

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging / D. C. Schwartz, W. Saffran, J. Welsh et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.—1983.—47.—P. 189—195.
2. Pulsed field gel electrophoresis / E. Lai, B. W. Birren, S. M. Clark et al. // BioTechnique.—1989.—7, N 1.—P. 34—42.
3. Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field // G. F. Carle, M. Frank, M. V. Olson et al. // Science.—1986.—232, N 4746.—P. 65—68.
4. Smith H. S., Berezney R. Nuclear matrix-bound deoxyribonucleic acid synthesis: an *in vitro* system // Biochemistry.—1982.—21, N 26.—P. 6752—6771.
5. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and effect of agarose and temperature / M. K. Mathew, C. L. Smith, C. R. Cantor et al. // Ibid.—1988.—27, N 26.—P. 9204—9210.
6. A simple and rapid method for preparing yeast chromosomes for pulsed field gel electrophoresis / M. Bellis, M. Pages, G. Roizes et al. // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 16.—P. 6749.
7. Чуриков И. А., Анащенко В. А., Бергташвили Д. Р. Обнаружение гигантских внехромосомных ДНК, содержащих мобильные гены дрозофилы // Докл. АН СССР.—1987.—296, № 2.—С. 457—459.
8. Extranuclear genes / P. Borts, H. F. Tabak, L. A. Grivell et al. // Eukaryotic genes: struct. activ. and regul.—London, etc.: Acad. press, 1983.—P. 71—84.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 22.11.89

УДК 577.152.34.088.3:579.852.11

© Т. В. Сорочинская, С. И. Черных,  
Т. Л. Левитина, Н. В. Роднин, 1990

## ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА β-ЛАКТАМАЗЫ TEM-1 *Escherichia coli*

*Разработана система суперсинтеза фермента β-лактамазы в клетках E. coli по фагозависимой технологии. Это позволило получить фермент в количестве (1—2)·10<sup>8</sup> ед. активности в 1 мл культуральной жидкости. Предложен метод препаративного выделения β-лактамазы, значительно упрощенный по сравнению с известными ранее. Выход препарата составляет 45 % исходного количества фермента в культуральной жидкости. Препарат ферментически гомогенен и для использования в иммуноферментном анализе в дальнейшей очистке не нуждается.*

**Введение.** В последнее время в различных областях медицинских и биологических исследований широкое применение получила иммуноферментный анализ (ИФА). Многочисленные модификации ИФА предполагают использование конъюгатов — комплексов антитела и фермента или антигена и фермента. Наиболее распространенными ферментами для конструирования конъюгатов являются щелочная фосфатаза, пероксидаза, β-галактозидаза [1]. Наряду с этими ферментами в настоящее время начинают использовать β-лактамазу [2]. По своим физико-химическим свойствам этот фермент с молекулярной массой 28 500 удобен в работе, поскольку представлен одной субъединицей и термостабилен. Конъюгаты на основе β-лактамазы имеют ряд преимуществ перед традиционными, а по чувствительности они сравнимы [3]. Прежде всего необходимо отметить простоту детекции при использовании конъюгатов на основе β-лактамазы. Концентрация реагента, применяемого для протекания реакции, позволяет визуально регистрировать результаты анализа. По своему химическому составу реагент крайне прост, доступен и представляет собой смесь пенициллина, крахмала и йода в водном растворе КЛ, к тому же он не токсичен. Большинство других субстратов для индикации иммобилизованных ферментов, в частности ОФД для пероксидазы хрена, токсичны, канцерогенны [4], обладают низкой стабильностью и синтез их затруднен. Конъюгаты на основе β-лактамазы довольно стабильны — при оптимальных условиях хранения их активность сохранялась не менее 18 месяцев [3].

Разработка и создание диагностикумов с применением конъюгатов на основе β-лактамазы требует высокоочищенного фермента. Для обеспечения значительных коли-

чество β-лактамазы нами был разработан дешевый и экономически выгодный способ получения и очистки фермента. Все известные способы очистки этого фермента основываются на получении его из микроорганизмов, в которых он синтезируется в относительно небольших количествах [5, 6]. По предложенной нами фагозависимой технологии синтез β-лактамазы значительно увеличивается. Высокий уровень фермента позволяет упростить способы его очистки.

