



УДК 577.151.01:577.112.083

РЕКОМБИНАНТНАЯ ДЕСТАБИЛАЗА МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

© 2016 г. А. С. Курдюмов*.,#, В. А. Манувера*.,**, Д. Н. Ахаев***,
И. П. Баскова***, В. Н. Лазарев*.,**

*НИИ Физико-химической медицины ФМБА России,
119435 Москва, Малая Пироговская 1а

**Московский физико-технический институт (ГУ), 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер. 9

***Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 119991

Поступила в редакцию 31.03.2015 г. Принята к печати 20.07.2015 г.

Разработан процесс получения в клетках *Escherichia coli* активной рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки. В ходе работы получены плазмиды, кодирующие аналог природной дестабилазы, а также формы белка, имеющие аффинную полигистидиновую метку, присоединенную к N- и/или C-концу полипептида. Получены штаммы-продуценты различных форм белка, оптимизирован процесс их культивирования. Подобраны условия ренатурации рекомбинантных форм дестабилазы методами диализа и на хроматографическом сорбенте. Исследована ее мурамидазная активность по отношению к клеточным стенкам бактерий *Micrococcus lysodeikticus* и литическая активность по отношению к клеткам *E. coli*. Определена зависимость активностей от pH и ионной силы раствора. Показана общая антибактериальная активность дестабилазы по отношению к клеткам *E. coli*.

Ключевые слова: лизоцим, изопептидаза, дестабилаза, *Hirudo medicinalis*, рекомбинантный белок.

DOI: 10.7868/S0132342316010085

ВВЕДЕНИЕ

Дестабилаза – представитель полифункциональных лизоцимов беспозвоночных, сочетающий в себе свойства эндо-ε-(γ-Glu)-Lys-изопептидазы (КФ 3.5.1.44) [1, 2] и лизоцима (КФ 3.2.1.17) [3]. Впервые дестабилаза (Dest) была выделена из секрета слонных желез медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) [1]. Фермент растворяет стабилизированный фибрин и расщепляет Д-димер до мономеров путем гидролиза изопептидных связей ε-(γ-Glu)-Lys, соединяющих мономеры [4–6]. В экспериментах на животных установлено, что такой механизм приводит к медленному разрушению старых, преобразованных тромбов, что позволяет рассматривать Dest в качестве несрочного тромболитического агента [2]. Также была выявлена мурамидазная активность Dest, которая разрушает клеточные стенки

Micrococcus lysodeikticus [3] – широко используемый субстрат лизоцимов. Кроме того, даже термически инактивированный фермент блокирует рост ряда микроорганизмов [7–9].

Ранее была получена нерастворимая рекомбинантная дестабилаза (EMBL: U24122) медицинской пиявки в клетках *Escherichia coli* путем трансформации плазмидой pQE-30, кодирующей зрелую форму белка, имеющую дополнительную His₆-аффинную метку на N-конце молекулы [8, 10]. Экспрессия рекомбинантного гена под контролем промотора бактериофага T5 обеспечивала уровень накопления рекомбинантного полипептида (N-Dest) не более 5 мг на литр бактериальной культуры. Выделение N-Dest проводили в денатурирующих условиях с использованием металло-хелатной хроматографии (МХХ) с последующей ренатурацией полипептида путем быстрого разбавления. Характерный для этого способа низкий выход целевого белка и несовершенный способ ренатурации ограничивают исследование ферментативных свойств дестабилазы и препятствует началу клинических исследований этого перспективного тромболитического агента. Целью данного исследования стала разработка более эффективного способа наработки, выделения и ренатурации рекомбинантной фор-

Сокращения: Dest – дестабилаза; HEWL – лизоцим куриного яйца; His-Dest – рекомбинантная форма дестабилазы, имеющая His₆-аффинную метку; N-Dest и C-Dest – рекомбинантная форма дестабилазы, имеющая His₆-метку на N- и на C-конце молекулы; min-Dest – рекомбинантный аналог природной формы дестабилазы; IPTG – изопропил-β-D-тиогактопиранозид; МХХ – металло-хелатная хроматография, ИОХ – ионообменная хроматография.

