



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(51) SU (11) 1523055 A3

(51) 4 C 12 N 15/00, 9/78

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 4002500/30-13
(22) 03.01.86
(31) P 3500184.4
(32) 04.01.85
(33) DE
(46) 15.11.89. Бюл. № 42
(71) Берингер Маннхайм ГмбХ (DE)

(72) Гюнтер Шумахер, Петер Букель
и Клаус Бокамп (DE)
(53) 575.224.2.577.2(088.8)
(56) Archives of Biochem and Biophys,
1977(1976), 508-515.
US № 4420562, кл. C 12 N 9/78,
1983.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* И *PSEUDOMONAS*,

PUTIDA - ПРОДУЦЕНТОВ КРЕАТИНАМИДИНО-
ГИДРОЛАЗЫ

(57) Изобретение касается генетической инженерии, а именно получения креатинамидиногидролазы в штаммах бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas putida*. Цель изобретения - получение штаммов, конститутивно продуцирующих креатинамидиногидролазу. Выделяют ДНК из *Pseudomonas putida*, расщепляют эндонуклеазой *EcoRI*, фрагмент размером 5,8 кВ обрабатывают эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuII* и получают фрагмент размером 2,2 кВ, который клонируют в расщепленный эндонуклеазой вектор, трансформируют в штамм *E.coli* DSM 2102 и *P.putida* DSM 2106. 2 табл.

Изобретение относится к генетической инженерии и касается получения креатинамидиногидролазы в штаммах бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas putida*.

Цель изобретения - получение штаммов, конститутивно продуцирующих креатинамидиногидролазу.

Выделяют ДНК из *Pseudomonas putida*, расщепляют эндонуклеазой *EcoRI* с выделением фрагмента размером 5,8 кВ, обрабатывают его эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuII* и получают фрагмент размером 2,2 кВ, который клонируют в расщепленный вектор, трансформируют в соответствующий *E.coli* и *P.putida*.

Пр и м е р. Выделяют хромосомную ДНК *Pseudomonas putida* DSM 2106 после

разрушения клеток, наматывания ДНК на стеклянную палочку после двух обработок фенолом и осаждения этанолом, растворяют ее в концентрации 600 мкг/мл.

10 мкг хромосомной ДНК обрабатывают 5 единицами *EcoRI* и анализируют степень переваривания в агарозном геле.

10^{10} бактерий штамма *E.coli* ED DSM 2102 инкубируют в присутствии $5 \cdot 10^8$ фагов Шарон 10 в течение 20 мин при 37°C и затем оставляют для роста до начала лизирования бактерий в 500 мл полной среды с последующим выделением фага.

10 мкг Шарон 10 ДНК полностью расщепляют 1 мг *EcoRI* эндонуклеазы, разрезанную хромосомную ДНК *Pseudo-*

(51) SU (11) 1523055 A3

РПФ-К

monas putida инкубируют с 3 г расщепленного эндонуклеазой *EcoRI* ДНК фага Шарон 10 с 40 единицами фермента Т4 ДНК-лигазы. Упаковку связанных ДНК-фрагментов головные и хвостовые протеины фага λ производят в пробирке. Около 0,5 μ г связанных λ и *Pseudomonas* ДНК инкубируют посредством исходной смеси, в упаковке в пробирке, через 60 мин добавляют 0,5 мл SM буферного раствора, 1/200 объема (2,5 μ л) исходной смеси в упаковке инкубируют при помощи 200 л выдержанного в течение ночи штамма *E. coli* (в 10^{-2} молярном сульфате магния) 10 мин при 37°C. Суспензию бактерий смешивают затем с 3 мл LB-агарозы (0,8%) и выливают на LB-пластины. На 1 μ г введенной ДНК получают около 15^{-5} фаговых отверстий (тромбоцитов).

Для идентифицирования фагов, которые содержат кодирующий креатиназу ген, применяют иммуотест с ферментом. Индикаторная система состоит из 6 мг/мл тетраметилбензидина, 20 мг/мл диоктилнатрийсульфосукцината и 0,01% H_2O_2 в 6%-ной желатине. На 1000 тромбоцитов устанавливают два положительных сигнала.

Из пяти положительных в иммуотесте с ферментом тромбоцитов получают препарат фагов - ДНК. Расщепление пяти различных ДНК посредством *EcoRI* позволило выявить ДНК-полосу во всех пяти фагах ДНК 5,8 кВ.

