

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут молекулярної біології та генетики

На правах рукопису
УДК 577.21

СОРОЧИНСЬКА ТЕТЯНА ВОЛОДИМИРІВНА

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАГОЗАЛЕЖНОГО СИНТЕЗУ β -ЛАКТАМАЗИ
В КЛІТИНАХ *Escherichia coli*

03.00.03 - молекулярна біологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994

Дисертація є рукопис.

Робота виконана у відділі регуляторних механізмів клітини
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України.

Науковий керівник: член-кор. НАН України
доктор біологічних наук,
професор, В.А.Кордюм

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
С.С.Малюта

кандидат біологічних наук, доцент
В.П.Поліщук

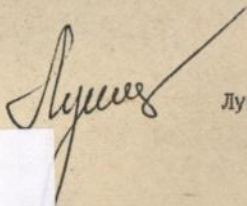
Провідна організація: Інститут мікробіології та вірусології
ім.Д.К.Заболотного НАН України, м. Київ

Захист дисертації відбудеться "20" грудня 1994 р. о 10⁰⁰ год. на
засіданні Спеціалізованої ради Д 016.11.01 при Інституті мо-
лекулярної біології та генетики НАН України за адресою:
252143, Київ-143, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту моле-
кулярної біології та генетики НАН України за адресою: 252143,
Київ-143, вул. Заболотного, 150.

Автореферат дисертації розіслано "18" листопада 1994 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої Ради
кандидат біологічних наук



Лукаш Л.Л.

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00777363 (X)

ЛННБ ім. В. Стефаника
АН України

Актуальність теми. Інтенсивний розвиток методів генетичної інженерії та молекулярної біології дозволяє конструювати рекомбінантні молекули ДНК з заданими властивостями, вводити їх в бактеріальні клітини і, тим самим, створювати нові промислові штами-продуценти та суперпродуценти цінних важкодоступних білків людини та тварин. Для цих цілей використовують різні мікроорганізми, проте основні промислові суперсинтетики отримані на основі *Escherichia coli* за допомогою плазмідних технологій. В згаданих випадках цільовий продукт накопичується в цитоплазмі клітин і досить часто утворює нерозчинні гранули та агрегати, що утруднює його виділення. Тому актуальними є дослідження, які спрямовані на пошук та розробку високоефективних систем отримання біологічно-активних речовин, яким не притаманні труднощі, зв'язані з плазмідними технологіями. Використання для ампліфікації чужерідних генів бактеріофагу λ , є одним із шляхів подолання цих перешкод. Вектори на основі фагу λ забезпечують значно більший рівень ампліфікації донорних генів, ніж більшість плазмідних. Вони дозволяють використовувати сильні фагові промотори, коли промотор клонованого гену малоефективний та здійснювати контроль експресії цього гену.

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було розробити спосіб отримання ферменту β -лактамаза TEM1 в клітинах *E. coli*, використовуючи переваги ампліфікації генів як на плазмідах, так і на фагах, об'єднавши їх в одну систему.

Основним завданням роботи було:

1. Розробити систему, оптимальну для синтезу β -лактамази в клітинах *E. coli* з використанням фагу лямбда.
2. Сконструювати рекомбінантний фаг λ , який включає в себе структурний ген β -лактамази - bla.

Листопад 2010 р. * ДНУ *
Листопад 2010 р.

3. Отримати похідні фагу λ CI 857 b1a з амбер-мутаціями в регуляторних генах (N та Q), та в деяких пізніх генах (R), а також дослідити вплив цих мутацій на фагозалежний синтез β -лактамази в клітинах *E.coli*.

4. Вивчити вплив кількості копій плазмід з b1a геном на вихід β -лактамази при фагозалежном синтезі в клітинах *E.coli*.

5. Показати можливість використання β -лактамази для імуноферментного аналізу.

Наукова новизна та практичне значення роботи. Вперше, на прикладі синтезу β -лактамази, запропонована система, в якій експресія гетерологічного гену забезпечується однією системою регуляції з використанням плазмідного та фагового векторів. Показано, що введення амбер-мутацій в регуляторні та деякі пізні гени фагу λ приводить до збільшення виходу фермента при фагозалежному синтезі його в клітинах *E.coli*.

В результаті проведених досліджень розроблено новий спосіб отримання ферменту β -лактамаза, коли ген b1a експресується в клітинах *E.coli* і в складі плазміди, і в складі фагу λ . Такий фагоплазмідний спосіб отримання β -лактамази забезпечує високий вихід продукту з його позаклітинною локалізацією ($1-2 \cdot 10^6$ од/мл). Ця розробка не має аналогів і захищена авторським свідоцтвом / Кордюм В. А., 1984/.

