



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **99211**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/06 (2006.01)

C12R 1/72 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 12885**

(22) Дата подання заявки: **01.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2015, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

Кушкевич Іван Васильович (UA)

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН,
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034 (UA)**

(54) СПОСІБ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО КОНСТРУЮВАННЯ **CYSK** МУТАНТІВ
СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ - СИНТЕТИКІВ ЦИСТЕЇНУ

(57) Реферат:

Спосіб молекулярно-генетичного конструювання **CysK** мутантів сульфатвідновлювальних бактерій - синтетиків цистеїну включає клонування гена **CysK** бактерій *Escherichia coli*, його трансфер у геном сульфатвідновлювальних бактерій, аналіз властивостей отриманих **CysK** мутантів. Додатково відображає алгоритм використання сульфатвідновлювальних бактерій для знешкодження гідроген сульфіду у кишечнику людини і тварин, а також у водному середовищі.

UA 99211 U

Корисна модель належить до галузі мікробіології, біотехнології, генетики, зокрема до способів молекулярно-генетичного конструювання штамів мікроорганізмів. Спосіб може використовуватися у наукових дослідженнях у біологічній науці, експериментальній медицині та ветеринарії.

Властивості *cysK* мутантів вивчені у бактерій *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium* (A. Wiater, D. Hulanicka Properties of *cysK* mutants of *Escherichia coli* K12 // *Acta Biochim. Pol.* - 1979-Vol. 26, - P. 21-28; A. Boronat, P. Britton, M. C. Jones-Mortimer Location on the *Escherichia coli* genome of a gene specifying O-acetylserine(thiol)lyase // *J. Gen. Microb.* - 1984. - Vol. 130. - P. 673-685; M.A. Becker, N.M. Kredich, G.M. Tomkins The purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase-A from *Salmonella typhimurium* II *J. Biol. Chem.* - 1969. - Vol. 244. - P. 2418-2427). Наявність *cysK* гена у мікроорганізмів забезпечує експресію ензиму О-ацетилсерин(тіол)ліази, що каталізує: синтез цистеїну, використовуючи гідроген сульфід як субстрат.

Сульфатвідновлювальні бактерії здійснюють дисиміліційне відновлення сульфату до гідроген сульфід. Останній є токсичною і мутагенною сполукою, що може спричинити різноманітні захворювання людини і тварин. Ці бактерії та продукти їх метаболізму (гідроген сульфід) часто виявляють під час кривавої діареї, болях у животі. Припускають, що вони, інтенсивно продукуючи гідроген сульфід, можуть спричинити втрату ваги, часту дефекацію, артрити, ревматичні захворювання, загальне нездужання, підвищення проникності кишечника, виразкові коліти (Kushkevych I. V. Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. II. The role in the diseases development / I. V. Kushkevych // *Studia Biologica.* - 2012. - Vol. 6, № 2. - P. 221-250).

Сульфатвідновлювальні бактерії не містять *cysK* ген, відповідно, не здатні експресувати ензим О-ацетилсерин(тіол)ліазу, утилізуючи токсичний гідроген сульфід до цистеїну.

Відомі лише такі дослідження *cysK* мутантів бактерій:

- Wiater A., Hulanicka D. Properties of *cysK* mutants of *Escherichia coli* K12 // *Acta Biochim. Pol.* - 1979-Vol. 26, - P. 21-28;

- Boronat A., Britton P., Jones-Mortimer M.C Location on the *Escherichia coli* genome of a gene specifying O-acetylserine(thiol)lyase // *J. Gen. Microb.* - 1984. - Vol. 130. - P. 673-685;

- Becker M.A., Kredich N.M., Tomkins G.M. The purification and characterization of O-acetylserine sulfhydrylase-A from *Salmonella typhimurium* II *J. Biol. Chem.* - 1969. - Vol. 244. - P. 2418-2427.

Недоліком вказаних аналогів є:

- Дослідження стосуються лише бактерій *Escherichia coli* та *Salmonella typhimurium*.

- Молекулярно-генетичне клонування *CysK* гена, його трансформація у клітини сульфатвідновлювальних бактерій, а також вивчення експресії ензиму О-ацетилсерин(тіол)ліази досі не проводились.

- Способи вивчення *CysK* мутантів бактерій, описані у цих роботах, стосуються лише локалізації *CysK* гена у геномі та експресії його продукту, що суттєво обмежує можливості методів клонування цього гена, його трансформацію і вивчення у сульфатвідновлювальних бактерій.