Приблизительно 5 μ г этого *EcoRI*-фрагмента расщепляют при использовании *PvuII* эндонуклеазы и выделяют фрагмент размером 2,2 кВ. Образующиеся фрагменты ДНК разделяют в низкоплавленном геле агарозы по их размеру и выделяют фрагмент *EcoRI* - *PvuII*. Выделение ДНК-фрагментов из низкоплавленных гелей агарозы производят вырезанием соответствующих полос, переводом в пробирку (трубочку Эппендорфа) и смешиванием приблизительно с двукратным объемом воды, затем инкубируют при 65°C до тех пор (от 5 до 10 мин), пока не расплавится агароза, пробу встряхивают в течение короткого времени и потом интенсивно встряхивают с половиной объема фенола (нейтрализованного 10 ммол ТРА-НС1 с рН 7,5 и 1 мм EDTA, TE). Фазы разделяют центрифугированием за 10 мин при 15000 g и верхнюю водную фазу снова экстрагируют встряхиванием с фенолом. После центрифугирования в течение 10 мин при 15000 g верхнюю фазу дважды экстрагируют путем встряхивания с простым эфиром (по 1 мл), простой эфир выпаривают при 65°C и ДНК осаждают при помощи 1/10 объема 3 М ацетата натрия с рН 7,2 и 2,5-кратного объема этанола при 20°C. ДНК осаждают центрифугированием за 10 мин при 15000 g, сушат в вакууме и вводят в 10 μ л TE. Все описанные дальнейшие выделения фрагментов производят аналогично.

Около 4 μ г pBR 322 ДНК расщепляют посредством *EcoRI* и *PvuII* и выделяют фрагмент размером 2,3 кВ. 0,2 μ г этого pBR 322-фрагмента инкубируют в течение ночи в присутствии пяти единиц Т4 ДНК-лигазы и 0,5 μ г *EcoRI* - *PvuII*-фрагмента размером 2,2 кВ из описанных λ -фагов. Полученную плазмиду называют pBT-3-2, она кодирует в *E. coli* биологически активную креатиназу.

Пример 2. Фрагмент ДНК, кодирующий креатиназу из плазмиды pBT-3-2, обрабатывают нитрозогуанидином. Выделяют плазмидную ДНК после лизирования клеток при помощи метода CSCI-этилбромид. Клетки штамма *E. coli* ED 8654 трансформируют при помощи плазмидной ДНК и помещают на пластинах полной среды (LB), содержащих 20 μ г/мл ампициллина. После инкубации в течение ночи при 37°C на LB-пластины помещают нитроцеллюлозную фильтровальную бумагу. После инкубации в течение 12-18 ч при 37°C нитроцеллюлозный фильтр с колониями снимают и переводят в стеклянную чашку Петри (ϕ 20 см), в которую был добавлен 1 мл смеси хлороформа с толуолом (1:1). Инкубацию проводят за 20 мин при 37°C. Затем нитроцеллюлозный фильтр накладывают на индикаторную агарозную пластину таким образом, чтобы возникал прямой контакт между клетками и индикаторной пластиной.

Цветная реакция происходит в зависимости от времени и количества синтеза рованной в отдельных клонах креатиназы. Из описанной системы фильтрования выделяют клон ЕД с плазмидой pBT 2a-1, DSM 3143. Эта плазмида кодирует креатиназу, которая составляет около 50% растворенного протеина клеток.

Как альтернативу к описанному прямому NC-мутагенезу увеличение уровня

экспрессивности креатиназы можно достигнуть с помощью *lac*-промотора (последний можно выделять из имеющихся в продаже плазмид, например *pUC-плазмид*). Для этого плазмиду *pBt-3-2* обрабатывают *EcoRI*-эндонуклеазой, обрабатывают эндонуклеазой *Bal 31* таким образом, что удаляют около 10-100 вр с каждой стороны. Затем *lac*-промотор при помощи фермента *T4*-лигазы, связывающего концы, вводят в укороченную плазмиду *Bt 3-2*. Эту ДНК мутагенизируют с нитрозогуанидином, после этого применяют для трансформации штамма *ED* и клоны испытывают на высокую экспрессивность гена.

Тест-принцип:

креатинамидино-

Креатин + H_2O $\xrightarrow{\text{гидролаза}}$ саркозин + мочевины

Sarc - CD

Саркозин + O_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{POD}}$ глицин + формальдегид + H_2O

H_2O_2 + 4-ААР + EST \longrightarrow краситель + $2H_2O$

Состав системы фильтрующей активности креатинамидиногидролазы показан в табл.1.

Указанные в пунктах 1-7 реактивы растворяют и смешивают с одинаковым объемом низкоплавкой агарозы (2%), 6 мл выливают в чашку Петри, пластины можно хранить около 2 недель при 4°C в темноте.