Виділений та очищений препарат β -лактамази був апробований при детекції вірусів та віруспецифічних антитіл в імуноферментному аналізі. Було показано, що чутливість тест-систем з використанням β -лактамазних кон'югатів аналогічна таким, в яких використовували традиційну пероксидазу.

Дослідні зразки ферменту були передані для подальших

досліджень в Інститут вірусології ім. Д.І.Івановського АМН Росії та в Інститут біоорганічної хімії АН Росії.

Складено лабораторний технологічний регламент на виробництво препарату β -лактамаза ТЕМ I.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на 16-й конференції FEBS (Москва, 1984), на 4-й Всесоюзній конференції "Мікроорганізми - продуценти ферментів" (Ташкент, 1988), на Всесоюзній конференції "Досягнення біотехнології - агропромислового комплексу" (Чернівці, 1991), на VI З'їзді Українського товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І.Вавилова (Полтава, 1992), на міжнародній конференції "Fundamental and applied problems in phytovirology" (Ukraine, Yalta, 1994), на VII Міжнародному конгресі "Bacteriology and Applied Microbiology Division" (Czech Republic, Pragua, 1994).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 робіт та 1 авторське свідотство.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів, обговорення, висновків та списку літератури, який включає 226 найменувань. Робота викладена на 135 сторінках машинописного тексту та містить 9 малюнків та 5 таблиць.

Матеріали та методи. Штами бактерій та фагів, використані в роботі, були отримані з колекцій культур відділу регуляторних механізмів клітини ІМБтаГ НАН України та з інститутської колекції.

Середовища. В роботі були використані рідкі поживні середовища амінопептид (ферментативний гідролізат білку) та LB /Маніатис Т., 1984/. Тверде середовище готували за допомогою

агару - 1,5 % та 0,6 %. Розведення фаголізату та бактеріальних культур проводили в 0,14 М розчині NaCl.

Отримання фаголізату. Лізогенну культуру, яка має в собі профаг з t_s мутацією інкубували при 28°C в умовах інтенсивної аерації до густини (1-2)•10⁸ клітин в 1 мл середовища. Потім на протязі 20 хв. проводили термоіндукцію при 43°C, при цьому термолабільний білок-репресор інактивується і відбувається індукція профага. Подальшу інкубацію проводили при 37°C до повного лізису клітин (приблизно 1,5 години). Титр фагу визначали двошаровим методом /Міллер Дж., 1976/.

Виділення ДНК плазмід. Для виділення плазмідної ДНК використовували метод рівноважного центрифугування в градієнті густини хлористого цезію в присутності бромистого етидію /Маніатіс Т., 1984/.

Виділення ДНК фагу λ . ДНК фагу λ виділяли загальноприйнятим фенольним методом /Маніатіс Т., 1984/.

Трансформацію і трансфекцію клітин *E. coli* плазмідною та фаговою ДНК проводили на хлор-кальцієвих компетентних клітинах за методом Дагерта та Ерліха /Dagert M., Ehrlich S., 1979/.

Отримання рекомбінантної фагової молекули λ CI 857 *bla*. Для цієї мети в фаговий вектор λ ΔZ UV5, який має один *EcoRI* сайт клонували плазмиду *pcVII* як донор структурного гену β -лактамази *bla*. Ця плазміда також має один *EcoRI* сайт. Гідроліз ДНК фага та плазміди та лігування фрагментів проводили за оп'саною методикою /Маніатіс Т., 1984/, використовуючи рестриктази *EcoRI* та T4-ДНК-лігази (виробництво НВО "Фермент", Вільнюс). Аналіз отриманих рекомбінантів проводили за допомогою рестриктази *SatI* того ж виробництва.

Рекомбінація генів. Амбер-мутації в гени N, Q, R реком-

бінантного фагу λ CI 857 *bla* вводили методом рекомбінації фагів λ CI 857 *bla* та λ *plac* CI 857 N⁻N⁻ і λ *plac* 5 Q⁻R⁻. Відбір рекомбінантних фагів з введеними амбер-мутаціями проводили на культурах *E. coli* CA77 (Su^o) та *E. coli* RLMI (Su⁺).

Визначення кількості копій плазмід проводили з врахуванням їх молекулярних мас та з використанням стандартної комерційної ДНК плазмиди pBR 322 (Amersham, Англія) за методикою, описаною /Харди К., 1989/.

