



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013112996/10, 22.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.03.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.03.2013

(45) Опубликовано: 20.08.2014 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2141526 C1, 20.11.1999. И.С.БАКУНИНА О-Гликозидгидролазы морских бактерий, Автореферат, Владивосток, 2011. US 6228631 B1, 08.05.2001. US 20030068804 A1, 10.04.2003. GenBank HQ108058.1, 28.08.2010, Найдено в Интернет по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ108058> [23.01.2014]

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 Стадниченко Н.И.

(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 40NaGal, ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ СИНТЕЗ α -N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗЫ α -AlNaGal, ШТАММ E.coli Rosetta(DE3)/40NaGal - ПРОДУЦЕНТ ХИМЕРНОГО БЕЛКА, ВКЛЮЧАЮЩЕГО АМИНОКИСЛОТНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ α -N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗЫ α -AlNaGal, И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии и представляет собой плазмиду 40NaGal, определяющую синтез α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, включающую NcoI/SalI-фрагмент плазмиды pET-40b(+)(Novagen) и фрагмент ДНК размером 1299 пар оснований, содержащий химерный ген, состоящий из структурной части гена α -AlNaGal, адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках E.coli, и нуклеотиды, кодирующие специфическую последовательность для протеазы TEV. Изобретение относится также к штамму

E.coli Rosetta(DE3), трансформированному указанной плазмидой, - продуценту химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal. Предложен также способ получения рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal с использованием штамма согласно изобретению. Изобретение позволяет получать α -N-ацетилгалактозаминидазу с высокой степенью эффективности. 3 н.п. ф-лы, 1 ил., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 525 682**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013112996/10, 22.03.2013

(24) Effective date for property rights:
22.03.2013

Priority:

(22) Date of filing: 22.03.2013

(45) Date of publication: 20.08.2014 Bull. № 23

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 Stadnichenko N.I.

(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 40NaGal, DETERMINING SYNTHESIS OF α -N-ACETYLHALACTOSAMINIDASE OF α -AlNaGal, STRAIN E.coli Rosetta(DE3)/40NaGal - PRODUCER OF CHIMERIC PROTEIN, WHICH INCLUDES AMINOACID SEQUENCE OF RECOMBINANT α -N-ACETYLHALACTOSAMINIDASE OF α -AlNaGal, AND METHOD OF ITS OBTAINING**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention represents the plasmid 40NaGal, which determines synthesis of α -acetylhalactosaminidase α -AlNaGal, which includes a NcoI/SalI-fragment of the plasmid pET-40b(+) (Novagen) and a fragment of DNA with a size of 1299 base pairs, which contains a chimeric gene, consisting of a structural part of the gene α -AlNaGal, adapted by the N-end for the expression in cells of E.coli, and nucleotides, coding a specific sequence for the protease TEV. The invention also relates to strain of E.coli

Rosetta(DE3), transformed by the claimed plasmid, - producer of a chimeric protein, which includes an aminoacid sequence of recombinant α -N-acetylhalactosaminidase α -AlNaGal. Also claimed is a method of obtaining recombinant α -N-acetylhalactosaminidase α -AlNaGal with the application of strain according to the invention.

EFFECT: invention makes it possible to obtain α -N-acetylhalactosaminidase with a high efficiency degree.

3 cl, 1 dwg, 3 ex

R U 2 5 2 5 6 8 2 C 1

R U 2 5 2 5 6 8 2 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и касается способа получения рекомбинантного белка α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *Arenibacter latericius* (α -AlNaGal), а также плазмиды для его получения и рекомбинантного штамма *Escherichia coli*. Изобретение позволяет производить

5 высокоактивную рекомбинантную α -N-ацетилгалактозаминидазу для использования в трансфузионной и клинической медицине, генной инженерии и молекулярной биологии.

