молекулярной биологии как инструмент для исследования структуры олиго- и полисахаридных матриц; в генной инженерии для получения реперных белков и т.д.

Разработка эффективного способа получения универсальных по групповым
20 свойствам эритроцитов для неотложной трансфузиологической помощи пострадавшим продолжает быть весьма актуальной. α -Галактозидазы, инактивирующие серологическую активность эритроцитов человека группы В (ЭЧ-В), - относительно редкие ферменты. Клинические испытания конвертированных
25 эритроцитов на добровольцах продемонстрировали, что ферментативное преобразование ЭЧ-В выполнимо, что конвертированные ферментом ЭЧ-В в ЭЧ-О жизнеспособны и могут функционировать так же, как необработанные ЭЧ, которые подобраны по группе крови в соответствии с правилами, принятыми в клинической
30 медицине переливания. Однако количество фермента (мг), в этих исследованиях, даже с современной эффективной рекомбинантной технологией экспрессии составляет экономическое препятствие для использования их в медицине переливания, так как на одну упаковку (200 мл) эритроцитов требуется 1-2 г фермента [Zhang Y.P, Gong F., Bao G.Q., Gao H.W, Ji S.P, Tan Y.P., Li S.B., Li L.L, Wang Y.L., Xu H., Xu L.J., Tian S.G., Zhang
35 Z.X., Lu Q.S., Qiu Y., Bai J.S. Chen J.T. B to O 2 erythrocyte conversion by the recombinant α -galactosidase // Chin. Med. J. - 2007. - Vol.120, N 13. - P.1145-1150]. Кроме того, огромное значение имеет рН-оптимум фермента и узкая субстратная специфичность. Так, все описанные в литературе ферменты, эффективно действующие на эритроциты,
40 имеют оптимум в кислой области рН, что крайне нежелательно для эритроцитов.

Анализ многочисленных литературных данных показал, что именно бактерии содержат ферменты, одно из свойств которых удовлетворяет технологическим
45 требованиям (оптимум действия при рН 7,0), предъявляемым к модификации эритроцитов в физиологических условиях.

Морские бактерии как источники ферментов с уникальной специфичностью привлекают все большее внимание исследователей. Так было установлено, что α -
50 галактозидаза из морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 помимо инактивирующего действия на серологическую активность В-эритроцитов обладает антибактериальным свойством разрушать микробиологические пленки патогенных штаммов, образующихся на слизистых человека. Обработка эпителиальных клеток гортани человека препаратом такого фермента значительно снижала адгезию возбудителя дифтерии *S.diphtheriae* [L.A.Balabanova, I.Y.Bakunina, O.I.Nedashkovskaya,

I.D.Makarenkova, T.S. Zaporozhets, N.N.Besednova, T.N.Zvyagintseva and V.A.Rasskazov. Molecular Characterization and Therapeutic Potential of a Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 α -Galactosidase // *Mar Biotechnol.* - 2010. - Vol.12. P.111-120].

Известен способ получения природного белка α -галактозидазы из дикого штамма-продуцента *Pseudoalteromonas* sp. ВКМ В-2135Д [RU 2113479 C1, 20.06.1998]. Основным недостатком этого способа являются высокие технологические затраты при хранении и выращивании дикого штамма.

Недавно была установлена нуклеотидная последовательность зрелого белка α -галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 (код GenBank DQ530422.1). Однако способы получения активного рекомбинантного аналога α -галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. ВКМ В-2135Д (α -PsGal) пока еще не известны. Получение растворимой высокоактивной α -PsGal в гетерологичных бактериальных системах сопряжено с рядом трудностей, так как функциональный белок является психрофильным и состоит из двух субъединиц.

Задача изобретения - конструирование рекомбинантного штамма *E. coli*, плазмиды, кодирующей синтез рекомбинантного белка α -PsGal, и разработка способа его получения.