Визначення активності β -лактамази проводили йодометричним методом за Чайковською /Чайковська С., 1962 /. За одиницю активності приймали найменшу кількість ферменту, яка може інактивувати 10^{-7} М пеніциліну (60 од.) за 1 годину при 37°C у фосфатному буфері pH 6,8 - 7,0.

Кон'югати на основі β -лактамази отримували за допомогою глютарового методу в одну стадію /Егоров А.М., 1991/.

Твердофазний імуноферментний аналіз з використанням кон'югатів на основі β -лактамази та пероксидази проводили за методикою Егорова /Егоров А.М., 1991/.

Результати та обговорення.

1. Конструювання фага λ CI 857 *bla* та характеристика експресії гена *bla*.

При створенні штамів-суперпродуцентів майже завжди використовують плазмідні вектори, але використання їх має багато труднощів і недоліків. Для їх усунення в нашій лабораторії було розроблено ряд методів отримання біологічно-активних речовин за допомогою бактеріофага λ . Якщо інфікувати клітини *E. coli* бактеріофагом λ , котрий несе в собі ген певного продукту, то це приводить до значного збільшення виходу цього продукту. При інфекції бактеріальної клітини фагом почина-

ється синтез генних продуктів, що забезпечують автономну реплікацію фагової ДНК, утворення фагових корпускул та лізис клітини. При цьому утворюється 100-200 фагових корпускул і йде синтез тих генів, які клоновані з фага. Введення амбер-мутацій в регуляторні гени фага приводить до більш повільного процесу лізису клітини, а значить до продовження часу функціонування клонованого гену і накопиченню того продукту, за який він відповідає. Для створення системи суперсинтезу β -лактамази по фагозалежній технології найпершою метою було отримати конструкцію на базі фагового вектора, в якій буде розміщений структурний ген β -лактамази під контролем ефективного промотора, та введення амбер-мутацій в регуляторні гени фагу. При створенні рекомбінантного фагу λ CI 857 *bla* у нас з'явилась можливість прослідкувати експресію *bla* гена під контролем різних промоторів: P_{lac} , P_L промоторів фага λ та під контролем власного промотора, оскільки ген *bla* в рекомбінантну молекулу вбудований складі цілої плазмиди. За допомогою рестриктного аналізу та подальшого електрофорезу було встановлено, яким чином орієнтований вбудований ген β -лактамази, оскільки максимальна експресія гену *bla* можлива тільки тоді, коли його робота контролюється сильними промоторами фага λ - P_{lac} та P_L . Це пряма орієнтація клонованого гену. Активність β -лактамази в цьому випадку досягала $(3-5) \cdot 10^3$ од/мл лізату. При зворотній орієнтації вставки активність ферменту була на порядок меншою - $(2-4) \cdot 10^2$ од/мл лізату. Зниження активності β -лактамази пов'язано, напевно, з конвергентною транскрипцією, яка описана Ворд та Мурей /Ward F., 1979, Murray N.E., 1979/. При конвергентній транскрипції синтез РНК подавлюється за рахунок взаємодії молекул

РНК-полімераз, які прямують в зворотніх напрямках. В першому випадку, при прямій орієнтації, на експресію гена *bla*, який розташований поряд з *lac*-промотором, впливають промотори P_{lac} та P_L фага λ та власний сильний промотор. Тому активність β -лактамази була на порядок вища, ніж у клонів із зворотною орієнтацією. Подальші дослідження проводили з клонами, в яких вставка знаходилась у прямій орієнтації.

2. Синтез β -лактамази в різних штаммах *E. coli* при інфікуванні фагом $\lambda CI 857 bla$ з амбер-мутаціями в різних генах.

Для успішного використання фагового вектора з вбудованим в нього певним геном в системі суперсинтезу продуктів цього гену потрібно подовжити час його функціонування в клітині. Для цього потрібно затримати лізис бактеріальної клітини за рахунок введення амбер-мутацій в регуляторні гени фага *N* чи *Q* та в структурні, які відповідають за лізис клітини, наприклад, *R*. Ген *N* - ранній ген позитивної регуляції фага λ . Він потрібний для повноцінної експресії всіх ранніх генів фага лямбда, в першу чергу, генів *O* та *P*, продукти яких необхідні для реплікації фагової ДНК. При відсутності продукта гена *N* транскрипція з цих генів дещо затруднена і рівень реплікації фагової ДНК у *N*-мутантів невисокий. В зв'язку з цим лізис бактеріальної клітини гальмується. Ген *Q* здійснює позитивну регуляцію дії пізніх генів фагу (*S, R, A-J*). Його продукт активує синтез РНК та білків з пізніх генів фага. Гени *R, R₂, S* потрібні для лізису бактеріальної клітини. Всі ці гени складають один оперон і існують як одна транскрипційна одиниця, починаючи з промотора P_R , який розташований праворуч від гена *Q*. Транскрипція відбувається конститутивно, але при відсутності продукта гена *Q* термінується в t_R сайті,