Фермент α -N-ацетилгалактозаминидазу (ЕС 3.2.1.49.) используют в качестве инструмента для исследования структуры сложных гликоконъюгатов и синтеза новых олигосахаридов с N-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозой (NAcGal), связанных

10 α -O-гликозидной связью, которую трудно синтезировать химическими методами [1]. α -N-ацетилгалактозаминидаза катализирует гидролитическое отщепление N-ацетамидо-2-дезоксид- α -D-галактозидных остатков от невосстанавливающих концов различных сложных углеводов и гликоконъюгатов. Его физиологическими субстратами являются гликолипиды, гликопептиды и гликопротеины, содержащие структуры с O-гликозидным

15 кором, олигосахариды и антигены иммунодоминант эритроцитов группы А.

Позднее интерес к ферменту возник в связи с возможностью использования его в биотехнологии создания универсальной крови группы О из донорской крови группы А для решения проблем трансфузионной медицины. Известно, что кровь группы А более широко распространена среди доноров, чем группы В и АВ, поэтому интерес

20 для медицины представляют ферменты, проявляющие специфичность к антигену группы А. Проблема заключается в том, что кровь группы А состоит из двух основных подгрупп: А1 и А2 [2]. Эритроциты группы А1 содержат на поверхности примерно в 5 раз больше А антигенов, чем эритроциты подгруппы А2. Кроме того, красные клетки подгруппы А1 имеют гликолипиды с иммунными детерминантами, составленными из

25 повторяющейся А структуры.

На сегодняшний день α -N-ацетилгалактозаминидазы были выделены и всесторонне охарактеризованы лишь в некоторых наземных моллюсках, грибах и некоторых патогенных бактериях наземного происхождения *Clostridium perfringens*, *Ruminococcus*

30 *torques*, а также успешно выделены из печени человека, мышцы и цыпленка [3-7].

Однако конверсия эритроцитов А в эритроциты группы О была достигнута лишь с помощью α -N-ацетилгалактозаминидаз из печени цыпленка и из патогенных для человека бактерий *Clostridium perfringens*, причем конверсия возможна только для эритроцитов крови подгруппы А2 при рН 5,5, т.е. в условиях, травмирующих красные клетки [3, 4]. Такая специфичность не является достаточным условием для полной

35 конверсии А-эритроцитов, поэтому эритроциты, обработанные этими ферментами, остаются не пригодными для переливания реципиентам. К тому же ферменты из вышеназванных источников имеют многомерную структуру с молекулярной массой, достигающей 500 кДа, что затрудняет их использование в молекулярной биологии и биотехнологии.

В 2007 году появилась публикация иностранных коллег, в которой сообщалось о ферменте из патогенного штамма бактерии *Elisabethkingia meningosepticum*, с помощью которого при рН 7,0 успешно конвертировали как эритроциты А2, так и А1 в эритроциты

40 группы О [7]. Фермент оказался NAD^+ -зависимым, реализующим механизм гидролиза, неродственный механизму действия классических гликозидгидролаз семейств GH 27 и 36. Данный фермент не имел аналогов среди известных α -галактозидаз и α -N-ацетилгалактозаминидаз и открыл новое 109 семейство гликозидгидролаз в классификации, основанной на общих чертах аминокислотных последовательностей.

Нами была обнаружена α -N-ацетилгалактозаминидаза 109 семейства

гликозидгидролаз из непатогенной аэробной морской бактерии *Arenibacter latericius* 426^T, ВКМ В-2137Д, способная инактивировать серологическую активность эритроцитов А обеих подгрупп [8]. Фермент имеет нейтральный рН оптимум действия (7,0-7,3), комфортный для жизнеспособности эритроцитов, и проявляет максимальную активность в присутствии 0,4 М NaCl и 1 мМ Mg²⁺.

Разработка эффективного способа получения универсальных по групповым свойствам эритроцитов для неотложной трансфузиологической помощи пострадавшим продолжает быть весьма актуальной. Клинические испытания конвертированных эритроцитов на добровольцах продемонстрировали, что ферментативное преобразование эритроцитов человека выполнимо, что конвертированные ферментом эритроциты группы О жизнеспособны и могут функционировать так же, как необработанные эритроциты в соответствии с правилами, принятыми в клинической медицине переливания.