Поставленная задача решена созданием генетической конструкции в виде рекомбинантной плазмиды 40Gal и штамма *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal, обеспечивающих индуцируемый синтез с высоким и стабильным выходом активной растворимой рекомбинантной α -галактозидазы в периплазму клетки кишечной палочки.

Технический результат заявленного изобретения - получение активной рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal с высоким выходом и уровнем очистки.

Плазида 40Gal имеет 8306 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и последовательности фрагмента ДНК размером 2142 п.о., адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках *E. coli*, содержащего химерный ген, состоящий из структурной части гена α -PsGal, и специфической последовательности для энтеропептидазы с целью удаления дополнительных аминокислотных остатков с N-концевой части молекулы рекомбинантного белка.

На чертеже представлена физическая карта плазмиды 40Gal и область плазмиды, ответственная за экспрессию рекомбинантного белка α -PsGal.

Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды 40Gal, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержит последовательность структурного гена α -PsGal с адаптированным N-концом для экспрессии в *E. coli*, соответствующую открытой рамке считывания для белка α -PsGal, и последовательность, специфичную для энтеропептидазы (SEQ ID N 1).

Штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal получен трансформацией клеток *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen) плазмидой 40Gal с использованием традиционной генно-инженерной технологии [Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning. A. Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989.].

Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки

Клетки штамма образуют крупные круглые с ровными краями, выпуклые колонии до 5 мм в диаметре, поверхность колоний гладкая, консистенция слизистая. Пигмент не накапливается. Грамотрицательны, спор не образуют, капсулы не имеют. Колонии

хорошо растут на простых питательных средах (LB). При росте в жидких средах образуют интенсивную ровную муть.

Физико-биологические признаки

Штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal видотипичен по своим биохимическим свойствам.

5 Штамм не обладает желатиназной активностью, не ферментирует лизин; расщепляет глюкозу, лактозу, маннит, сахарозу до кислоты и газа. Имеет мутацию в гене *lac*, обеспечивающую контроль уровня экспрессии, а также трансляцию редких кодонов. Оптимальной для роста является температура 37°C, а для продукции психрофильной
10 α -PsGal 16°C.

Устойчивость к антибиотикам

Клетки штамма характеризуются устойчивостью к хлорамфениколу (34 мкг/мл) и канамицину (25 мкг/мл).

Патогенность и токсичность

15 Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal не патогенен и не токсичен для теплокровных животных.

Штамм хранится обычным способом в суспензии с глицерином (30%) при -20°C.

20 Заявляемый способ получения рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal заключается в культивировании клеток штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal в питательной среде LB, содержащей канамицин, отделении биомассы от культуральной жидкости, разрушении микробных клеток с последующим выделением целевого продукта водной экстракцией и хроматографической очисткой ферментного препарата. Очистку целевого продукта осуществляют хроматографией на металлоафинной смоле и гель-
25 фильтрацией.

Выход рекомбинантной α -PsGal в результате применения описанного способа составляет не менее 10 мг рекомбинантного белка с 1 л культуры с удельной активностью более 500 ед./мг белка, что превышает удельную активность природного
30 аналога в 5 раз.

Рекомбинантный белок α -PsGal является гомодимером с молекулярной массой 160 кДа, имеет оптимальную температуру реакции 20-22°C и оптимум pH=7,0-7,5, и его активность не зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов в
35 инкубационной среде. Рекомбинантная α -PsGal может быть успешно использована для удаления групповой специфичности эритроцитов человека группы крови В(III) и получения универсальной донорской крови группы О(I), так как после окончания реакции легко инактивируется уже после 25°C. α -PsGal также может быть использована для обработки слизистого эпителия человека в целях профилактики и
40 лечения инфекционных заболеваний.

Существенными преимуществами заявляемого способа являются:

- использование штамма-продуцента *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal, что позволяет получать при биосинтезе большое количество полноразмерной, двухсубъединичной и высокоактивной рекомбинантной α -PsGal;
- 45 - использование двухстадийной хроматографической очистки фермента, что позволяет получить чистый рекомбинантный белок за короткое время и с малыми потерями.