який розташований поряд з промотором P_R . У Q^- -мутантів утворення РНК з пізніх генів сильно подавлено і це теж дозволяє подовжити час лізису клітин. Були отримані N^-N^- та Q^-R^- -похідні рекомбінантного фагу λ CI 857 *bla*. Активність β -лактамази в цих похідних порівняно з їх попередником збільшилась на порядок і досягла величини $(2-4) \cdot 10^4$ од/мл. Збільшення активності β -лактамази після введення амбер-мутацій свідчить про те, що використання N^- та Q^-R^- -мутантів доцільно, оскільки дозволяє затримати утворення структурних білків та білків, потрібних для лізису клітини-хозяїна, блокувати їх утворення у N^-N^- -мутантів і, тим самим, подовжити час діяльності гена *bla*. Процеси лізису клітини фагом сповільнені, проте реплікація фагової ДНК іде, що призводить до ампліфікації гена *bla* та до накопичення його продукту - ферменту β -лактамаза. Експресію *bla* гена при фагозалежному синтезі досліджували на 10 штамх *E. coli*, які різнилися наявністю чи відсутністю супресора, що виправляє амбер-мутації в регуляторних генах фага. Результати цих експериментів приведені в таблиці 1.

При інфікуванні фагом λ CI 857 *bla* Q^-R^- штаму *E. coli* W3101 (Su^0) продукується приблизно в два рази більше β -лактамази, ніж при інфікуванні цим фагом усіх інших досліджених штамів, які мають супресор (Su^+). Вихід ферменту становить $3,1 \pm 0,06 \cdot 10^5$ од/мл лізату. В інших досліджених Su^0 штамх *E. coli* β -лактамази накопичувалось менше порівняно зі штамом *E. coli* W 3101. При інфікуванні фагом λ CI 857 *bla* N^-N^- всіх досліджених Su^0 штамів *E. coli* синтезувалось приблизно в 20 разів менше ферменту, ніж при інфікуванні фагом Su^+ (табл. 1). Експресія *bla* гена в Su^+ штамх при інфікуванні як

Таблиця 1.

Активність β-лактамази в різних штаммах *E. coli* при інфікуванні фагами λ CIBla^N^N та λ CIBla^Q^R (од. акт./мл лізату).

Штам	Активність β-лактамази при інфікуванні фагом	Активність β-лактамази при інфікуванні фагом
	λ CIBla ^N ^N	λ CIBla ^Q ^R
3000*74(Su ⁰)	5,0 _± 0,1 * 10 ³	1,16 _± 0,05 * 10 ⁵
AB 259 "	6,7 _± 0,1 * 10 ³	1,16 _± 0,05 * 10 ⁵
CA 77 "	1,7 _± 0,1 * 10 ³	1,61 _± 0,05 * 10 ⁵
10 "	0,7 _± 0,05 * 10 ³	1,39 _± 0,05 * 10 ⁵
MR 31 "	0,8 _± 0,05 * 10 ³	0,34 _± 0,03 * 10 ⁵
W 3101 "	1,3 _± 0,05 * 10 ³	3,1 _± 0,06 * 10 ⁵
HB 101 (Su ⁺)	13,3 _± 0,4 * 10 ³	1,06 _± 0,05 * 10 ⁵
C 600 "	31,1 _± 0,6 * 10 ³	1,42 _± 0,05 * 10 ⁵
K 12 "	1,37 _± 0,05 * 10 ⁵	1,33 _± 0,05 * 10 ⁵
CA 5013 "	1,33 _± 0,05 * 10 ⁵	1,55 _± 0,05 * 10 ⁵

фагом з ^N^N так і з ^Q^R-мутаціями була приблизно на одному рівні тому, що мутації в цих фагах виправляє один і той же амбер-супресор *E.*, який впізнає амбер-кодон і вбудовує в цьому місці амінокислоту глутамін. Для суперсинтезу β-галактозидази /Глушакова Л.Г., 1982а, Глушакова Л.Г., 1982б, Кордюм В.А., 1980 / з однаковою ефективністю були використані ^N- та ^Q^R-похідні фагу λ ріас. Проте в системі синтезу β-лактамази фаг λ CI 857 ^N^N виявився неефективним. Ймовірно, що тут відбуваються такі процеси. Ген *bla* клонований в фаг в складі цілої плазмиди pCVII. Відомо, що ^N-мутанти фагу λ в