Однако необходимость больших количеств фермента 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. Кроме того, огромное значение имеет рН-оптимум фермента и узкая субстратная специфичность.

Известен способ получения природного белка α -N-ацетилгалактозаминидазы из дикого штамма-продуцента *Flavobacterium* sp. 426^T, ВКМ В-2137Д, с удельной активностью 22 ед./мг белка [9]. Основными недостатками этого способа получения являются высокие технологические затраты при хранении и выращивании дикого штамма и относительно низкая удельная активность.

Недавно была установлена нуклеотидная последовательность зрелого белка α -N-ацетилгалактозаминидазы *Arenibacter latericius* 426^T, ВКМ В-2137Д (код GenBank HQ 108058). Однако способы получения активного рекомбинантного аналога α -N-ацетилгалактозаминидазы *Arenibacter latericius* 426^T (α -AlNaGal) пока еще не известны. Получение растворимой высокоактивной α -AlNaGal 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 -AlNaGal, и разработка способа его получения.

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

Технический результат заявленного изобретения - получение активной рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal с высоким выходом и уровнем очистки.

Плазмида 40NaGal имеет 7489 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и последовательности фрагмента ДНК размером 1299 п.о., адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках *E. coli*, содержащего химерный ген, состоящий из структурной части гена α -AlNaGal и двух специфических последовательностей для протеазы TEV с целью удаления дополнительных аминокислотных остатков с N- и C-концевой части молекулы рекомбинантного белка при необходимости.

На фигуре представлена физическая карта плазмиды 40NaGal и область плазмиды, ответственная за экспрессию рекомбинантного белка α -AlNaGal.

Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды 40NaGal, фланкированная сайтами NcoI и SaiI, содержит последовательность структурного гена α -AlNaGal с адаптированным N-концом для экспрессии в *E.coli*, соответствующую открытой рамке считывания для белка α -AlNaGal, и две последовательности с N- и C-конца, специфичные для расщепления протеазой TEV (SEQ ID N 1).

Штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal получен трансформацией клеток *E.coli* Rosetta (DE3) (Novagen) плазмидой 40NaGal с использованием традиционной генно-инженерной технологии [10].

Рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal 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)/40NaGal видотипичен по своим биохимическим свойствам. 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 α -AlNaGal - 16°C.

Устойчивость к антибиотикам.

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

Патогенность и токсичность.

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

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

Заявляемый способ получения рекомбинантной α -AlNaGal заключается в культивировании клеток штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal 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-фильтрацией.

Выход рекомбинантной α -AlNaGal в результате применения описанного способа составляет не менее 10 мг рекомбинантного белка с 1 л культуры с удельной активностью 60 ед./мг по п-нитрофенил-N-ацетил-галактозаминиду, что превышает удельную активность природного аналога из морской бактерии *Arenibacter latericius* как минимум в 3 раза и рекомбинантного аналога из патогенной бактерии *Elizabethkingia meningoseptica* - в 5 раз [7].

Рекомбинантный белок α -AlNaGal является гомодимером с молекулярной массой 164 кДа или 96 кДа после удаления аминокислотных довесков протеазой TEV, имеет оптимальную температуру реакции 20-37°C, стабилен до 50°C, оптимум pH 7,0-7,2, и его активность не зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов в

инкубационной среде. Аминокислотные довески не влияют принципиально на ферментативные свойства белка α -AlNaGal, поэтому стадией их удаления при очистке рекомбинантного белка можно пренебречь.

5 Рекомбинантная α -AlNaGal может быть успешно использована для удаления групповой специфичности эритроцитов человека группы крови А(II) и получения универсальной донорской крови группы О(1), а также в структурном анализе сложных гликопротеинов и протеогликанов и в синтезе уникальных гликозидов для целей биотехнологии и медицины.