Автор для связи (тел.: +7 (499) 255-28-46;
e-mail: aleks-kuzmaland@bk.ru).

Таблица 1. Сконструированные плазмидные векторы

Номер	Реципиентная плазида	Промотор	Сигнальный пептид	N-His ₆	Dest	C-His ₆	Полученная плазида
1	pBAD/GIII B	araB	GIII	–	+	+	pBAD/GIII/Dest
2	pBAD/Myc-His A		–	–	+	+	pBAD/Dest
3	pET-32a	T7	–	–	+Trx	+	pET-32a/Dest
4	pET-15MCS		–	+	+	–	pET-15/N-Dest
5	pETmin		–	–	+	+	pETmin/C-Dest
6			–	–	+	–	pETmin/min-Dest
7	pURLV	Pudp	SAV	–	+	+	pURLV/Dest
8	pURLH		SEH	–	+	+	pURLH/Dest
9	pURLB		SEB	–	+	+	pURLB/Dest
10	pURLT		TorA	–	+	+	pURLT/Dest
11	pUC18R(H)	T7	–	–	+	+	pUC18/Dest
12	pET-15MCS		–	+	+	–	pET-15/N-Dest*
13	pETmin		–	–	+	+	pETmin/C-Dest*
14			–	–	+	–	pETmin/min-Dest*

мы дестабилазы. В результате нам удалось достичь выхода белка не менее 30 мг в пересчете на литр исходной бактериальной культуры. Полученные значительные количества рекомбинантной дестабилазы позволили более полно охарактеризовать ее ферментативные свойства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плазмиды, кодирующие дестабилазу

С целью обеспечения высокого уровня накопления рекомбинантной дестабилазы в *E. coli* нами был сконструирован ряд плазмид, содержащих структурную часть гена дестабилазы под контролем различных промоторов: поздних генов бактериофага T7 (серия плазмид pET: pET32a, кодирующая тиоредоксин, pET15MCS и pETmin, полученные на основе pET-22b и pET-15b с измененным полилинкером), промоторно-операторной области гена уридинфосфорилазы *E. coli* (серия плазмид pURL [11]: pURLV с сигнальным пептидом стрептавидина, pURLH и pURLB с сигнальным пептидом стафилококкового энтеротоксина H и B, соответственно, pURLT с сигнальным пептидом триптамин-N-оксидоредуктазы *E. coli* и pUC18R(H)), промоторной области арабинозного оперона *E. coli* (серия плазмид pBAD: pBAD/GIII B с сигнальным пептидом GIII (капсидный белок фага fd) и pBAD/Myc-His A). Они перечислены в табл. 1 (плазмиды № 1–11).

Таким образом, с помощью вышеперечисленных векторов в 11 искусственных генетических системах было получено 3 новых варианта поли-

пептидной цепи белка: с добавочной His₆-аффинной меткой на N-конце и/или C-конце молекулы (N-Dest, C-Dest) и без таковой (min-Dest).

Определение уровня накопления рекомбинантной дестабилазы в клетках *E. coli*. На первом этапе работы было определено наличие рекомбинантной дестабилазы в трансформированных клетках *E. coli* и ее внутриклеточная локализация. Для трансформации использовались штаммы *E. coli*, совместимые с регуляторной областью рекомбинантных плазмид (табл. 1, № 1–11) и обеспечивающие высокий уровень экспрессии гена дестабилазы: Top10 в случае плазмид 1, 2, 7–11; Origami (DE3), Origami (DE3) pLysS, BLR, BLRpLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21 Gold (DE3), B834 в случае плазмид 3–6. После инкубации в условиях, необходимых для активации экспрессии под контролем промотора, в каждом случае клетки *E. coli* фракционировали на периплазматическую фракцию, фракцию растворимых белков и фракцию нерастворимых белков. Полученные образцы анализировали путем денатурирующего электрофореза в ПААГ.