безсупресорних штаммах існують як плазмиди /Lieb M., 1970 /, тому фаг λ CI 857 $\text{bla}^N N^-$ в Su^0 штаммах існує як дворепліконова плазида. В результаті взаємодії фагового та плазмідного репліконів або зменшується кількість копій N -плазмиди (в нормі їх 10-20 на клітину /Klechner N., 1977 /), або збільшується її нестабільність. Про нестабільність плазмідного стану λ CI $N^- N^-$ в безсупресорному хозяйіні при різних умовах культивування повідомляли різні автори /Hadfield Ch., 1984, Lieb M., 1970, Signer E.R., 1960 /.

Таким чином продемонстровано, що для фагозалежного синтезу β -лактамази необхідно використовувати рекомбінантний фаг λ CI 857 $\text{bla}^Q R^-$, а штамом-продуцентом може служити тільки безсупресорний штам *E. coli* W 3101.

3. Фагозалежний синтез β -лактамази в клітинах *E. coli*, які мають різні плазмиди з геном bla .

Для вивчення можливостей оптимізації фагозалежного синтезу β -лактамази в клітинах *E. coli* досліджували ряд плазмід, які мають в своєму геномі ген bla : pC VII , pBR322 , pMCR4 , pMCR11b , pGEM1 . Ці плазмиди були трансформовані у штам-продуцент *E. coli* W 3101 Su^0 . Цей штам характерний тим, що у своєму геномі він несе мутацію в гені tes A , який відповідає за процеси рекомбінації в клітині. Мутація в гені tes A сприяє зниженню частоти рекомбінації між гомологічними послідовностями гена bla , інтегрованого у фаг, та який є в складі досліджуваних плазмід. Клітини з плазмідами вирощували в умовах підвищеної аерації до логарифмічної фази росту і інфікували фагом λ CI 857 $\text{bla}^Q R^-$ в кількості 10-20 корпускул на клітину. Через 14-16 годин після інфікування визначали активність ферменту в культуральному середовищі. Рівень син-

тезу фермента в штамі-продуценті, в якому є різні плазмідні, показано в таблиці 2.

Таблиця 2.

Активність β -лактамази в штамі-продуценті *E. coli* W3101, який має плазмідні з *bla* геном різної копійності, при інфікуванні фагом λ CI *bla* Q^R .

Плазмідна	Копійність плазмідні в клітині	Активність β -лактамази (од./мл лізату)
<i>pcv11</i>	15 \pm 5	3,5 \pm 0,2 $\cdot 10^4$
<i>pbR322</i>	40 \pm 10	3,2 \pm 0,02 $\cdot 10^5$
<i>pMCR4</i>	30 \pm 10	1,5 \pm 0,01 $\cdot 10^5$
<i>pMCR1t1b</i>	30 \pm 10	7,7 \pm 0,2 $\cdot 10^4$
<i>pGEM1</i>	80 \pm 10	6,0 \pm 0,03 $\cdot 10^5$

В ході досліджень було доцільним в'яснити, якою кількістю копій ген *bla* представлений у штамі-продуценті. В роботі / Mason Anthony., 1989 / автори вивчали рекомбінантні плазмідні, кожна з котрих мала в своєму геномі ген *bla*. Активність β -лактамази зростала при збільшенні кількості копій гена *bla*. В наших дослідженнях найбільша активність β -лактамази виявлена при інфікуванні фагом λ CI 857 *bla* Q^R бактерій з плазмідною *GEM1*, копійність якої ставила 80 \pm 10 копій на клітину (табл. 2). Про кореляцію між експресією клонованого гену та кількістю копій цього гену в клітині говориться в роботі Бейлі /Bailly J.-H., 1985/, що співпадає і з нашими результатами.

4. Тестування вірусів та вірусспецифічних антитіл за допомогою β -лактамазних кон'югатів в імуноферментному аналізі (ІФА).

