



УКРАЇНА

. &gt; „12993

C1

(505 C12\_N\_1\_5/26j CJ2.N 9/78

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КРЕАТИНАМІДИНОГІДРОЛАЗИ

1

(20)96240075,28.10.93

(21)4355715/SU

(22).11.05.88

**(24)28.02.97**

(31)P3715841.4

**(32) 12.05.87**

(33) DE

(40)28.02.97. Бюл. № 1

(56) DE N 3500184, кл. C 12 N 15/00, 1986  
(прототип).

(72) Гюнтер Шумахер (DE). Петер Букель(ОЕ)

(73) Берінгер Маннхайм ГМБХ (DE)

(57) Способ получения креатинамидиногидролазы, предусматривающий конструирова-

ние рекомбинантной плазмидной ДНК. кодирующей креатинамидиногидролазы. трансформацию полученной ДНК штамма бактерий *Escherichia coli*, культивирование трансформированного штамма, выделение и очистку целевого продукта, о т л и ч а ю - щийся тем, что конструируют рекомбинантную плазмидную ДНК pBT 109 или pBT 119, трансформации подвергают штамм *E. coli* DSM 4105, или DSM 4106, при этом плазмидой трансформируют штамм *B. coli* DSM 4105, а плазмидой pBT 119 - штамм *E. coli* 4106.

Изобретение относится к генетической инженерии и касается получения креатинамидиногидролазы, которая стабильнее, чем нативный фермент, и поэтому более пригодна для определения содержания креатинина в сыворотке, плазме или моче.

Фермент креатинамидиногидролаза ЕС 3.5.3.3 находит промышленное применение для определения креатинина. Его используют для диагноза заболеваний почек, при которых в сыворотке или моче содержание креатинина отклоняется от таковых здорового организма.

Известны микроорганизмы, которые при индукции за счет креатина в состоянии вырабатывать креатинамидиногидролазу в достаточном для переработки количестве

Однако достигаемый выход и стоимость фермента представляют собой лимитирующий фактор для промышленного применения фермента.

Известен также способ получения данного фермента, при котором удалось выделить ген, кодирующий креатинамидиногидролазу из *Pseudomonas putida*, клонировать его pBP 322. После трансформации микроорганизмов вида *E. coli* или полученной рекомбинантной ДНК удалось получить конститутивно креатинамидиногидролазу.

Этот способ с помощью генной инженерии креатинамидиногидролазы эффективнее и легче в осуществлении, чем выделение из индуцированного, не содержащего никакого плазмиды микроорганизма.

Однако получаемый с помощью данного способа фермент естественного типа обладает<sup>е</sup> только ограниченной детергентной и термической стабильностью и, таким образом, оптимально непрлогоден для использования в клиническом тест-і пособе.

Цель изобретения - пОк-мшение стабильности фермента.

C &gt;

Ю

O ∞

O

Получены креатинамидиногидролазы, которые катализируют реакцию:

Креатин + H<sub>2</sub>O → саркозин + мочеви́на.

В отличие от нативного фермента в полученном белке происходит замена аминокислоты в положении 109. Аминокислота аланин заменяется валином. Полученный фермент обладает намного лучшей стабильностью, чем нативный фермент.

Сконструированы плазмиды pBT 109 и 10 pBT 119, содержащие ген креатинамидиногидролазы, в котором произошла аминокислотная замена в положении 109, а в случае pBT 119 также в положении 355 заменена Val и Met. Благодаря секвенированию pBT 119 15 установлено, что в положении 1063 последовательности в кодирующей нити G заменен из A(G → A), так что триплет GTG превращен в ATG. В результате трансформации штаммов реципиентом полученными плазмидами 20 созданы штаммы E.coli, DSM 4105, содержащие плазмиду pBT 109, и штамм E.coli, DSM 4106, содержащий плазмиду pBT 119, конститутивно экспрессирующие креатинамидиногидролазу. 25

Пример. Клетки E.coli DSM 4105, E.coli DSM 4106 и для сравнения E.coli DSM 3143 выращивают в течение ночи в ферменторах на 1 л.

Среда - полная (дрожжи, пентоновый 30 экстракт); 0,4% глюкозы; 100 ммоль/л фосфатного буфера.

После 15-минутного центрифугирования при 8000 об/мин клетки переводят в удобную для переработки форму в French- 35 прессе и креатинамидиногидролазу очищают путем фракционирования через молекулярное сито (Софакрил S 200). Пол-

ученные ферменты инкубируют при указанных в табл. 3 условиях и затем осуществляют определение фермента при применении тест-комбинации "Мочевина" (ВМ определение № 124770, табл. 4).