**Материалы и методы.** Для выращивания культуры-продуцента применяли стандартную питательную среду «Аминопептид». Синтез фермента по фагозависимой технологии описан ранее [7].

Штамм-продуцент *E. coli* W3101recA-13Sup<sup>o</sup> (pBR322).

Источник фага — лизогенный штамм *E. coli* RLM1λblaQ<sub>am117</sub>R<sub>am54</sub>.

Активность β-лактамазы определяли йодометрическим методом [8]. За единицу активности принято наименьшее количество фермента, которое инактивирует 10<sup>-7</sup> М пенициллина (60 ед.) за 1 ч при 37 °С в фосфатном буфере (рН 6,8—7,0).

По окончании процесса ферментации культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 3 000 об/мин в течение 30 мин на холоду.

Фермент высаливали по стандартной методике [9], преципитат осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 3 000 об/мин и растворяли в 1/10 исходного объема фосфатного буфера (0,0067 М, рН 7,0).

Обессоливание проводили либо диализом в течение ночи против фосфатного буфера, либо на колонке с сефадексом G-25 (3×85 см, скорость тока 60 мл/ч), уравновешенным тем же буфером.

Дальнейшую очистку осуществляли на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой DE-52 («Whatman», Англия).

Фракции после ионообменной хроматографии (ИОХ) обессоливали на колонке с сефадексом G-15 (2,5×50 см), уравновешенным 0,005 %-ным раствором аммиака, рН 8,9.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу Вебера — Осборна [10], используя в качестве стандартных белков бычий сывороточный альбумин (68 000), полиэдрин вируса ядерного полиэдроза тутового шелкопряда (28 500), панкреатическую РНКазу (14 700).

Содержание белка определяли по методу Лоури [11].

**Результаты и обсуждение.** Методами генной инженерии на основе фагового вектора λplac<sub>5</sub>CI<sub>857</sub>Δ (sHindIIIλ2sHindIIIλ3)sRIλ3<sup>o</sup>sRIλ4<sup>o</sup>sRIλ5<sup>o</sup>Δ(sRIIacz-sHaeIII-lacz)UV<sub>5</sub> и плазмиды pCV11 был сконструирован фаг λbla. Введение амбер-мутаций в регуляторные гены фага приводит к замедлению развития фага в клетках *E. coli*, и фаги с такими мутациями используются для синтеза продуктов генов, клонированных в фаге [12]. Рекомбинацией *in vivo* в фаг λbla были введены амбер-мутации в поздние гены Q и R, блокирующие лизис бактериальной клетки. Это обеспечивает более длительное функционирование гена bla, что способствует накоплению его продукта — β-лактамазы.

Культуру клеток *E. coli*, содержащую плазмиду pBR322 с геном bla, заражали фагом λblaQ<sub>am117</sub>R<sub>am54</sub>. Для снижения частоты рекомбинации между гомологичными последовательностями фага λ и плазмиды pBR322, имеющей место в гене bla, в качестве продуцента был выбран штамм *E. coli* W3101recA-13Sup<sup>o</sup>. После заражения культуры

#### Очистка β-лактамазы Purification of β-lactamase

Стадия очистки	Содержание белка, мг/мл	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед/мг белка	Выход, %
Раствор фермента после высаливания	28,0	1,6·10 <sup>8</sup>	2,85·10 <sup>4</sup>	100
После очистки на 1-й колонке DE-52	2,0	1,4·10 <sup>8</sup>	2,3·10 <sup>5</sup>	87
Фракции после ИОХ на 2-й колонке DE-52:				
3	7,5	3,0·10 <sup>6</sup>	4,0·10 <sup>4</sup>	45
4	4,0	8,0·10 <sup>6</sup>	2,0·10 <sup>5</sup>	
5	2,0	4,5·10 <sup>7</sup>	1,5·10 <sup>6</sup>	
6	0,8	7,0·10 <sup>6</sup>	0,85·10 <sup>6</sup>	
7	4,5	1,05·10 <sup>7</sup>	1,6·10 <sup>6</sup>	

Примечание. Фракции после ИОХ соответствуют представленным на рис. 2, а—з.