50 Способ получения функционально активного белка на основе использования гена, кодирующего α -галактозидазу морской бактерии α -PsGal, иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование плазмиды 40Gal.

Рекомбинантную плазмиду 40Gal, содержащую структурный ген α -PsGal,

кодирующий зрелую форму α -галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701, и последовательность, специфичную для этеропептидазы, фланкированные сайтами рестрикции NcoI и SaiI, конструируют на основе коммерческой плазмиды pET-40b(+) (Novagen).

5 Фрагмент ДНК, содержащий полноразмерный ген α -PsGal, получают при помощи полимеразной цепной реакции с использованием геномной ДНК штамма морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp.КММ 701, ВКМ В-2135Д, в качестве матрицы и праймеров G2-NcoI-for40 и G3-SalI-rev40, где G2-NcoI-for40 - праймер, специфичный по отношению к N-концевой последовательности α -PsGal, включающий последовательность для этеропептидазы, G3-SalI-rev40 - обратный праймер, специфичный по отношению к C-концевой последовательности α -PsGal:

G2-NcoI-for40: 5'-

15 АТТАССАТGGATGACGACGACAAGGCCGACAСТАААТСАТТТТАТCGАТТАGАСА-

3'

G3-SalI-rev40: 5'-ACACGTCGACTTACGCTTTGTTGAGCTCAAATATAAGC-3'

Данную реакцию проводят в следующих условиях: 10x Encycio буфер, 50x смесь полимераз Encycio ("Encycio PCR kit", Евроген, Москва), 50x смесь dNTP (10 mM каждого), смесь праймеров (5 μ M каждого), 50 нг ДНК. Процесс амплификации состоит из следующих стадий: прогревание при 95°C 2,5 мин, 35 циклов ПЦР (15 сек 95°C, 2 мин 72°C) и инкубация 10 мин при 72°C. После амплификации фрагмент ДНК очищают электрофоретически в 1% агарозном геле. Фрагмент (1 мкг) обрабатывают рестриктазами NcoI и SaiI в оптимальном буфере (Fermentas) в течение 3 часов, затем ферменты удаляют из реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1). В водную фракцию, содержащую фрагмент, добавляют 1/10 объема 0,3 М ацетата Na, pH 5,2, и 1/2 объема изопропанолового спирта и оставляют на -20°C в течение 30 мин. Затем центрифугируют при 14000 об/мин в течение 20 мин, осадок промывают 75% этанолом и высушивают при комнатной температуре. Осадок растворяют в 20 мкл.

5 мкг плазмидной ДНК pET-40b(+) обрабатывают рестриктазами NcoI и SaiI в соответствии с методикой, описанной выше, и из полученного гидролизата выделяют векторную часть плазмиды в 1% геле легкоплавкой агарозы.

Полученный фрагмент и векторную часть плазмиды pET-40b(+) сшивают при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции (Fermentas). 10 мкл реакционной смеси используют для трансформации компетентных клеток *E. coli* Rosetta(DE3). Трансформанты высевают на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 час при 37°C клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают ДНК, содержащую необходимую последовательность, представляющую собой плазмиду 40Gal размером 8306 п.о.

45 Пример 2. Получение штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal, трансформированного плазмидой 40Gal - продуцента химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal и последовательность, специфичную для этеропептидазы.

50 Штамм-продуцент получают путем трансформации клеток штамма *E. coli* Rosetta(DE3) рекомбинантной плазмидой 40Gal. Ночную культуру (0,5 мл LB) штамма-продуцента рекомбинантной α -PsGal выращивают в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин при

температуре 37°C в течение 2 часов до оптической плотности 0,6-0,8 (OD₆₀₀), затем добавляют индуктор экспрессии IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубируют далее при 16°C в течение 12 часов. Для определения продуктивности штамма клеточные водные экстракты анализируют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Гель окрашивают Кумасси R-250 по стандартной методике и определяют относительное количество белка в полосе целевого продукта. Содержание рекомбинантного белка в растворимой клеточной фракции составляет не менее 30% от всех белков этой фракции.