Существенными преимуществами заявляемого способа являются:

10 - использование штамма-продуцента *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal, что позволяет получать при биосинтезе большое количество полноразмерной и высокоактивной рекомбинантной α -AlNaGal;

- использование двухстадийной хроматографической очистки фермента, что позволяет получить чистый рекомбинантный белок за короткое время и с малыми потерями.

15 Способ получения функционально активного белка на основе использования гена, кодирующего α -N-ацетилгалактозаминидазу морской бактерии α -AlNaGal, иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование плазмиды 40NaGal.

20 Рекомбинантную плазмиду 40NaGal, содержащую структурный ген α -AlNaGal, кодирующий зрелый белок α -N-ацетилгалактозаминидазу *A. latericius*, и последовательности, специфичные для расщепления протеазы TEV, фланкированные сайтами рестрикции NcoI и SalI, конструируют на основе коммерческой плазмиды pET-40b(+) (Novagen).

25 Фрагмент ДНК, содержащий полноразмерный ген α -AlNaGal, получают при помощи полимеразной цепной реакции с использованием геномной ДНК штамма морской бактерии *Arenibacter latericius* 426^T, ВКМ В-2137Д, в качестве матрицы и пары праймеров Nac40TEV_NcoF и Nac40TEV_SalIR, где Nac40TEV_NcoF - праймер, специфичный по отношению к N-концевой последовательности α -AlNaGal, включающий
30 последовательность для протеазы TEV, Nac40TEV_SalIR - обратный праймер, специфичный по отношению к C-концевой последовательности α -AlNaGal, включающий последовательность для протеазы TEV:

Nac40TEV_NcoF: 5'-

ttaaccatgGAAAATCTTTATTTTCAGGGTGGGGCTAAGTACATGGGCGGTTTTTCTGCT-
3'

35 Nac40TEV_SalIR: 5'-

ttaagtcgacACCCTGAAAATAAAGATTTTCGCTTACAATATCTAATGGTGCAAGTGGT-3'

40 Данную реакцию проводят в следующих условиях: 10x Encyclo буфер, 50x смесь полимераз Dream Taq (Ферментас), 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 мин, 35 циклов ПЦР (15 сек - 95°C, 1 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 SalI в оптимальном буфере (Fermentas) в течение 3 час, затем ферменты удаляют из
45 реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1). В водную фракцию, содержащую фрагмент, добавляют 1/10 объема 0,3 М ацетата натрия, pH 5,2, и 1/2 объема изопропанолового спирта и оставляют при -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 деионизированной

воды.

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

5 Полученный фрагмент и векторную часть плазмиды рЕТ-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 12 час при 37°C клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. 10 Отбирают ДНК, содержащую необходимую последовательность, представляющую собой плазмиду 40NaGal размером 7489 п.о.

15 Пример 2. Получение штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal, трансформированного плазмидой 40NaGal - продуцента химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -AlNaGal.

Штамм-продуцент получают путем трансформации клеток штамма *E.coli* Rosetta (DE3) рекомбинантной плазмидой 40NaGal. Ночную культуру (0,5 мл LB) штамма-продуцента рекомбинантной α -AlNaGal выращивают в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г 20 NaCl, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин при температуре 37°C в течение 2 час 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 час.

25 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 -AlNaGal.

30 Штамм-продуцент рекомбинантной α -AlNaGal - *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 час при 16°C. Бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток 35 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 40 буфером А, содержащим 50 мМ ЭДТА. Активные фракции собирают и концентрируют до 3 мл в буфере А на ионообменной смоле ДЕАЕ-целлюлоза (Watman) и инкубируют с протеазой TEV (Invitrogen) при 21°C в течение 12 час. Раствор белка наносят на колонку для гель-фильтрации с Sephacryl S-200 HR (Sigma). Выход рекомбинантного белка составляет около 10 мг с 1 л культуры.