*E. coli* фагом и культивирования в течение 18 ч активность  $\beta$ -лактамазы достигала 1—2 млн ед. в 1 мл культуральной жидкости.

При хроматографии фермента на колонке с DE-52 (1,5×35 см), уравновешенной 0,0067 М фосфатным буфером (рН 7,0),  $\beta$ -лактамаза не сорбируется на смоле. Однако удельная активность фермента после этой процедуры возрастает в 14 раз, что свидетельствует о сорбции на колонке большого количества примесных белков. После этой частичной очистки препарат  $\beta$ -лактамазы наносили на колонку с DE-52 (1,5×20 см), уравновешенную 0,0067 М фосфатным буфером, рН 7,0. В этих условиях весь белок,

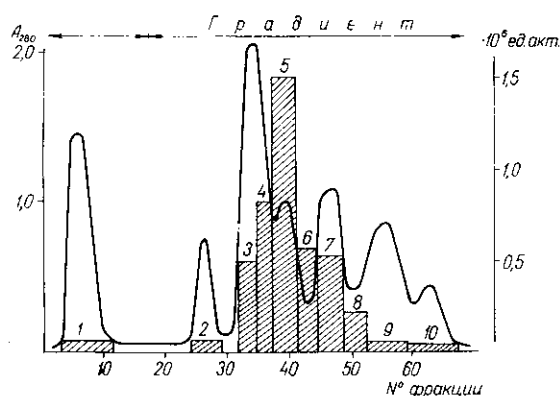


Рис. 1. Очистка  $\beta$ -лактамазы на колонке 1,5×20 см с ДЭАЭ-целлюлозой. Скорость тока 20 мл/ч. Объем фракции 5 мл. Линейный градиент концентрации фосфатного буфера от 0,0067 до 0,067 М

Fig. 1. Purification of  $\beta$ -lactamase on DEAE-cellulose DE-52 column (1,5×20 cm). Flow rate 20 ml/h. Fraction volume 5 ml. The protein was eluted by the linear gradient of  $K^+$ - $Na^+$  phosphate buffer concentration of 0.0067-0.067 M 9pH 7.0)

Рис. 2. Электрофорез препаратов  $\beta$ -лактамазы в 10 %-ном ПААГ с DS-Na: а — смесь стандартных белков (см. «Материалы и методы»); б — исходный препарат  $\beta$ -лактамазы, частично очищенный высаливанием; в — з — фракции после ИОХ 1, 3—7 соответственно

Fig. 2. 10 % SDS-PAAG electrophoresis of  $\beta$ -lactamase preparations; а — calibration protein mixture (see «Materials and methods»); б — crude preparation of  $\beta$ -lactamase; в — з — fractions obtained by ion-exchange chromatography 1, 3, 4, 5, 6, 7, respectively

обладающий ферментативной активностью, сорбируется на колонке. Элюцию  $\beta$ -лактамазы проводили линейным градиентом концентрации фосфатного буфера от 0,0067 до 0,067 М. Фермент выходит узким пиком, причем максимум активности  $\beta$ -лактамазы не совпадает с максимумом оптической плотности при 280 нм (рис. 1).

Электрофорез в ПААГ фракций после ИОХ показал наличие во фракциях 3 и 4 полипептида с молекулярной массой 26 000, а во фракциях 5—7 белка 28 500, причем удельная активность его была выше, чем белка 26 000 (14 и 2,5 млн ед/мг белка соответственно) (рис. 2).

В работе [13] были получены пять форм  $\beta$ -лактамазы с молекулярной массой от 29 500 до 24 000, в том числе и величиной 28 500 и 26 000. Белки с такими же значениями молекулярной массы были выделены и в наших исследованиях. Предполагается в этой связи, что наличие множественных форм  $\beta$ -лактамазы может быть обусловлено началом синтеза полипептидной цепи на инициаторных триплетах, расположенных на различных расстояниях от стартового кодона [13]. Наверное, нельзя исключить и возможности ограниченного протеолиза  $\beta$ -лактамазы, происходящего при ее очистке.