Пример 3. Выделение и характеристика рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal.

Штамм-продуцент рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal инкубируют в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 0,2 мМ IPTG, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 250 об/мин в течение 12 часов при 16°C. Бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток дезинтегрируют в 100 мл буфера А (0,01 М NaH₂PO₄, pH 7,7, 0,01% NaN₃) в течение 5×30 сек, охлаждая во льду. Затем центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку с металлоафинной смолой (Qiagen), предварительно уравновешенную буфером А. Элюцию белка проводят буфером А, содержащим 50 мМ ЭДТА. Активные фракции собирают и концентрируют до 3 мл в буфере А, содержащем 0,4 мМ NaCl, на ионообменной смоле DEAE-toyoperl 650M (TOYA SODA) и инкубируют с энтеропептидазой (Invitrogen) при 21°C в течение 15 часов. Раствор белка наносят на колонку для гель-фильтрации с Sephacryl S-200 HR (Sigma). Выход рекомбинантного белка составляет около 10 мг с 1 литра культуры. Полученный рекомбинантный полипептид определяют по первым 10 аминокислотам на автоматическом секвенаторе. Проведенное секвенирование препарата рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal, выделенной из клеток штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal, показало, что N-концевая аминокислотная последовательность A1a-Asp-Thr-Lys-Ser-Phe-Tyr-Arg-Leu-Asp соответствует первым 10 аминокислотам полноразмерного природного белка α -галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701, ВКМВ-2135Д,-аналога α -PsGal.

Активность α -галактозидазы определяют по расщеплению п-нитрофенилгалактопиранозида (п-НФГП). Реакционная смесь в объеме 400 мкл содержит 10 мМ NaH₂PO₄ (pH 7,2), 3 мМ субстрата и фермент. После 20 мин инкубации при 20°C реакцию останавливают добавлением 0,6 мл 1 М Na₂CO₃. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции продукта определяют спектрофотометрически при 400 нм. За единицу активности принимают количество фермента, катализирующего освобождение 1 мкМ п-НФГ (E_{400 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.

Полученные данные по физико-химическим характеристикам и ферментативной активности продукта экспрессии искусственного химерного гена α -PsGal в клетках штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/40Gal свидетельствуют о соответствии исследуемого полипептида его природному аналогу.

Как следует из приведенных примеров, заявляемая группа изобретений позволяет получать активную рекомбинантную α -галактозидазу α -PsGal с высоким выходом при относительно простой и надежной технологии.

Заявленное изобретение позволяет:

- с помощью использования штамма-продуцента *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal получать активную рекомбинантную α -галактозидазу α -PsGal;

5 - использование штамма-продуцента *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal позволяет получать при биосинтезе большое количество полноразмерной рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal;

10 - использование металлоафинной и гель-фильтрационной хроматографий при очистке фермента из водного экстракта клеток штамма-продуцента позволяет получать фермент с чистотой более 98%.

Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

<110> Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю., Рассказов В.А.

15 <120> Плазмида 40Gal, определяющая синтез α -галактозидазы α -PsGal, штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/40Gal - штамм-продуцент рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal и способ ее получения.

<160> 1

<210> 1

<211> 2156

20 <212> ДНК

<213> *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 ВКМ В-2135Д

25 <223> Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды 40Gal, содержащая сайты рестрикции NcoI и SalI, последовательность, специфичную для энтеропептидазы, и последовательность структурного гена α -PsGal, соответствующую открытой рамке считывания для белка α -PsGal, включающую стоп-кодон.

