



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1089119 A

3(50) C 12 N 9/38

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

РПФК

(21) 3516135/28-13

(22) 29.11.82

(46) 30.04.84. Бюл. № 16

(72) В.А.Кордюм, С.И.Черных  
и Т.В.Сорочинская

(71) Институт молекулярной биологии  
и генетики АН УССР

(53) 612.015.1 (088.8)

(56) 1. Доклады АН СССР, 1980, № 252,  
№ 4, с. 995-998.

2. Авторское свидетельство СССР  
по заявке № 3435949/13,  
кл. С 12 N 9/38, 11.02.83 (прототип).

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  $\beta$ -ЛАКТАМАЗЫ  
путем культивирования продуцента  
*E.coli*, содержащего плазмиду pBR 322,  
с фагом, о т л и ч а ю щ и й с я  
тем, что, с целью повышения выхода  
 $\beta$ -лактамазы, фаг  $\lambda$  ApQ $\bar{R}$  вносят в  
культуру *E.coli* W 3101 rec A<sup>-</sup>13<sup>sup</sup>,  
причем используют фаг  $\lambda$  ApQ $\bar{R}$  с  
множественностью от 1 до 20 фаговых  
корпускул на клетку.

(19) SU (11) 1089119 A



Изобретение относится к получению белковых продуктов, например ферментов из микроорганизмов, и может быть использовано для получения биологических активных веществ, в частности фермента  $\beta$ -лактамазы, из микроорганизмов в промышленных масштабах, а также для повышения биосинтеза продуктов рекомбинантных молекул ДНК плазмид при тестировании экспрессии последних.

Известен способ получения биологически активного вещества на основе многокопийных плазмид, содержащих ген, ответственный за синтез заданного продукта. Фрагмент ДНК с генами рестриктазы и метилазы EcoR II встраивают в мультикопийный вектор, который обеспечивает как увеличение количества копий рекомбинантной плазмиды до 10, так и более эффективную экспрессию клонированных генов ферментов, причем плазмидная ДНК обеспечивает повышенный синтез фермента в 3 раза по сравнению с исходным уровнем [1].

Недостатками данного способа является то, что после процесса амплификации антибиотики необходимо удалять из культуральной среды, поэтому является нетехнологичным.

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения  $\beta$ -лактамазы, включающий выращивание культуры *E. coli* с 600, содержащей плазмиду pBR 322 и последующее введение в эту культуру фага  $\lambda$  с 857 с мутациями в генах Q и R [2].

Недостатком известного способа является невысокий выход фермента.

Цель изобретения - повышение выхода  $\beta$ -лактамазы.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения  $\beta$ -лактамазы путем культивирования продуцента *E. coli*, содержащего плазмиду pBR 322, с фагом, фаг  $\lambda$  ArQ<sup>-</sup>R<sup>-</sup> вносят в культуру *E. coli* W3101 res A<sup>-</sup>13 sup<sup>o</sup>, причем используют фаг  $\lambda$  ArQ<sup>-</sup>R<sup>-</sup> с множественностью от 1 до 20 фаговых корпускул на клетку.

Способ осуществляют следующим образом.

С помощью фага  $\lambda$  переключают белковый синтез с бактериальной хромосомы на геном фага и геном плазмиды. При этом в составе генома

фага и в составе генома плазмиды содержится ген, отвечающий за синтез интересующего нас продукта. В частности используют фаг  $\lambda$ , содержащий в своем составе ген Ar, отвечающий на синтез фермента  $\beta$ -лактамазы, разрушающего антибиотики с  $\beta$ -лактамным кольцом, который по предлагаемому способу должен содержаться и в геноме плазмиды.

В качестве бактериальной культуры, содержащей плазмиду pBR 322 и подвергающейся заражению фагом  $\lambda$  с Ar-агентом, используют *E. coli* W3101 res A<sup>-</sup>13 sup<sup>o</sup>. Используют эту культуру из-за снижения частоты рекомбинации между гомологичными последовательностями фага  $\lambda$  и плазмиды pBR 322, имеющими место в виде Ar-гена. Мутация в res A-гене это условие выполняет.