Суммарная активность двух форм  $\beta$ -лактамазы (26 000 и 28 500) в наших экспериментах составляет 45 % общей активности фермента в культуральной жидкости. В работе [5] выход фермента после хроматографии на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозе составил

59 %. Это вполне сопоставимо с нашими результатами (таблица). Однако выход гомогенного фермента в известных нам работах [5, 6] ниже, что может быть связано с дополнительными стадиями очистки, которых нам удалось избежать.

Таким образом, по предлагаемой нами схеме можно получать препаративные количества  $\beta$ -лактамазы, позволяющие использовать его в иммуноферментном анализе.

## PREPARATION AND PURIFICATION OF E. COLI TEM-1 $\beta$ -LACTAMASE

T. V. Sorochinskaya, S. I. Chernykh, T. L. Levilina, N. V. Rodnin

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### Summary

The phage-technology for supersynthesis of  $\beta$ -lactamase TEM-1 in *E. coli* cells has been worked out. It has permitted obtaining  $(1-2) \times 10^6$  units of enzyme activity per ml of cultural fluid. The method for wide-scale  $\beta$ -lactamase preparation is suggested, that is much simpler as against those known before. The enzyme recovery is about 45 %. Our preparation is electrophoretically homogenous and may be used in immuno-enzyme assay without further purification.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дзантив Б. Б., Егоров А. М. Современное состояние и перспективы развития иммуноферментного анализа // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева.— 1982.— 27, № 4.— С. 442—449.
2. Жвирблене А. А., Норейка Ф.-К. М., Садыкин А. Ю. Твердофазный иммуноферментный анализ инсулина с использованием  $\beta$ -лактамазы из *Bacillus licheniformis* 749/c и пероксидазы хрена в качестве маркеров // Антибиотики и мед. биотехнология.— 1987.— 32, № 4.— С. 279—282.
3. Иммуноферментная индикация вирусов и вирусспецифических антител с использованием конъюгатов на основе  $\beta$ -лактамазы, полученной генноинженерным способом / И. Г. Харитоненков, В. А. Кордюм, М. Я. Христова и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1987.— № 5.— С. 627—630.
4. Voller A., Bartnt A., Bydwall D. Enzyme immunoassay with special referencies to ELISA-technics // J. Clin. Pathol.— 1978.— 31, N 7.— P. 507—520.
5. Purification and biochemical properties of  $\beta$ -lactamase produced by *Proteus rettgeri* / K. Hirai, S. Jyobe, M. Inoue, S. Mitsuhashi // Antimicrobial Agents and Chem.— 1980.— 18, N 5.— P. 687—690.
6. Purification and some properties of  $\beta$ -lactamases from *Proteus rettgeri* and *P. inconstans* / S. Ohya, J. Fujii-Kuriyama, M. Yamamoto, S. Sugarawa // Microbiol. and Immunol.— 1980.— 24, N 9.— P. 815—824.
7. Ас. 1089119 СССР МКП<sup>3</sup>С12 № 9/38. Способ получения  $\beta$ -лактамазы / В. А. Кордюм, С. И. Черных, Т. В. Сорочинская // Открытия. Изобретения.— 1984.— № 16.
8. Чайковская С. М., Венкина Т. Г. Модифицированный подометрический метод определения активности  $\beta$ -лактамазы // Антибиотики.— 1962.— 7, № 5.— С. 453—456.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
10. Weber K., Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol. Chem.— 1962.— 244, N 8.— P. 4406—4412.
11. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // Ibid.— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
12. Moire A., Brammar W. J. The use of specialized transducing phages in the amplification of enzyme production // Mol. and Gen. Genet.— 1976.— 14, N 1.— P. 87—88.
13. Kopylova-Sviridova T. N., Soukavaliisin V. V., Fodor I. Synthesis of proteins coded by plasmid vectors of pCV series (Amp<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>) and their recombinant derivatives (PDM) in *E. coli* minicells // Gene.— 1979.— 7, N 2.— P. 121—139.

Инт-молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 17.08.89