Табл. 4 воспроизводит характер стабильности предлагаемых в изобретении мутантов креатинамидиногидролазы по сравнению с ферментом полученным способом-прототипом при 37°C, причем тест-смесь 1 из тест-комбинации "креатинин-РАР" (ВМ - определение № 839 434); исходная активность: 12У(мл)=100%

Результаты сравнения констант Michaelis (K<sub>m</sub>) при 37°C, 0,1 моль/л Трио-НCl, pH 8,0 (оптимальные тест-условия) приведены в табл. 2.

Тест-условия: фосфатный буфер 20 ммоль/л; pH 8,0;

Нативная креатинамидиногидролаза 1,05 мг белка/мл (8,0 У/мг).

Полученная креатинамидиногидролаза 1,10 мг белка/мл (8,7 У/мг), (аминокислота 109=Val).

Фермент инкубируют при указанных тест-условиях и затем осуществляют определение фермента при тест-комбинациях "Мочевина" (ВМ определение № 124770).

Полученный фермент обладает большей стабильностью и с помощью данной креатинамидиногидролазы можно избежать потерь активности фермента при определении креатинина и осуществлять надежно такие определения также через более длительные промежутки времени, на основании улучшенных свойств также возможно уменьшение количества фермента в креатинин-тесте.

Т а б л и ц а 1

Стабильность полученной креатинамидиногидролазы по сравнению с известным ферментом

Креатинамидиногидролаза из E.coli (кодирующий плазмид)	Остаточная активность, %, спустя, мин			
	15	30	45	60
DSM3143(pBT2a-1 DSM 3148 P)	69	51	39	27
DSM 4105 (pBT 109 DSM 4108 P)	96	90	84	84
DSM 4106 (pBT 119 DSM 4107 P)	<b>102</b>	102	102	102

Т а б л и ц а 2

## Константа Михаэлиса ферментов

Креатинамидиногидролаза из E.coli (кодирующий плазмид)	K <sub>m</sub> , ммоль/л
DSM3143(pBT2a-1 DSM3148P)	25
DSM 4105(pBT2109 DSM 4108 P)	20
DSM4106(pBT119DSM4107P)	16

Т а б л и ц а 3

## Определение остаточной активности фермента при оптимальных условиях при различных температурах

Температура, °C	Остаточная активность, %, креатиназы и инкубация, мин					
	(DSM3143)			(DSM4105)		
	30	60	120	30	60	120
37	100	86	80	100	96 73 2	90
42	87 1	36	130	84	°	63
47	0	0.4		42 3		0
52						

## Определение фермента при 37°C

Т а б л и ц а 4

Время мин	Креатинамидиногидролаза α- типа (патент ФРГ № 3500184 A1) (DSM3143) Сравнение	Креатинамидиногидролаза мутанта (аминокислота 109 = v a l) (DSM 4105) Согласно изобретению	Тест-условия
0	3,3 V/мл (активность = 100%)	3,0 V/мл (активность - 100 %)	Тест-смесь 1 на тест-комбинации Креатин-PAF (BM 839434)
15	1,9 V/мл (остаточная активность - 59%)	3,0 V/мл (остаточная активность •* 100%)	
30	0,6 V/мл (остаточная активность = 18%)	2,7 V/мл (остаточная активность - 91%)	
60	0,2 V/мл (остаточная активность - 6%)	2,5 V/мл (остаточная активность)	
0	3,3 V/мл (активность - 100%)	3,0 V/мл (активность - 100%)	
15	0,7 V/мл (остаточная активность - 21%)	2,7 V/мл (остаточная активность - 91%)	
30	0,0 V/мл (остаточная активность « 0%)	2,7 V/мл (остаточная активность « 91%)	В 125 ммоль/л фосфатного буфера 1 детергент
60	0,0 V/мл (остаточная активность - 0%)	2.-1 V/мл (остаточная активность ш 71%)	

Примечание: ферменты инкубируют при указанных условиях и затем осуществляют определение фермента при применении тест-комбинаций "Мочевина" (BM определение Nk 124770)

12993

Упорядник	Техред М.Моргентал	Коректор М. Керецман
Замовлення 4093	Тираж Державне патентне відомство України, 254655, ГСП Ки!а»53, Львівська ля., 8	Підписне
Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна. 101		