Пример 3. Для клонирования и обеспечения экспрессивности клонированной креатинамидиногидролазы в *Pseudomonas putida* применяют плазмиду *RSF 1010*. *RSF 1010* линеаризируют посредством *PstII* и из плазмиды *pACUC 177* после *NAE11* - расщепления выделяют 1,4 кВ-фрагмент, 0,2 μ г *RSF 1010* ДНК связывают с 1 μ г *NaE II*-фрагмента при использовании *T4*-лигазы, получающаяся плаزمида представляет собой *pBT 306,1 RSF 1010* и производные этой плазмиды отличаются широким диапазоном хозяина и пригодны, например, для *Pseudomonaden* и *E.coli*. Плазмиду *pBT 2a-1* расщепляют посредством *PvuI* и *PvuII*, выделяют 2,8 кВ-фрагмент. *pBT 306,1* плазмиду расщепляют посредством *PvuI* и *SmaI* и выделяют фрагмент размером 10 кВ. 0,5 μ г векторной ДНК связывают с 0,5 μ г *Pvu I-PvuII*-фрагмента. *E.coli ED* трансформируют

Упомянутая индикаторная агарозная пластина представляет тест-систему для отбора активности, принцип которой состоит в том, что креатин расщепляют ферментами креатинамидиногидролазы и сарказиноксилазы на образования H_2O_2 через пероксидазу в $1/2 O_2$ и H_2O и осуществляет реакцию кислорода с системой цветного индикатора, например, из 4-аминоантипирин (4ААН) и N-этил-N-(сульфозтил)-3-метиланилина, соли EST. Образуется голубовато-фиолетовое окрашивание, которое при избытке ферментов сарказиноксилазы и пероксидазы представляет степень синтезированной в колониях креатинамидиногидролазы.

и идентифицируют кодирующие креатиназу клоны при помощи отбора активности на пластинах. Из одного из положительных клонов получают по методу с *CSCI*-этилбромидом плазмидную ДНК. Плазмиды имеет название *pBT 306,16, DSM 3149 P*. Трансформируют плазмидную ДНК в *Pseudomonas putida 2440*.

При помощи фильтрования с отбором активности на пластинах идентифицируют положительные клоны. Это возможно у *Pseudomonas putida 2440*, хотя этот штамм содержит хромосомнокодированную креатинамидиногидролазу, так как экспрессивность кодированной плазмидной креатинамидиногидролазы проявляется структурно. Этот отличительный признак позволяет проводить различие между кодированной хромосомой и кодированной плазмидной креатинамидиногидролазой.

Пример 4. Определение активности креатинамидиногидролазы производят обнаружением образованных в результате реакций с уреазой ионов аммония с тест-комбинацией "мочевина".

Дикий тип *Pseudomonas putida 2440* для определения активности креатинамидиногидролазы инкубируют при 30°C в течение ночи в В-среде (5 мл), которая содержит 1% креатина.

Клетки собирают центрифугированием и промывают один раз в 50 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7,5. Клетки в первоначальном объеме вводят в фосфатный буферный раствор (50 мМ с pH 7,5) и растворяют обработкой ультразвуком (4х30 с).

Выращивание и растворение клеток, которые содержат плазмиду, кодирующую креатинамидиногидролазу, проводят описанным способом, с тем исключением, что среда не содержит креатина для индукции и что отбирают с добавкой ампициллина (20 мкг/мл для плазмиды pBT 2a-1) или стрептомицина (20 мкг/мл для плазмиды pBT 306.16). Рост культур происходит для *Pseudomonas putida* при 30°C, для *E.coli* - при 37°C.

Данные показывают, что в результате клонирования креатинамидиногидролазы в *E.coli* бактерии получают новое свойство синтезировать креатинамидиногидролазу и эта экспрессивность в противоположность исходному штамму *Pseudomonas putida* проявляется структурно как для *E.coli*, так и для *Pseudomonas putida*. Благодаря мутагенезу ДНК, кодирующих креатинамидиногидролазу, можно достигнуть особенно высокой экспрессивности.

В *E.coli* ED/pBT 2A-1 DSM 3143 активность составляет 500 ед./г биомассы (влажной), удельная активность 4,5 ед./мг протеина. Так как удельная активность высокоочищенного протеина составляет 9 ед./мг, это означает, что креатинамидиногидролаза в *E.coli* составляет 50% растворимого протеина. Анализ сырого экстракта в DSS-геле показывает, что креатинамидиногидролаза представляет основную полосу фракции растворимого протеина.