Найближчим по суті до способу, що заявляється, є вивчення гена *CysK* у геномі *E.coli*, а також аналіз властивостей мутантів (A. Wiater, D. Hulanicka Properties of *cysK* mutants of *Escherichia coli* K12 // *Acta Biochim. Pol.* - 1979-Vol. 26. - P. 21-28.).

Спільними ознаками прототипу із заявленим способом є аналіз властивостей мутантів бактерій.

Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу. Уперше автором розроблено алгоритм, що дає можливість з високим рівнем інформативності та достовірності проводити молекулярно-генетичне конструювання *cysK* мутантів сульфатвідновлювальних бактерій. Як результат: усунення проблеми нагромадження кінцевого продукту метаболізму сульфатвідновлювальних бактерій - гідроген сульфід у кишечнику людини і тварин, використовуючи *CysK* мутантні штами цих мікроорганізмів.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб детоксикації та нейтралізації гідроген сульфід. Для цього використовують генетично сконструйований *CysK* мутантний штам сульфатвідновлювальних бактерій, що здатен використовувати власний та екзогенний гідроген сульфід і синтезувати з нього цистеїн.

Технічний результат досягають за допомогою мікробіологічних, молекулярно-генетичних та біохімічних маніпуляцій, клонують ген *CysK* з геному *E.coli* та його трансформують у клітини сульфатвідновлювальних бактерій. Наявність гена *CysK* у клітинах-мутантів перевіряють за допомогою алгоритму програми BLAST у базі даних GenBank.

Під час проведення патентно-інформаційного пошуку виявлене технічне рішення, в якому є ряд суттєвих ознак, спільних із описаними у роботах (A. Wiater, D. Hulanicka Properties of *cysK* mutants of *Escherichia coli* K12 // *Acta Biochim. Pol.* - 1979-Vol. 26. - P. 21-28; A. Boronat, P. Britton,

M. C. Jones-Mortimer Location on the *Escherichia coli* genome of a gene specifying O-acetylserine(thiol)lyase // J. Gen. Microb. - 1984. - Vol. 130. - P. 673-685), а саме: молекулярно-генетичні процедури клонування гена CysK з *E.coli*, його трансформація у клітини, виділення CysK мутантів, визначення активності О-ацетилсерин(тіол)ліази, а також визначення продуктування цистеїну мутантним штамом.

Однак, даних суттєвих ознак недостатньо для одержання технічного результату заявленого рішення. Технічних рішень, що би за сукупністю ознак співпадали із заявленим способом, у достатній патентній і науково-технічній інформації не виявлено. Це дало можливість зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію винаходу (корисної моделі) "новизна".

У джерелах патентної і науково-технічної інформації не знайдено технічних рішень, в яких би були описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений спосіб від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату: молекулярно-генетичного конструювання штамів сульфатвідновлювальних бактерій - синтетиків цистеїну, клонуючи ген CysK з *E.coli*, трансформуючи його і виділяючи CysK мутанти сульфатвідновлювальних бактерій.

Корисна модель може бути використана у науково-дослідницьких мікробіологічних та біотехнологічних лабораторіях. Спосіб відповідає критерію "промислова придатність".

Для реалізації заявленої корисної моделі:

1. Нагромаджують культуру *E. coli* та сульфатвідновлювальних бактерій.

2. Використовують набір комерційних реактивів HotStar Master Mix Taq polymerase (QIAGEN), UDG-glycosylase (New England Biolabs) і праймери CysK-R і CysK-F (Generi-Biotech), клонувати ген CysK з геному *E. coli*. Трансформують ген CysK у клітини сульфатвідновлювальних бактерій.

3. Виділяють CysK мутанти сульфатвідновлювальних бактерій, засіваючи одноклубову культуру на агаризоване середовище Кравцова-Сорокіна, що містить IPTG і X-Gal, аналогічне середовище з триазолом чи на агаризоване середовище, що містить азасерин і L-цистеїну.

4. Виділяють плазмідну ДНК відібраних трансформантів (pSTVib-7-CysK) з використанням QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Наявність вбудованого гена CysK у плазміді підтверджують полімеразною ланцюговою реакцією використовуючи комерційний набір Maxima™ Probe qPCR Master Mix 2X, "FERMENTAS" і універсальні праймери M13R і M13F20.