45 Полученный рекомбинантный полипептид определяют по первым 10 аминокислотам на автоматическом секвенаторе. Проведенное секвенирование препарата рекомбинантной α -AlNaGal, выделенной из клеток штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal, показало, что N-концевая аминокислотная последовательность (GAKYMGGFSAPKLDT) соответствует первым 15 аминокислотам полноразмерного природного белка α -N-

ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *Arenibacter latericius* 426^T, ВКМ В-2137Д, - аналога α -AlNaGal.

Активность α -N-ацетилгалактозаминидазы определяют по расщеплению п-нитрофенил-альфа-N-ацетилгалактозаминида. Реакционная смесь в объеме 400 мкл содержит 10 мМ NaH₂PO₄ (рН 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 субстрата в течение 1 мин инкубации. Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Брэдфорда.

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

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

Заявленное изобретение позволяет:

- с помощью использования штамма-продуцента *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal получать активную рекомбинантную α -N-ацетилгалактозаминидазу α -AlNaGal;

- использование штамма-продуцента *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal позволяет получать при биосинтезе большое количество полноразмерной рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal;

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

Литература

1. Naundorf A., Ajisaka K. Purification of α -N-acetyl-galactosaminidase from *Aspergillus niger* and its use in the synthesis of GalNAc- α -(1→O)-serine // *Enz. Microbial. Technol.* - 1999. - Vol.25, N 6. - P.483-488.

2. Clausen H., Nakomori S.-i. ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution // *Vox Sang.* - 1989. - Vol.56, N 1. - P.1-20.

3. Hata J., Dhar M., Mitra M., Harmata M., Haibach P., Sun P., Smith D. Purification and characterization of N-acetyl- α -D-galactosaminidase from *Gallus domesticus* // *Biochem. Int.* - 1992. - Vol.28, N 1. - P.77-86.

4. Hsieh H.Y., Mitra M., Wells D.C., Smith D. Purification and characterization of α -N-acetylgalactosaminidase from *Clostridium perfringens* // *IUBMB Life.* - 2000. - Vol.50, N 2. - P.91-97.

5. Hoskins L.C., Boulding E.T., Larson G. Purification and characterization of blood group A-degrading isoforms of α -N-acetylgalactosaminidase from *Ruminococcus torques* strain IX-70 // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol.272, N 12. - P.7932-7939.

6. Kadowaki S., Ueda T., Yamamoto K., Kumagai H., Tochikura T. Isolation and characterization of a blood group A substance-degrading α -N-acetylgalactosaminidase from an *Acremonium* sp. // *Agric. Biol. Chem.* - 1989. - Vol.53, N 1. - P.111-120.

7. Cheng Yu Y.U., Hua X.U., LiSheng W., JianGeng Z., YangPei Z. Human RBCs blood group conversion from A to O using a novel α -N-acetylgalactosaminidase of high specific activity //

Chinese Science Bulletin. - 2008. - Vol.53, N 13. - P.2008-2016.

8. Бакунина И.Ю., Кульман Р.А., Лихошерстов Л.М., Мартынова М.Д., Недашковская О.И., Михайлов В.В., Елякова Л.А. α -N-Ацетилгалактозаминидаза из морской бактерии *Arenibacter latericius* КММ 426Т, устраняющая групповую специфичность А-эритроцитов // Биохимия. - 2002.- Т.67, N 6. - С.830-837.

9. RU 2141526 C1, 20.11.1999.

10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2bd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Формула изобретения

1. Плазмида 40NaGal размером 7489 пар оснований (п.о.), определяющая синтез рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы морской бактерии *Arenibacter latericius* 426^T, ВКМ В-2137Д (α -AlNaGal), и характеризующаяся наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмента ДНК размером 1299 п.о., содержащего химерный ген, состоящий из структурной части гена α -AlNaGal, адаптированной по N-концу для экспрессии в клетках *E.coli*, и нуклеотидов, кодирующих специфические последовательности для протеазы TEV (SEQ ID N 1).