Останнім часом фермент β -лактамаза стає все більш поширеним для використання в ІФА поряд з традиційними пероксидазою, β -галактозидазою, лужною фосфатазою. Розробка та створення діагностикумів з застосуванням кон'югатів на основі β -лактамази вимагає високоочищеного препарату. Запропонована подвійна система синтезу цього ферменту дозволяє отримувати великі кількості препарату в легкодоступній та розчинній формі, що створює умови для розробки простого та дешевого методу його виділення та очистки. Відомі методи виділення та очистки цього ферменту базуються на отриманні його з клітин мікроорганізмів, в яких він синтезується, і знаходиться або в невеликих кількостях, або в важкодоступній формі /Hiral K., 1980, Georgion G., 1986/. В зв'язку з цим, виділення та очистка вимагають багато стадій, а це, в свою чергу, приводить до втрат білку та часткової його деградації. Запропонований нами метод виділення та очистки β -лактамази дозволяє звести цей процес до трьох стадій і йде в м'яких умовах /Сорочинська Т.В., 1990/. Вихід препарату становить 45%, електрофоретичний аналіз показує його гомогенність та 95%-у чистоту (мал. 1, 2).

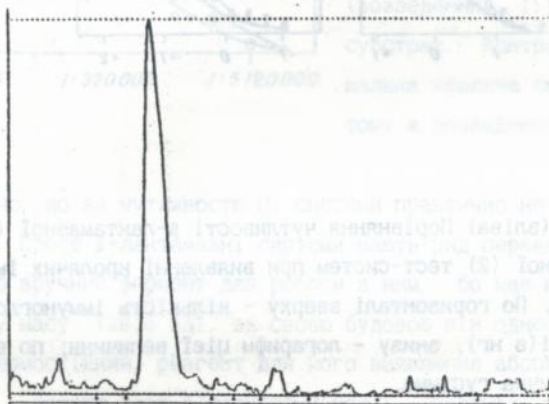
Отриманий таким методом препарат β -лактамази був випробуваний при створенні тест-систем для виявлення вірусспецифічних антитіл вірусу грипа та HBs-антигену вірусу гепатита /Сорочинська Т.В., 1989, Роднін М.В., 1991/. На моделі вірусу грипа та вірусспецифічних до нього антитіл було проведено порівняння чутливості тест-систем, в яких використовували

Малюнок 1.



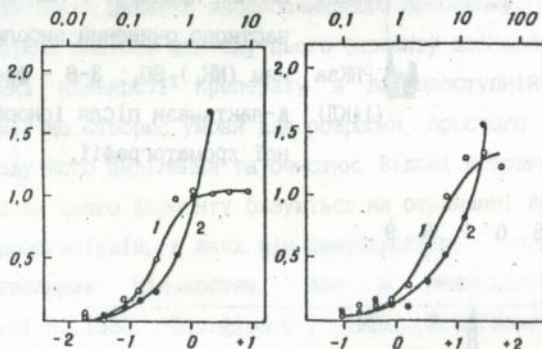
БАА Электрофорез препаратів
(68KD) β -лактамази в 10%-ому ПААГ з
додецилсульфатом натрію.
Поліе (1,9 - суміш стандартних
дрін маркерних білків; 2 - пер-
винний препарат β -лактамази,
(28KD) частково очищений висолуван-
ням $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3-8 - фракції
РНКаа β -лактамази після іонообмін-
(14KD) ної хроматографії.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Малюнок 2. Денситограма електрофореграми очищеного препара-
ту β -лактамази.

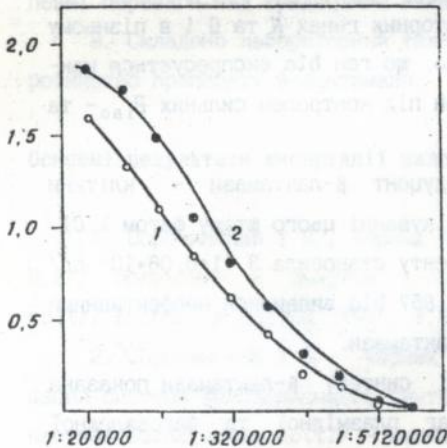
кон'югати з β -лактамазою та традиційно вживаною пероксидазою. Показано, що нижні межі визначення різних антигенів для обох тест-систем близькі і становлять: для імуноглобулінів кролика - 0,1 нг в зразку, для віріонів грипу - 1-2 нг для тотального вірусного білку (мал.3,4).



Малюнок 3. (зліва) Порівняння чутливості β -лактамазної (1) та пероксидазної (2) тест-систем при виявленні кролячих імуноглобулінів. По горизонталі зверху - кількість імуноглобулінів в лунці(в нг), знизу - логарифм цієї величини; по вертикалі - оптична густина.