Было установлено, что при использовании полученных плазмид рекомбинантная дестабилаза либо накапливалась во фракции нерастворимых белков (плазмиды № 1–6 семейства pBAD и pET), либо не обнаруживалась вовсе (плазмиды № 7–11 семейства pURL). Подобрать условия культивирования, обеспечивающие накопление растворимой формы, не удалось. Плазида № 3 (pET32/Dest), кодирующая слитый белок дестабилазы с тиоредоксином (Trx-Dest), была получена в расчете на на-

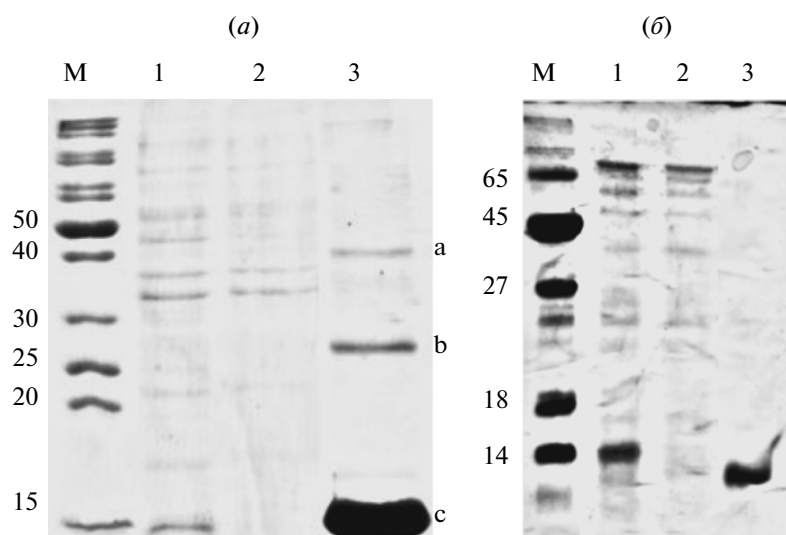


Рис. 1. Электрофоретический анализ в 15% ПААГ фракций, полученных в результате хроматографии раствора телл включений, содержащих N-Dest, на никель-агарозе (а) и ренатурированной min-Dest на CM-сефарозе (б). а: 1 – исходный образец до очистки; 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; 3 – фракция белков, связавшаяся с сорбентом, в которой отмечены полосы (а, б, с), которые по результатам MALDI-TOF образованы дестабилазой. б: 1 – исходный образец до очистки; 2 – фракция белков, не связавшихся с сорбентом; 3 – фракция, имеющая в процессе градиентной элюции максимальное значение A_{280} . М – маркеры молекулярных масс (в кДа). Здесь и далее окраска ге-ля осуществлялась с помощью Кумасси G-250.

копление рекомбинантного белка в растворимой форме в цитоплазме клеток *E. coli*. Однако эксперименты показали, что даже несмотря на наличие тиоредоксина целевой белковый продукт выпадает в осадок, поэтому дальнейших работ с ней не проводили. Уровень накопления дестабилазы в трансформированных клетках, несущих плазмиду pETmin/C-Dest, был выше, чем в случае pBAD/GIII/Dest, которая в дальнейшем не использовалась. Таким образом, для последующей оптимизации генетических систем были выбраны плазмиды pET-15/N-Dest, pETmin/C-Dest и pETmin/min-Dest.

Оптимизация уровня накопления дестабилазы.

После определения уровня накопления дестабилазы в культурах клеток *E. coli* были предприняты дальнейшие шаги по оптимизации генетических конструкций. Вследствие того, что дестабилаза является ферментом животного происхождения, частота встречаемости кодонов в кодирующей части ее гена сильно отличается от оптимальной для *E. coli*. С целью повысить выход рекомбинантного белка при гетерологической экспрессии в *E. coli*, из олигонуклеотидов была синтезирована новая структурная часть гена, кодирующая тот же белок, но оптимизированная по кодонному составу.

В плаزمидях № 4–6 (pET-15/N-Dest, pETmin/C-Dest и pETmin/min-Dest) ген, кодирующий дестабилазу, был оптимизирован по кодонному составу для *E. coli* что позволило повысить выход дестабилазы примерно на 30%. Дальнейшие эксперименты по определению уровней рекомбинантного белка и сравнению активностей проводили с использо-

ванием реконструированных плазмид, получивших названия pET-15/N-Dest*, pETmin/C-Dest*, pETmin/min-Dest* (плазмиды № 12–14).