2. Штамм *E.coli* Rosetta(DE3), трансформированный плазмидой 40NaGal по п.1, - продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal.

3. Способ получения рекомбинантной N-ацетилгалактозаминидазы α -AlNaGal, 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 протеазой TEV, далее выделяют целевой продукт гель-фильтрацией.

Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

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

<120> Плазмида 40NaGal, определяющая синтез α -N-ацетилгалактозаминидазы α -A/NaGal, штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/40NaGal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной α -N-ацетилгалактозаминидазы α -A/NaGal, и способ ее получения.

<160> 1

<210> 1

<211> 1310

<212> ДНК

<213> *Arenibacter latericius* 426T ВКМ В-2137Д

<223> Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды 40NaGal, фланкированная сайтами рестрикции NcoI и SalI, содержащая последовательность структурного гена α -A/NaGal, соответствующую открытой рамке считывания для белка α -A/NaGal, и две специфичные последовательности для протеазы TEV

Sal I

195	CAGCTGTGGG	ACTTTTATTT	CTAAAAGCGA	ATGTTATAGA	TTACCACGTC	ACCAGAAGGT
	GTCTGACACCC	TGAAAATAAA	GATTTTTCGCT	TACAATATCT	AATGGTGCAG	TGGTCTTCCA
255	AAAAGGAGAT	CATTTTAGAC	CTTTGAGAAC	ACCACGAGGT	AAAACACGAT	GACTTTGAAG
	TTTTCSCTCTA	GTAAAATCTG	GAAACTCTTG	TGGTGCTCCA	TTTTGTGCTA	CTGAAACTTC
315	TGAATTCCAT	GGTTGCCGTG	AGGTTATTGT	TGGAAGTATA	TGCAAAACTA	GATTACCAAG
	ACTTAAGGTA	CCAACGGCAC	TCCAATAACA	ACCTTCATAT	ACGTTTTGAT	СТААТGGTTC
375	AGGAAATGCG	TCTGTAAGAT	GTTAAGACAT	TTCGTAGTAT	TTCAGGTAAG	GTGGTACAGG
	TCCTTTACGC	AGACATTCTA	CAATTCTGTA	AAGCATCATA	AAGTCCATTC	CACCATGTCC
435	CGGGTAAAAA	GATCTGTCAA	GAGGATTAGA	TTCCATATTT	CCTACGAGTA	TGAAAAGCAT
	GCCCATTTTT	CTAGACAGTT	CTCCTAATCT	AAGGTATAAA	GGATGCTCAT	ACTTTTCGTA
495	TTAGAATCGT	TCAACGAGAG	GAACACGGGT	ACTCACTACT	AGAAATCCTG	GAGGAAGTTG
	AATCTTAGCA	AGTTGCTCTC	CTTGTGCCCA	TGAGTGATGA	TCTTTAGGAC	CTCCTTCAAC
555	TGGTGGAAGA	TATCGCTAAG	AACAACCCTT	CGGAACGTAT	CATGGAAACC	AAGGAACATA
	ACCACSTTCT	ATAGCGATTG	TTGTTGGGAA	GCCTTGCATA	GTACSTTGG	TTCSTTGTAT
615	ATСТААТАСА	GACCACATAC	CAGATCCCGA	TCAAAGTAGG	GTAACATGGT	AATATCAAGA
	TAGATTATGT	CTGGTGTATG	GTCTAGGGCT	AGTTTCATCC	CATGTACCA	TTATAGTTCT
675	TGGTTCTCAT	CAAAAGTGTT	ATCTCCATAA	TTATAGTGGA	GGAAATATCA	GGTTGACCAA
	ACCAAGAGTA	GTTTTACAA	TAGAGGTATT	AATATCACCT	CCTTTATAGT	CCAАCTGGTT
735	GGTAAATACT	AGTCGACCCT	TTAAAAGAG	TCGCATATTA	ACAGATGGGG	AACGTCCACT
	CCATTTATGA	TCAGCTGGGA	AATTTTTCTC	AGCGTATAAT	TGTCTACCCC	TTGCAGGTGA
795	CSTTTTTCTT	AAATATTTGA	ATTTCAATAG	AAGAGGAGAT	CGATTTAAGT	ATATGACCCG
	GGAAAAGAA	TTTATAAACT	TAAAGTTATC	TTCTCCTCTA	GCTAAAATCA	TATACTGGGG
855	TTGTCCAGGA	TTTGGTACAC	ATCCTATATT	TAATGGTAAA	GATACACGCA	TCACACCACA
	AACAGGTCTT	AAACCATGTG	TAGGATATAA	ATTACCATT	CTATGTGCGT	AGTGTGGTGT
915	TGCGGTTCTG	GGACATGGCG	CTAGTTGAAC	CAAGTAGACC	GGAGAATTAA	GCАСТTATAT
	ACGCCAAGAC	CCTGTACCGC	GATCAACTTG	GTTCACTCTG	CCTCTTAATT	CGTGAATATA
975	CSTTCGGAGA	GGCАCАТТТТ	CGAGTGGATA	TTGTGGAACA	GATGTGTACA	AATTTATATC
	GGAAGCCTCT	CCGTGTAAAA	GCTCACCTAT	AACACCTTGT	CTACACATGT	TTAAATATAG