30

35

40

45

50

SaI

195 GTCGACTTAC GCTTTGTTGA GCTCAAATAT AAGCGATGTT TGCGGGAATG AAATTGGCAT
CAGCTGAATG CGAAACAACCT CGAGTTTATA TTCGCTACAA ACGCCCTTAC TTAAACCGTA

5 255 TTGTAAACCA AACTGCATTA GCGCTTCACC GGTAATGTT TGACCATTTA CCGCAGCAAT
AACATTTGGT TTGACGTAAT CGCGAAGTGG CCATTTACAA ACTGGTAAAT GGCGTCGTTA

315 AGAAGATGGG CGATACTCTT CAAATTTTAC CGGCCACACT AAATTAAGTG TGTACTGCGC
TCTTCTACCC GCTATGAGAA GTTTAAATG GCCGGTGTGA TTTAATTCAC ACATGACGCG

10 375 ATCGGCATCT AGGCCAACAA AACGAAGCTT ATTAGGCGCT GTACGCGGTG TTTCGCGAAC
TAGCCGTAGA TCCGGTTGTT TTGCTTCGAA TAATCCGCGA CATGCGCCAC AAAGCGCTTG

435 GCTGTTATAG GCAAATAACG CTTTCGTTTT TTGCGCATCG ATTAAACCAA AGTTAATTGA
CGACAATATC CGTTTATTGC GAAAGCAAAA AACGCGTAGC TAATTTGGTT TCAATTAACCT

15 495 TAAATCGTCG CTATCTAGGC GGTATAAATC GGCGCTATGA ATAAACTCAC GATGCTCTTT
ATTTAGCAGC GATAGATCCG CCATATTTAG CCGCGATACT TATTTGAGTG CTACGAGAAA

555 GTGAAGTGCT AFTGCCGCTT TAAGTGCATT GTATTCGTGA TCGTTCAGCT CACGTGGGTC
CACTTCACGA TAACGGCGAA ATTCACGTAA CATAAGCACT AGCAAGTCGA GTGCACCCAG

20 615 CATTTCGATT CCCATGTGGC CGAACATTGA TACCGCAGCA CGCATTTCAA TACTTACATT
GTAAAGCTAA GGGTACACCG GCTTGTAACT ATGGCGTCGT GCGTAAAGTT ATGAATGTAA

675 ACGCCCTGTG ATATGGCAAT CGCGTGGGCC TACGTGTGCA CCCATAACCG ACGATGGGAA
TGCGGGACAC TATACCGTTA GCGCACCCGG ATGCACACGT GGGTATTGGC TGCTACCCTT

25 735 AAAGAACGAA CATCCACGCT GTATTTCAAG GCGATCAAGC GCATCATTTG AATCTGACGT
TTTCTTGCTT GTAGGTGCGA CATAAAGTTC CGCTAGTTCG CGTAGTAAAC TTAGACTGCA

795 CCATACACGG TCTGTGTGTG CAAGTACGCC GTAATCTACA CGTGCACCAC CTGACGAACA
GGTATGTGCC AGACACACAC GTTCATGCGG CATTAGATGT GCACGTGGTG GACTGCTTGT

30 855 GCTTTCTATT TCAAGCCCTG GGTGCGCCGC TTTAATACGG TCAATTAAC GATAAAGTGC
CGAAAGATAA AGTTCCGGAC CCACGCGGCG AAATTATGCC AGTTAATTTG CTATTTACAG

915 TAATGTTTGC TGATGCACAG CAGGCTTGCC ATCAAAATTA CCCGCATGGT TAATATCGCG
ATTACAAACG ACTACGTGTC GTCCGAACGG TAGTTTTAAT GGGCGTACCA ATTATAGCGC

35 975 GTTCATATCC CATTTAATGT ACTTAATAGT TGGGTATTCA ACTAAAATAT CGTCAATCGC
CAAGTATAGG GTAAATTACA TGAATTATCA ACCCATAAGT TGATTTTATA GCAGTTAGCG