Таким образом, в общей сложности мы сконструировали четырнадцать плазмид, несущих ген дестабилазы под контролем трех различных промоторов. Кодированные белки имели в своем составе различные дополнительные элементы – His₆-аффинные метки, сигнальные пептиды, тиоредоксин (табл. 1).

Далее были проведены эксперименты по подбору сред и оптимальных условий культивирования, в результате чего выбраны условия роста культур, описанные в разделе “Эксперимент. часть”.

Выделение и ренатурация форм рекомбинантной дестабилазы, имеющих в своем составе аффинную метку. Для растворения рекомбинантных форм дестабилазы с His₆-аффинной меткой (His-Dest) тельца включения растворяли в Na-фосфатном буфере в присутствии 8 М мочевины. Очистку His-Dest выполняли с помощью MXX в денатурирующих условиях (рис. 1а). Фракции, содержащие целевой белок, анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ. На электрофореграмме, представляющей анализ фракции элюата N-Dest, полученной с помощью экспрессии рекомбинантного гена в составе плазмиды 12 (табл. 1), четко различимы три полосы (а, б и с, рис. 1а). С помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии установлено, что все они отвечают дестабилазе. Таким образом, дестабилаза формирует устойчивые олигомерные комплексы, не разрушаемые

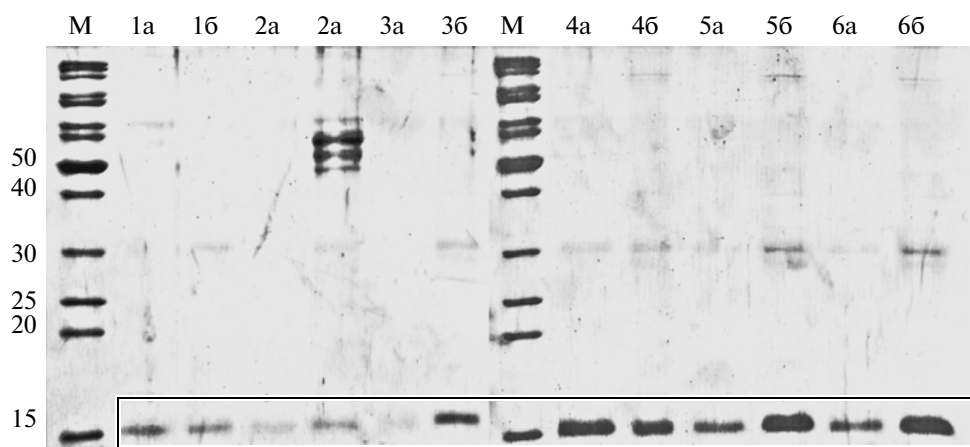


Рис. 2. Электрофоретический анализ растворимости фракций N-Dest в 15% ПААГ после проведения одностадийного диализа денатурированных образцов белка против 20 мМ Трис-НСl (дорожки 1–3) или против 20 мМ натрий-фосфатного буфера (дорожки 4–6) при различных значениях pH. 1, 4 – pH 5.0; 2, 5 – pH 6.0; 3, 6 – pH 7.0; а – раствор, б – осадок. М – маркеры молекулярных масс (в кДа). Рамкой на электрофореграмме отмечено положение рекомбинантной дестабилазы.

даже в процессе ЭФ-пробоподготовки при пятиминутном кипячении в растворе, содержащем 1% SDS и 2% 2-меркаптоэтанол.

В составе полипептидной цепи дестабилазы содержится 14 остатков Cys. Природная форма белка предположительно образует семь дисульфидных связей [12], поэтому для получения активного препарата потребовался тщательный подбор условий ренатурации. Ранее задача ренатурации дестабилазы решалась методом быстрого разведения [8]. Применение данного метода ограничено из-за больших потерь и низкой концентрации конечного продукта. Поэтому, на примере N-Dest мы провели эксперименты по подбору и оптимизации условий ренатурации дестабилазы методом диализа. На первом этапе установили значение pH буфера, при диализе против которого наибольшее количество белка остается в растворе.