5. У супернатанті зруйнованих клітин-трансформантів, визначають активність О-ацетилсерин(тіол)ліази за методом A.L. Fimmel і R.E. Loughlin (Fimmel A.L., Loughlin R. E. Isolation and characterization of cysK mutants of *Escherichia coli* K12 // J. Gen. Microbiol. - 1977. - Vol. 103. - № 1. - P. 37-43).

6. Визначають продуктування цистеїну у середовище мутантними штамми за методом, описаним у роботі M.K. Gaitonde (Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // Biochem. J. - 1967. - Vol. 104. - P. 627-633).

7. Визначають використання сульфату і лактату, акумуляцію сульфід/цистеїну і ацетату у середовищі культивування диким і мутантним штамом сульфатвідновлювальних бактерій, відповідно.

8. Порівнюють фізіолого-біохімічні характеристики (ріст у середовищі, процесом дисиміляційного відновлення сульфату) у мутантного штаму і дикого типу.

Описаний вище алгоритм дає можливість з високим рівнем інформативності та достовірності проводити молекулярно-генетичне конструювання cysK мутантів сульфатвідновлювальних бактерій - синтетиків цистеїну з подальшим їх застосуванням для детоксикації гідроген сульфід у кишечнику людини і тварин.

Ефективність заявленого способу і його переваги в порівнянні з прототипом підтверджено науковими дослідженнями, результати яких наведені нижче.

Встановлено, що мутантний штам сульфатвідновлювальних бактерій) нагромаджував біомасу на 36 % вищу, порівняно з диким штамом (Фіг. 1-6, Фізіолого-біохімічні властивості дикого і мутантного штамів ($M \pm m$, $n=5$):

Фіг. 1 - бактеріальний ріст,

Фіг. 2 - акумуляція цистеїну і використання сульфід/сульфід;

Фіг. 3 - використання сульфату як акцептора електронів і акумуляція сульфід/цистеїну;

Фіг. 4 - ензиматична активність О-ацетилсерин (тіол)ліази за впливу сульфату, сульфід/сульфід;

Фіг. 5 - використання лактату як донора електронів і акумуляція ацетату;

Фіг. 6 - інгібування активності О-ацетилсерин(тіол)ліази і накопичення сульфід/сульфід за впливу цистеїну.

Результати накопичення біомаси узгоджуються з дослідженнями динаміки використання сульфату і лактату, а також акумуляцією сульфїду/цистеїну і ацетату, відповідно у дикого і мутантного штаму. У цьому випадку рівень сульфату і лактату у середовищі на 60 годину культивування досягав мінімальних значень, що вказує на повне використання цих субстратів.

Крім цього мутант консумував ці субстрати набагато швидше, ніж дикий штам бактерій. Мутантний штам сконсумував сульфат повністю вже на 48 годину культивування. Досліджено здатність мутантного штаму споживати сульфїт і сульфїд із середовища культивування для синтезу цистеїну. Бактерії мутантного штаму споживав ці сполуки, використовуючи як субстрат, і акумулював цистеїн у середовище культивування.

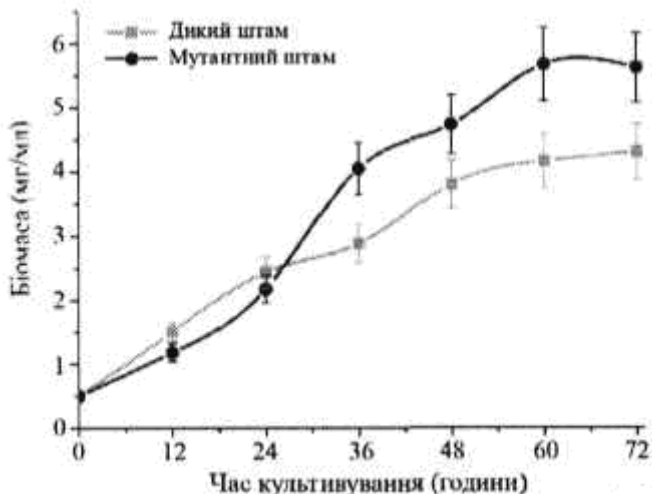
У результаті проведеної роботи можна зробити наступний висновок: уперше клоновано ген *cysK* *E.coli* і здійснено його перенесення у геном дикого штаму кишкових сульфатвідновлювальних бактерій. Уперше досліджена експресія гена *cysK* у мутантного штаму з утворенням кінцевого продукту реакції (цистеїну), а також визначено активність ензиму О-ацетилсерин(тіол)ліази. Схема відновлення сульфатів до цистеїну мутантним штамом наведена на Фіг.7.