40

45

50

1035 TTTATATAGG TACTCAACAA CCTCAGAGCG CGTTAAATCA AGTACTAGCT GATTTCTAAA
 AAATATATCC ATGAGTTGTT GGAGTCTCGC GCAATTTAGT TCATGATCGA CTAAAGATTT

1095 GCTTAACTGC TCGTTATTTT CAGATCCTAA AACCCAATCT GGATGCGCGC GGTATAAAAA
 CGAATTGACG AGCAATAAAA GTCTAGGATT TTGGGTTAGA CCTACGCGCG CCATATTTTTT

5 1155 GCTATCAGGG TTGACCATTT CTGGTTCAAA CCAAATACCA AACTCCATAC CTAAGCTATT
 CGATAGTCCC AACTGGTAAA GACCAAGTTT GSTTTATGGT TTGAGGTATG GATTCGATAA

1215 AACATGATCA ATGACTGGCG ATAAGCCATC TGGGTAAATT TTGTAATCTA CTGTCCAATA
 TTGTACTAGT TACTGACCGC TATTCGGTAG ACCCATTTAA AACATTAGAT GACAGGTTAT

10 1275 CCTAAGCCTG CATTGTCGCC ACGACGGCTC TTTGAACCAG CCGTCTTCAA GTACAAAACG
 GGATTCGGAC GTAACAGCGG TGCTGCCGAG AAACCTGGTC GGCAGAAGTT CATGTTTTTC

1335 CTCAATACCT AACGGCGCTA CTTTGTGCGC TAACTGCTTA AGCGTGTCTA CGTCGTGATC
 GAGTTATGGA TTGCCGCGAT GAAACAGCCG ATTGACGAAT TCGCACAGAT GCAGCACTAG

15 1395 AAAGTAAATA CCTTCCCACG TGTGTAAATG CATAGGGCGC GCTTTTTTAC GTTGTAGCTTG
 TTTTATTAT GGAAGGGTGC ACAACATTAC GTATCCCAGC GAAAAAGTG CAACTCGAAC

1455 GCTAAGTAAA TTAGCTTTAA CAAAACGATG AAAATTACGA GAAAGCGCGC TAAAACCTTC
 CGATTCATTT AATCGAAATT GTTTTGCTAC TTTTAATGCT CTTTCGCGCG ATTTTGAAG

20 1515 ACTTGAAAAC GAGCCATAAA TGCTCGGGCT TTGATACGTT TGACCTTTAG CAAGCGTAAG
 TGAACTTTTG CTCGGTATTT ACGAGCCCGA AACTATGCAA ACTGGAAATC GTTCGCATTC

1575 CTCACCAGGA AGTAATAGCT CACCCATTTG TACATAACGA CGACCTTCAG CTAGAAGCTC
 GAGTGGTCCT TCATTATCGA GTGGGTAAAC ATGTATTGCT GCTGGAAGTC GATCTTCGAG

1635 TGCGCGTAGT TTATTGTTGC CGCTCCAACC TAAATGAAAG CCGTAACATT CGCCGTGTTG
 ACGCGCATCA AATAACAACG GCGAGGTTGG ATTTACTTTC GGCATTGTAA GCGGCACAAC

25 1695 CTCGCCTGCA TTTTCGTTAT GCACTAATAA ACCAGGAAAC ACATCGTGTG ATGTTTTGCG
 GAGCGGACGT AAAAGCAATA CGTGATTATT TGGTCCTTTG TGTAGCACAC TACAAAACGG

1755 TTTACGGTTT TCACGTACAA AGCTACCAAG CACTAAATCA ACAGATTGAC GCTGGAATTC
 AAATGCCAAA AGTGCATGTT TCGATGGTTC GTGATTTAGT TGTCTAACTG CGACCTTAAG