Диализ против буферных растворов, содержащих 20 мМ Na-фосфат или 20 мМ Трис-НСl, в течение 18 ч при 4°C очищенной MXX N-Dest проводили при значениях pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 и 9.0. Полученные пробы анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (рис. 2). Оказалось, что с увеличением pH в обоих случаях уровень перехода в растворимую форму уменьшался, и при значениях pH 8.0 и 9.0 независимо от состава буферного раствора белок полностью выпадал в осадок. Поскольку ренатурация против Na-фосфатного буфера проходила эффективнее, чем против буфера Трис-НСl в дальнейшем для диализа всех рекомбинантных вариантов дестабилазы использовали 20 мМ Na-фосфат при значении pH 5.0.

В ранее описанном способе ренатурации дестабилазы быстрым разведением буфер содержал смесь окисленного и восстановленного глутатиона [8]. В нашем же случае, добавление глутатиона в буферную смесь при диализе не оказывало влияния на выход растворимого белка.

Для формы N-Dest также была исследована зависимость эффективности рефолдинга от температуры проведения диализа и от концентрации белка в исходной пробе. Как и ожидалось, понижение температуры проведения диализа и уменьшение концентрации белка в исходной пробе положительно сказывались на выходе растворимого препарата. Для анализа влияния времени на выход растворимого продукта было проведено сравнение эффективности одностадийного диализа с 4-ступенчатым диализом при уменьшающейся концентрации мочевины в буфере (8 М → 4 М, 4 М → 2 М, 2 М → 1 М, 1 М → 0 М). Эффективность ренатурации ступенчатым диализом оказалась выше, чем при одностадийном диализе. Было установлено, что в этом случае в растворе остается около 70% от исходного количества N-Dest, по сравнению с 50% в случае одностадийного диализа.

C-Dest при проведении диализа в описанных условиях вела себя сходно с N-Dest (данные не приведены).

Выделение и ренатурация рекомбинантной формы дестабилазы без аффинной полигистидиновой метки. В случае варианта min-Dest, полученной при трансформации клеток плазмидой № 14, для оптимизации условий выхода активной формы рекомбинантного препарата мы применили два подхода. В первом ренатурировали неочищенную дестабилазу с последующей очисткой путем ионообменной

хроматографии (ИОХ). Во втором проводили ИОХ, сопряженную с рефолдингом.

На первом этапе солиubilизированные тельца включения диализовали против 20 мМ Na-фосфата, 20 мМ Трис-НСl, 20 мМ Na-цитрата или 20 мМ Na-ацетата при различных значениях рН (от 4.0 до 9.0) с добавлением к образцам либо 2-меркаптоэтанола (0.1%), либо дитиотреитола (15 мМ), либо PEG4000 (5%). Наилучший результат показало использование раствора Na-цитрата без дополнительных компонентов. Введение в образцы 5% PEG4000 на результат не влияло, а добавление 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола приводило к полному выпадению белка в осадок при всех значениях рН. Поскольку растворимость формы min-Dest начинает снижаться при значении рН > 6.0, а количество примесных белков значительно увеличивается, сделан вывод, что оптимальным представляется выбор значения рН, равное 5.0.

Далее, было проведено определение влияния температуры диализа на выход растворимого продукта. Зависимость оказалась прямо обратной той, что наблюдалась в случае N-Dest. При снижении температуры количество белка, выпавшего в осадок, возрастало. Поэтому в дальнейшем диализ min-Dest проводили при комнатной температуре.

Дальнейшую очистку ренатурированной формы min-Dest осуществляли с помощью ИОХ на CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) (рис. 1б). Этот способ очистки дестабилазы оказался эффективным и позволил значительно повысить степень чистоты препарата. Однако, более перспективным видится объединение очистки и ренатурации в один процесс с использованием ИОХ.

Сопряженный с очисткой процесс ренатурации проводили с использованием CM-сефарозы путем плавного снижения концентрации мочевины в хроматографической колонке с последующей градиентной элюцией раствором NaCl (0 → 250 мМ) в присутствии 20 мМ карбоната натрия. Данный метод рефолдинга позволяет получить белок min-Dest в растворимой форме и добиться значительной его очистки. Кроме того, как было показано далее, фермент, ренатурированный и очищенный одностадийным методом, имел бóльшую мурамидазную активность в сравнении с min-Dest, полученной в результате метода, предусматривающего очистку ИОХ уже заранее отдиализованного материала. Это может быть связано с тем, что не весь растворимый белок является активным и правильно свернутым.