Пример 5. Для культивирования в ферментере применяют три различных системы хозяина *E.coli*, а именно *E.coli* W 3350, *E.coli* ED 8654 и *E.coli* CNI. Плазмиду pBT 2a-1 трансформируют в соответствующие компетентные клетки. Отдельные колонии культуры выращивают в DYT-среде, которая содержит 20 мкг/мл ампициллина, в течение ночи при 37°C. Ферментационную среду (DYT) засевают предварительной культурой (инокулят 1%) и без отбора на содержание плазмиды оставляют на 20-30 ч при 37°C для роста. Активность креатинамидиногидролазы после 25 ч инкубирования состав-

ляет около 600 ед./г сырой массы или 4,5 ед./мг протеина.

Плазмиду pBT 306.16 трансформируют в клетки *Pseudomonas putida* штамма 2440, причем получают *P. putida* DSM N3147.

После очистки отдельных колоний инкубируют культуру в DYT-среде, которая содержит 200 мкг/мл стрептомицина при 30°C в течение ночи. Ферментационную среду (DYT) засевают (инокулят 1%) и оставляют культуру для роста на 20-30 ч при 30°C. Активность после 25 ч составляет около 220 ед./г сырой массы, активность 1,8 ед./мг протеина.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения штаммов бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas putida* - продуцентов креатинамидиногидролазы, заключающийся в том, что хромосомную ДНК из *Pseudomonas putida* DSM 2106 и ДНК фага Шарон 10 обрабатывают эндонуклеазой Eco.RI, лигируют полученные фрагменты, упаковывают гибридные ДНК в присутствии 2-х протеинов оболочки фага, трансдуцируют полученными гибридными фагами клетки *E.coli* DSM 2102, которые предварительно обрабатывают в течение ночи 0,2%-ным раствором мальтозы и растворяют в 0,1 М/л MgSO₄, далее идентифицируют фаги, экспрессирующие креатинамидиногидролазу с помощью индикаторной системы, содержащей 6 мг/мл тетраметилбензидина, 20 мг/мл диоктилнатрийсукцината и 0,01% H₂O₂ в 6%-ной желатине, выделяют фаги, дающие положительную реакцию, ДНК этих фагов обрабатывают эндонуклеазой Eco.RI с последующим выделением фрагмента размером 5,8 кВ, которые обрабатывают эндонуклеазой PvuII, выделяют Eco.RI - PvuII - фрагмент размером 2,2 кВ, который лигируют с расщепленным Eco.RI и PvuII вектором pBR 322, полученной рекомбинантной ДНК трансформируют клетки бактерий *E.coli* DSM 2102, отбирают клетки, конститутивно продуцирующие креатиназу, полученные клетки обрабатывают 25 мг/мл нитрозогуанидином, выделяют плазмидную ДНК, которой трансформируют клетки *E.coli* DSM 2102, отбирают бактерии, содержащие плазмиду pBT 2a-1, полученной плазмидной ДНК трансформируют *E.coli* DSM 2102 и обрабатывают ее

эндонуклеазами PvuI и PvuII, выделяют фрагмент размером 2,8 кВ, который лигируют с фрагментом PvuI - SmaI размером 10 кВ вектора pBT 306,1, полученного в результате обработки плазмиды pSE 1010 и лигирования с

фрагментом 1,4 кВ HaeII плазмиды pACUC177, полученными рекомбинантными ДНК трансформируют клетки *P.putida* DSM 2440 и выделяют клоны, конститутивно продуцирующие креатинамидиногидролазу.

Т а б л и ц а 1

Но- мер	Состав	Содержание	Концентрация
1	Креатин	10 мм	Конечная
2	NaNO ₃	0,5 мм	
3	Tris HCl с pH 7,8	20 мм	То же
4	Саркозиноксилаза	5 ед./мл	- " -
5	Пероксидаза	2,5 ед./мл	- " -
6	4 м ААН	0,25 мг/мл	- " -
7	EST	1,5 мг/мл	- " -

Т а б л и ц а 2

Креатинамидиногидролаза в *Pseudomonas putida* и *E.coli*

Штамм/плазмид	Актив- ность ед/л	Выращивание
1 <i>Pseudomonas putida</i> 2440	1	- креатин
2 То же	250	+ креатин
3 <i>Pseudomonas putida</i> pBT 306.16	1800	- креатин
4 <i>E. coli</i> ED	-	± креатин
5 <i>E. coli</i> ED/pBT 3-2	30	- креатин
6 <i>E. coli</i> ED/pBT 2a-1	2800	- креатин

Редактор М.Петрова

Составитель Н.Кузенкова

Техред Л.Сердюкова

Корректор О.Кравцова

Заказ 6985/59

Тираж 501

Подписное

ВНИИИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101