АТФ-сульфурилаза каталізує утворення аденозин-5'-фосфосульфат (АФС), після чого з АФС формується сульфїт за участю АФС-редуктази; утворення сульфїду відбувається із сульфїту за участю ферредоксин залежної сульфїтредуктази; ензим (9-ацетилсерин(тіол)ліаза каталізує останню реакцію, під час якої використовується утворений сульфїд і О-ацетил-L-серин, та синтезується цистеїн.

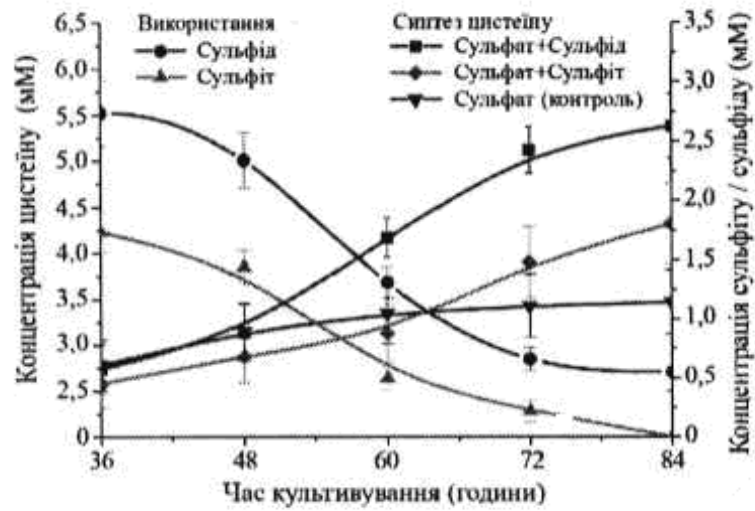
Дослідження виконані за автором Кушкевич І.В. на базі лабораторії біотехнології, лабораторії біохімії Фармацевтичного факультету Університету ветеринарних і фармацевтичних наук Брно (Чеська Республіка), а також у лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН України.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

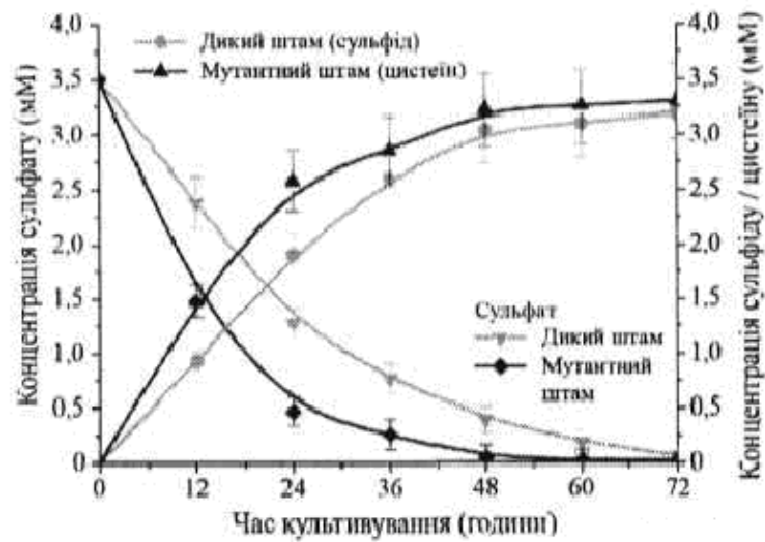
Спосіб молекулярно-генетичного конструювання *CysK* мутантів сульфатвідновлювальних бактерій - синтетиків цистеїну, який включає клонування гена *CysK* бактерій *Escherichia coli*, його трансфер у геном сульфатвідновлювальних бактерій, аналіз властивостей отриманих *CysK* мутантів, який **відрізняється** тим, що додатково відображає алгоритм використання сульфатвідновлювальних бактерій для знешкодження гідроген сульфїду у кишечнику людини і тварин, а також у водному середовищі.