Малюнок 4. Порівняння чутливості β -лактамазної (1) та пероксидазної (2) тест-систем при виявленні вірусу грипа. Позначення координат - ті ж, що й на мал.3.

Ці ж системи були здатні виявити вірусспецифічні іммуноглобуліни при розведенні кролячої анти-NP-сировотки 1:2560000 (мал. 5).



Малюнок 5. Порівняння чутливості β -лактамазної (1) та пероксидазної (2) систем при виявленні вірусспецифічних антитіл в кролячій анти-NP-сировотці. По горизонталі - розведення сировотки. В лунки вносили по 50 нг вірусу грипа, потім послідовно - імунну сировотку, кон'югат (розведення 1:1000) та субстрат. Контроль - нормальна кроляча сировотка в тому ж розведенні.

Видно, що за чутливістю ці системи практично не відрізняються. Проте β -лактамазні системи мають ряд переваг, а саме - це зручний фермент для роботи з ним, бо має малу молекулярну масу (28,5 кД), за своєю будовою він односубодиничний, термостійкий, реагент для його виявлення абсолютно безпечний - розчин йоду в йодистому калії, крохмаль та пеніцилін. В ряді робіт /Леві М. І., 1985, Леві М. І., 1987, Жвірблене А. А., 1987, Леонов С. В., 1989/ підкреслюється, що діагностикуми з використанням β -лактамазних кон'югатів можуть бути перспективними навіть для застосування в польових умовах, бо дозволяють візуально реєструвати результати.

Висновки.

1. Сконструйовано рекомбінантний фаг λ CI 857 β la, який несе в своєму геномі структурний ген β -лактамази β la на основі фагового вектору λ CI 857 та плазмиди pсVII.

2. Отримані та охарактеризовані його похідні, які несуть амбер-мутації в регуляторних генах N та Q і в пізньому структурному гені R . Показано, що ген β la експресується максимально, коли він розміщений під контролем сильних P_{lac} - та P_L -промоторів фагу λ .

3. Підібраний штам-продуцент β -лактамази - клітини *E. coli* W 3101 Su^o. При інфікуванні цього штаму фагом λ CI 857 β la Q^-R^- активність ферменту становила $3,11 \pm 0,06 \cdot 10^5$ од/мл. N^- -похідні фагу λ CI 857 β la виявилися неефективними для системи суперсинтезу β -лактамази.

4. Вперше, на прикладі синтезу β -лактамази показана можливість об'єднання переваг плазмідної та фагозалежної технологій в одній подвійній системі, коли експресія клонованого гену β la йде в клітинах *E. coli* одночасно як в складі плазмиди, так і в складі фагу з позаклітинною локалізацією ферменту в кінці процесу. Вихід білка досягав 800 мг з 1 л культурального середовища.

5. Встановлено пряму кореляцію між кількістю копій клонованого гену в штамі-продуценті та рівнем синтезу продукта, за який він відповідає.

6. Розроблено простий та економічно вигідний препаративний метод виділення та очистки β -лактамази. Вихід білку становить 45% від початкової кількості, а його чистота - 95%.

7. Кон'югати на основі β -лактамази можна порівнювати з кон'югатами, де використовують традиційну пероксидазу - вони мають аналогічну чутливість, що становить 0,1нг/мл для іммуноглобулінів кролика та 10-20 нг/мл для віріонів грипу. Фермент є перспективний для використання в ІФА, оскільки має певні переваги над традиційно вживаними ферментами.

8. Складено лабораторний технологічний регламент на виробництво препарату β -лактамази.

Основні результати дисертації надруковані в таких працях:

1. Сорочинская Т.В., Черных С.И., Левитина Т.Л., Роднин Н.В. / Получение и очистка β -лактамазы TEM I *Escherichia coli*// Биопол. и клетка, 1990, т.6, N 3, С. 99-102.

2. Сорочинская Т.В., Черных С.И., Кордюм В.А. / Оптимизация системы фагозависимого синтеза β -лактамазы TEM I в клетках *Escherichia coli*// - Биопол. и клетка, 1991, т.7, N 2, С. 19-22.

3. Сорочинская Т.В., Черных С.И. / Исследование синтеза β -лактамазы TEM I в различных штаммах *Escherichia coli* при заражении их фагом λ bla с амбер-мутациями в регуляторных генах // Биопол. и клетка, 1991, т.7, N 7, С.101-106.