30 1815 GTTTGACCAA CGACCTTCAA AGCTCACTAT TTTACTTACG CTGTCTGGCA ATTGAAATGT
 CAAACTGGTT GCTGGAAGTT TCGAGTGATA AAATGAATGC GACAGACCGT TAACTTTACA

1875 TGGCGCGGCG CAGAAATTAA CGCTCAGTGG TGAGTCACCT AAATTAGTTA ATACAGTATG
 ACCGCGCCGC GTCTTTAATT GCGAGTCACC ACTCAGTGA TTTAATCAAT TATGTCATAC

35 1935 TGCACTTAAT ACGTCACTGT TGTGTCAAG CGTAATGCTG TGCACGACTT CAATACCAG
 ACGTGAATTA TGCAGTGACA ACAACAGTTC GCATTACGAC ACGTGCTGAA GTTATGGTGC

1995 AAGCTTATCT ACACTTACAA ACTCAACAGC CGCACTTGAA GGCTGACGCA CTTCTTGAAG
 TTCGAATAGA TGTGAATGTT TGAGTTGTCG GCGTGAACCT CCGACTGCGT GAAGAACTTC

40 2055 CTCTGGCCCA ACTGACCATG CGATTGAGTC ATTTACTAGC TCAAGCCCTG GCGCGCCAGT
 GAGACCGGGT TGAAGGTGAC GCTAACTCAG TAAATGATCG AGTTCGGGAC GCGCGGGTCA

2115 AAAGCCTTCG CCTAATAAAG GAGATAGAGA AATAGGCGCT TCTTCAACCA CGGCACATTT
 TTTCGGAAGC GGATTATTTT CTCTATCTCT TTATCCGCGA AGAAGTTGGT GCCGTGTAAA

2175 TACTTCTTGA CGGGTAGCAA GCTGAGTAAG CATTGTTTCT GTTGTTCGCT CAGATAGGCG
 ATGAAGAAGT GCCCATCGTT CGACTCATTC GTAACAAAGA CAACAAGCGA GTCTATCCGC

45 2235 CTTACCAAAG TACAGTAACG CCGGTGTTTT GCTCTGGCAG TCGAAAATAA CCGTGCTGTT
 GAATGGTTTC ATGTCATTGC GGCCACAAAA CGAGACCGTC AGCTTTTATT GCCACGACAA

2295 TACTCTGTCT AATCGATAAA ATGATTTAGT GTCGGCCTTG TCGTCGTCAAT NcoI
 ATGAGACAGA TTAGCTATTT TACTAAATCA CAGCCGGAAC AGCAGCAGTA CCATGG
 GGTACC

50

Формула изобретения

1. Плазмида 40Gal размером 8306 пар оснований (п.о.), определяющая синтез

рекомбинантной α -галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. ВКМ В-2135Д (α -PsGal) и характеризующаяся наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмента ДНК размером 2142 п.о., содержащего химерный ген, состоящий из структурной части гена α -PsGal, адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках *E.coli*, и нуклеотида, кодирующего специфическую последовательность для энтеропептидазы (SEQ ID N 1).

2. Штамм *E.coli* Rosetta(DE3), трансформированный плазмидой 40Gal по п.1, - продуцент химерного белка, содержащего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal и последовательность, специфичную для энтеропептидазы.

3. Способ получения рекомбинантной α -галактозидазы α -PsGal, характеризующийся тем, что штамм-продуцент по п.2 инкубируют в жидкой питательной среде LB в течение 12 ч при 16°C, затем бактериальные клетки осаждают центрифугированием, суспензию клеток дезинтегрируют в буфере, далее экстракт центрифугируют, затем надосадочную жидкость помещают на колонку с металлоафинной смолой, далее элюируют белок, затем активные фракции концентрируют на ионообменной смоле, инкубируют с энтеропептидазой и выделяют целевой продукт гелем-фильтрацией.

25

30

35

40

45

50