Фіг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

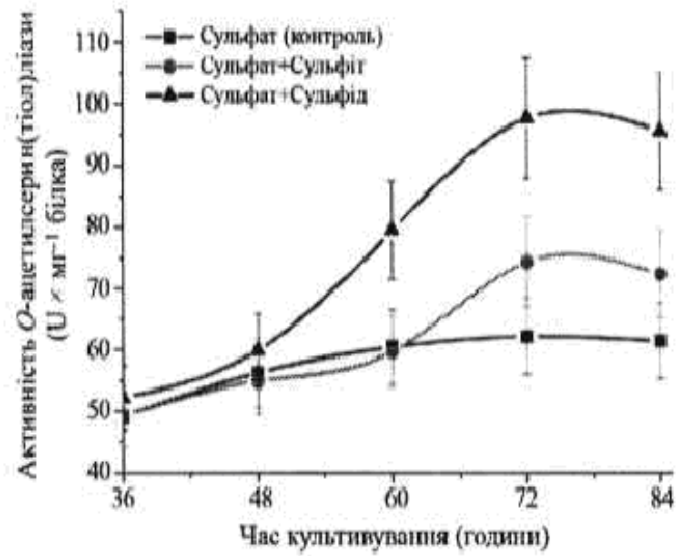


Fig. 4

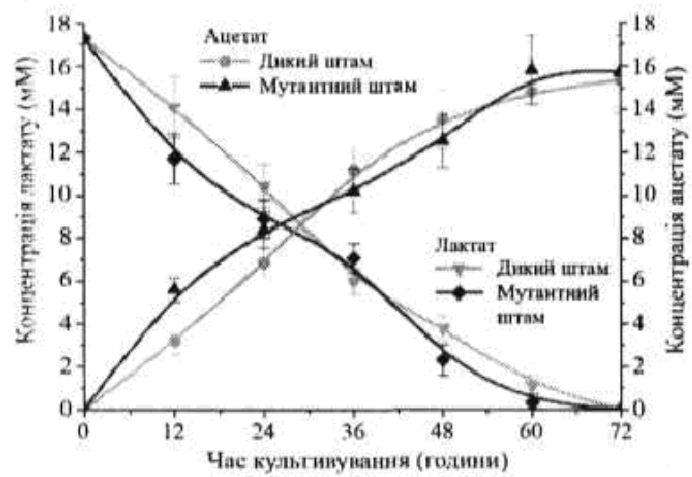


Fig. 5

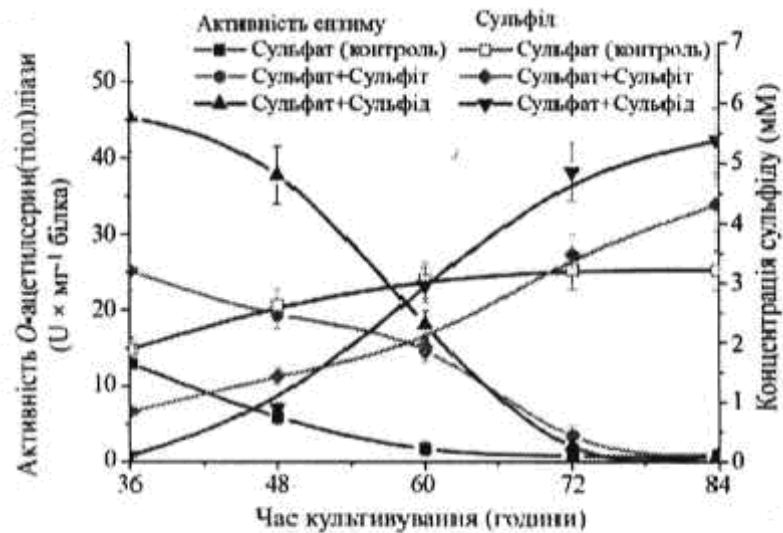


Fig. 6

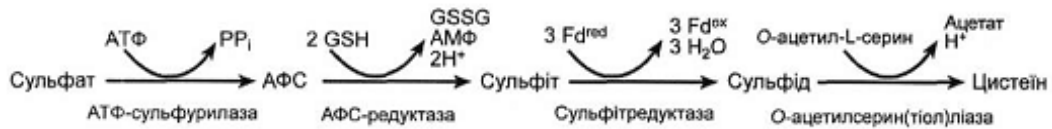


Fig. 7