Определение литической активности полученных рекомбинантных форм дестабилазы. Для оценки активностей полученных рекомбинантных форм белка были использованы два метода. Один из них является классическим методом определения ферментативной активности лизо-

цимов [3] и основан на гидролизе очищенных клеточных стенок *M. lysodeikticus*. Однако, помимо мурамидазной активности, Dest обладает и антибактериальными свойствами [8]. Поэтому, в дополнение к общепринятому методу, был разработан и другой подход, основанный на разрушении клеток *E. coli* с поврежденной дестабилазой клеточной стенкой при осмотическом шоке. Таким образом, мы определяли литическую активность дестабилазы по отношению к клеткам *E. coli*. Стоит отметить, что использование обоих методов дало сходные результаты, повышая их достоверность.

Способ анализа литической активности основан на определении методом Брэдфорд концентрации белка, выделившегося из клеток *E. coli*, обработанных дестабилазой. Данный метод позволяет определить общую антибактериальную активность фермента: после обработки клеток дестабилазой происходит как специфичное разрушение внешней клеточной стенки (фермент проявляет непосредственно мурамидазную функцию), так и неспецифичное (для инактивированной дестабилазы показано наличие ярко выраженной антимикробной активности, механизм которой до конца не ясен). После разрушения внешней мембраны, клетки *E. coli* подвергались осмотическому шоку, и происходило высвобождение в раствор цитоплазматических белков, по концентрации которых можно было судить об активности фермента. Для отработки метода были взяты клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)gold-pETmin. Вначале был проведен подбор условий инкубации клеток и состав буфера, в котором ресуспендируются клетки при рН 7.0. Были опробованы следующие буферы: 20 мМ Трис-НСl; 20 мМ Трис-НСl, 10 мМ EDTA (буфер TE); 20 мМ Na₂HPO₄; PBS. В этих условиях при обработке клеток дестабилазой наблюдалась их сильная агрегация и слипание. Поэтому было решено использовать гипертонический буфер с 20% сахарозой на основе буфера TE. Клетки ресуспендировали и инкубировали с ферментом или без него (лизоцим куриного яйца (HEWL) использовался в качестве положительного контроля) в гипертоническом буфере, затем подвергали осмотическому шоку путем восьмикратного разведения водой. N-Dest в данном тесте проявляла ярко выраженную активность, в то время как C-Dest была не активна.

Также была определена зависимость концентрации выделившегося из клеток *E. coli* белка от концентрации N-Dest (рис. 3). В диапазоне N-Dest от 5 до 15 мкг/мл зависимость концентрации бактериальных белков в клеточном лизате от концентрации фермента была линейная, при больших концентрациях наступало насыщение.

Были определены оптимальные для работы N-Dest значения рН (рис. 4а, 4б) и ионной силы буферных растворов (рис 4с, 4д), которая изменя-

лась путем добавления хлорида натрия. Максимальное значение активности N-Dest получено при значении pH 9.0 и 0.3–0.4 M NaCl.

В заключение, при подобранных оптимальных условиях мы провели сравнение активностей N-Dest, C-Dest и min-Dest с активностью лизоцима куриного яйца (HEWL). Результаты представлены на рис. 5а. Активность рекомбинантных препаратов N-Dest и min-Dest составляла 70% активности HEWL. У C-Dest активность практически не выражена. Это свидетельствует о том, что на активность рекомбинантного варианта фермента влияет не только наличие His₆-аффинной метки, но и ее расположение на N- или C-конце полипептида.

Определение мурамидазной активности дестабилазы. Клеточные стенки *M. lysodeikticus* в концентрации 0.5 мг/мл суспендировали в растворе 20 mM Na-цитрата. Рекомендованный для N-Dest оптимальный диапазон pH работы методом просветления суспензии клеточных стенок (pH 7.0–10.0) совпадает с диапазоном, полученным для него методом определения концентрации выделившегося белка из бактериальных клеток, но мурамидазная активность сохраняется в более широких пределах.