Культуру *E. coli* W3101 res A<sup>-</sup>13 sup<sup>o</sup> с плазмидой pBR 322 выращивают до плотности  $1 \times 10^8$  клеток в 1 мл при 37°C и доводят до постоянной скорости роста, затем заражают фагом  $\lambda$  с Ar-геном в соотношении 10 фаговых корпускул на 1 бактериальную клетку, инкубируют 2,5-3 ч при 37°C, а затем инкубируют 14-15 ч при 28°C. Инкубирование культуры, зараженной фагом  $\lambda$ , при 28°C способствует замедлению лизиса клеток, так как оптимальной для развития фага является 37°C. Замедление лизиса клеток способствует накоплению  $\beta$ -лактамазы, для чего используют amber-мутации в фаговых генах Q и R. Ген Q является регуляторным геном, отвечающим за включение поздних генов фага, среди которых находится и ген R, продукт которого принимает участие в лизисе бактериальной оболочки. В результате в бактериальной культуре *E. coli* W3101 res A<sup>-</sup>13 sup<sup>o</sup>, содержащей плазмиду pBR 322, в течение 16 ч при 37°C синтезируется 13555 ед. активности  $\beta$ -лактамазы (за единицу активности принято наименьшее количество фермента, которое инактивирует  $10^6$  М пенициллина (60 ед.) за 1 ч при 37°C в фосфатном буфере pH 6,8-7,0). В этой же бактериальной культуре, не содержащей плазмиду pBR 322, но подвергавшейся заражению фагом  $\lambda$  ArQ<sup>am</sup>117 R<sup>am</sup>54 и инкубировавшейся 2,5-3 ч при 37°C,



а затем 14-15 ч при 28°C, синтезируется 227796 ед активности  $\beta$ -лактамазы в 1 мл культуральной жидкости. В бактериальной культуре *E. coli* W 3101 гес A<sup>-</sup>13 sup<sup>0</sup>, содержащей плазмиду pBR 322 и подвергавшейся заражению фагом  $\lambda$  ArQ<sub>am</sub> 177 R<sub>am</sub><sup>54</sup>, активность  $\beta$ -лактамазы после инкубирования 2,5-3 ч при 37°C, а затем 14-15 ч при 28°C, достигает 2 млн. ед. в 1 мл.

**Пример.** Культуру *E. coli* W 3101 гес A<sup>-</sup>13 sup<sup>0</sup> с плазмидой pBR 322 выращивают на среде "Аминопептид", разведенной 0,14 М раствором NaCl в соотношении 1:1 при 37°C на качалке до плотности  $1 \times 10^8$  клеток в 1 мл. Затем эту культуру заражают фагом  $\lambda$ , содержащим Ar-ген, а *amber*-мутации в генах Q и R, блокирующие лизис бактериальной клетки, что в свою очередь обеспечивает более длительное функционирование Ar-гена. Заражение осуществляют с множественностью 10 фаговых корпускул на 1 бактериальную клетку. Фаг получают следующим образом.

Лизогенную культуру, содержащую в составе своей хромосомы нужный нам фаг, в данном случае  $\lambda$  ArQ R

выращивают при 28°C на среде "Аминопептид" на качалке до плотности клеток  $1 \times 10^8$  в 1 мл. Затем эти клетки прогревают 20 мин при 43°C, в результате чего инактивируется фаговый репрессор благодаря *t<sub>s</sub>*-мутации в C1-гене, и фаг начинает развиваться по литическому пути, через 50 мин после прогрева (термоиндукции) при 43°C клетки лизируют, освобождая каждые 100-200 фаговых корпускул. Если плотность клеток была  $1 \times 10^8$  мл, то они образуют  $1-2 \times 10^{10}$  фаговых корпускул в 1 мл.

Заражение *E. coli* с плазмидой, выросшей до плотности  $1 \times 10^8$ , фагом с множественностью 10 означает, что например, к 10 мл культуры надо прилить 1 мл фаговой суспензии. После внесения фага культуру выдерживают 2,5-3 ч при 37°C, затем культуру, зараженную фагом, инкубируют при 28°C в течение 14 ч. Перенесение культуры с оптимальной температуры на пониженную способствует замедлению развития фага и более длительному функционированию Ar-гена. За это время в 1 мл суспензии накапливается до 2 млн. ед активности  $\beta$ -лактамазы.

Составитель В. Кузьмичев

Редактор Н. Ковалева Техред А. Кикемезей Корректор С. Шекмар

Заказ 2871/23

Тираж 522

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4