1035 TTCGAGTAGA GATGGTATCA ATTGTAAAAG GTAGTAGTAT GTCACGAAGA CCCAAAAAAG
 AAGCTCATCT CTACCATAGT TAACATTTTC CATCATCATA CAGTGCTTCT GGGTTTTTTC

1095 TCTTCATAGA TATTAGAGGG TGTAAGAAG TTATCAGTCA CGATTTCCGT GAAGATGTTT
 AGAAGTATCT ATAATCTCCC ACATTTCTTC AATAGTCAGT GCTAAAGGCA CTTCTACAAA

1155 TTGTACGCGA GGAGAAAAGT ATCGAAGTTA TCGGTATCCT CGTACATTAA AGGTTCCCTCA
 AACATGCGCT CCTCTTTTCA TAGCTTCAAT AGCCATAGGA GCATGTAATT TCCAAGGAGT

1215 TGATTGCTTT TGACGTAGCC CGAAAAGGGA AAAGTTGTAA AAGAAGGTCA GCAAAGGGG
 ACTAACGAAA ACTGCATCGG GCTTTTCCCT TTTCAACATT TTCTTCCAGT CGTTTTCCCC

1275 AAACCATATA TTAAAATATA AAACCACTGC TCATGGGAAT GGTAAGAGAA ACGTAGATAG
 TTTGGTATAT AATTTTATAT TTTGGTGACG AGTACCCTTA CCATTCTCTT TGCATCTATC

1335 TCGTCTAGAA ACTCGTAATA GGAGTATTTT TAGTCTTTAC CGTTGATGAA GCCATGGAAG
 AGCAGATCTT TGAGCATTAT CCTCATAAAG ATCAGAAATG GCAACTACTT CGGTACCTTC

1395 TTATCTTCGC TAAACTACTC GCACTGGTCT TGGTGCTCGT GGATGGGGTT ATTTCCGTGT
 AATAGAAGCG ATTTGATGAG CGTGACCAGA ACCACGAGCA CTTACCCCAA TAAAGGCACA

1455 AAAATGACAC AGGTTAAATC CTCGTCTTTT TGGCGGGTAC ATGAATCGGG GTGGGACTTT
 TTTTACTGTG TCCAATTTAG GAGCAGAAAA ACCGCCCATG TACTTAGCCC CACCCTGAAA

1515 TATTTCTAAA Nco I
 ATAAAGATT TCCATGG