4. Благодатный В.Н., Гирич В.Н., Палатная Л.А., Крамарев С.А., Сорочинская Т.В., Зезека О.Д., Чопик М.В. / Новые возможности изучения ротавирусных инфекций// Сб. "Вирусы и вирусные заболевания". Киев. - 1994. - с.1-4 (в печати).

5. Кордюм В.А., Черных С.И., Сорочинская Т.В. /Способ получения β -лактамазы // Авт. свид. СССР N 1089110, 1984 г.

6. Черных С.И., Стельмашенко Л.Н., Сахно (Сорочинская) Т.В., Кордюм В.А. / Экспрессия Ар-гена под контролем собственного и *lac*-промоторов в лямбдовых векторах // Тез. докл. 6-го раб. совещания. по программе "Плазмид". - Москва, 1981, с.143.

7. Черных С.И., Стельмашенко Л.Н., Сорочинская Т.В., Кордюм В.А. / Суперсинтез β -лактамазы в клетках *E. coli*, индуцируемый фагом λ *b1a* // Тез. докл. 16-й конфер. ФЕБО. - Москва, 1984, с. 380.

8. Сорочинская Т.В., Леонов С.В. / Использование β -лактамазы TEM I из *E. coli* в твердофазном иммуноферментном анализе // Тез. докл. школы-конфер. "Структура и функции биополимеров". - Львов, 1989, с. 73.

9. Роднин Н.В., Сорочинская Т.В. / Выделение и очистка фермента β -лактамаза TEM I *E. coli* для иммуноферментного анализа // Тез. докл. Всесоюз. конф. "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу. - Черновцы, 1991, т.2, с.136.

10. Перерва Т.П., Мирюта А.Ю., Даниленко Т.С., Бух И.Г., Мартынов С.А., Сорочинская Т.В. / Клонирование мутантной области инициации репликации *E. coli*, обеспечивающей повышенную копияность рекомбинантных плазмид // Тез. доп. VI З'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів ім. М.І. Вавілова. - Полтава, 1992, с. 3

11. Благодатный В.М., Зозуля И.С., Зезека О.Д., Сорочинская Т.В., Дембик И.А., Палатна Л.А., Применова И.А., Петренко Е.В. / Пути совершенствования диагностики инфекционных болезней // Тез. доп. науково-практичної конф. "Актуальні питання мікробіології, епідеміології та імунології ін-

ЛНБ ім. В. Стефаньки
АН УРСР

Фекційних захворювань". - Харків, 1993, С. 53.

12. Sorochinska T.V., Chernykh S.I., Kordium V.A. / Using of the β -lactamase TEM I from *Escherichia coli* for detection of the plant's viruses // Abstr. Intern. Conf. "Fundamental and applied problems in phytovirology". - Yalta, 1994, p. 61.

13. Sorochinska T.V., Chernykh S.I., Kordium V.A. / Synthesis of β -lactamase TEM I in *E. coli* cells based on phage-dependent technology // Abstr. 7th Intern. Congress of Bacteriol. and Appl. Microbiol. Division and 7th International Congress of Mycology Division. - Pragua, 1994, p. 125.

Sorochinska T.V. Research of phagedependent synthesis of β -lactamase in *Escherichia coli* cells.

Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialization 03.00.03 - molecular biology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

In the thesis was submitted the new process for production of β -lactamase, where bla gene expression was carried out by one regulation system with using phage and plasmid vectors. Such system has not any analogues. This method of getting β -lactamase gives high yield of the product (600mg/L) with out-of-cell localization. This is important for the β -lactamase extraction and purification. The extracted and purified β -lactamase preparation was applied for virus and virus specified antibody detecting.

Сорочинская Т.В. Исследование фагозависимого синтеза β -лактамазы в клетках *Escherichia coli*.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология, Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1994.

В диссертационной работе представлен новый способ получения β -лактамазы, при котором экспрессия bla гена осуществляется одной системой регуляции с использованием фагового и плазмидного векторов. Такая система не имеет аналогов. Этот способ получения β -лактамазы дает высокий выход продукта (600 мг/л) с внеклеточной локализацией. Это важно для выделения и очистки β -лактамазы. Выделенный и очищенный препарат β -лактамазы был апробирован для детекции вирусов и вирусспецифических антител.

Ключові слова: β -лактамаза, *Escherichia coli*, фагозалежний синтез, плазмід, ІФА, кон'югати антитіл.

Підписано до друку 14.11.94р. формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ МІ63І

Надруковано ЦУОП ДНПІ "Плодвинконсерв" м. Київ, Саксаганського , 1

11550

AB 31.367