Вследствие того, что разные формы белка предположительно имеют разные оптимумы pH, был определен оптимальный диапазон pH для min-Dest. По сравнению с N-Dest, этот показатель для min-Dest сдвигается в сторону кислых pH до значения pH 6.0. Определена сравнительная мурамидазная активность полученных дестабилаз. На рис. 5б показан уровень просветления клеточных стенок *M. lysodeikticus*, обработанных N-Dest, C-Dest, min-Dest. В этих условиях наибольшей активностью обладала форма min-Dest, чья очистка и рефолдирование одностадийно проводилась с помощью ИОХ на СМ-сефарозе.

Приведенные данные показывают, что C-Dest заметной мурамидазной активностью не обладает, что согласуется с результатами, полученными предыдущим методом. Мурамидазная же активность min-Dest многократно превосходила активность других образцов. Следует отметить, что метод определения концентрации выделившегося из бактериальных клеток белка, описанный выше, такой разницы не демонстрировал. По всей видимости, это объясняется тем, что в одном случае измеряется специфическая лизоцимная активность, а в другом — результат комплексного воздействия на бактериальную клетку фермента и осмотического шока.

Определение антибактериальной активности рекомбинантной дестабилазы по отношению к *E. coli*. Для определения жизнеспособности клеток после обработки дестабилазой был выбран метод подсчета колоний, выросших на твердой пита-

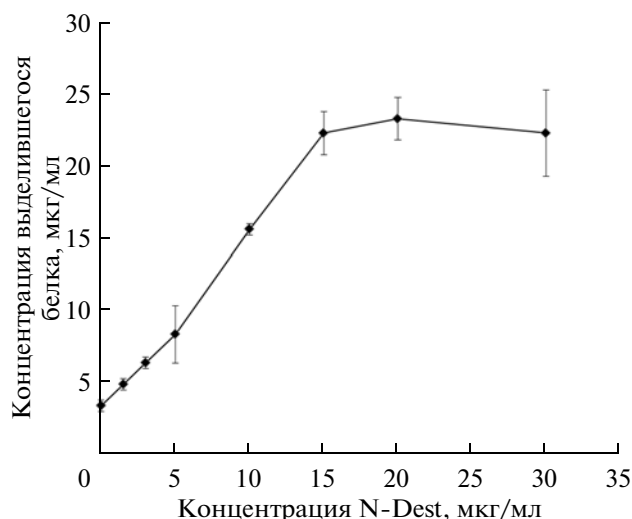


Рис. 3. Оценка литической активности препарата N-Dest по отношению к клеткам *E. coli* штамма BL21(DE3)gold-pETmin в зависимости от концентрации. Измерение количества суммарного белка в пробе проводили методом Бредфорд после добавления фермента в различной концентрации к суспензии клеток ($n = 5, p < 0.05$).

тельной среде (рис. 6). Все синтезированные формы дестабилазы обладали четко выраженной антибактериальной активностью, в том числе C-Dest, которая не обнаруживала лизоцимной активности. Полученный результат подтверждает ранее известный факт, что антибактериальные свойства дестабилазы не обусловлены только ее лизоцимной активностью и проявляются даже у белка, который не обладает таковой. Например, в работе [8] описаны эксперименты по анализу антимикробного действия дестабилазы на клеточные стенки археи *Methanosarcina barkeri*, которые состоят преимущественно из белков и гетерополисахаридов, но не содержат ни муреина, ни псевдомуреина, гидролизуемых мурамидазами. Дестабилаза вызывает практически полный лизис клеток данного организма. При этом наблюдается образование характерного осадка — флокков, что свидетельствует о нарушении нормального физиологического состояния культуры. Кроме того, антимикробная активность дестабилазы, инактивированной путем длительного прогрева, была показана на грибах *Botrytis cinerea*, дрожжах *Schizosaccharomyces pombe*, грамположительных (*M. lysodeikticus*) и граммотрицательных (*E. coli*) бактериях [9].

Заключение

В ходе работы получены бактериальные штаммы, продуцирующие различные формы дестабилазы — как несущие His₆-аффинную метку, так и без нее. Был отработан процесс выделения и ренатурации вариантов рекомбинантных форм белка.

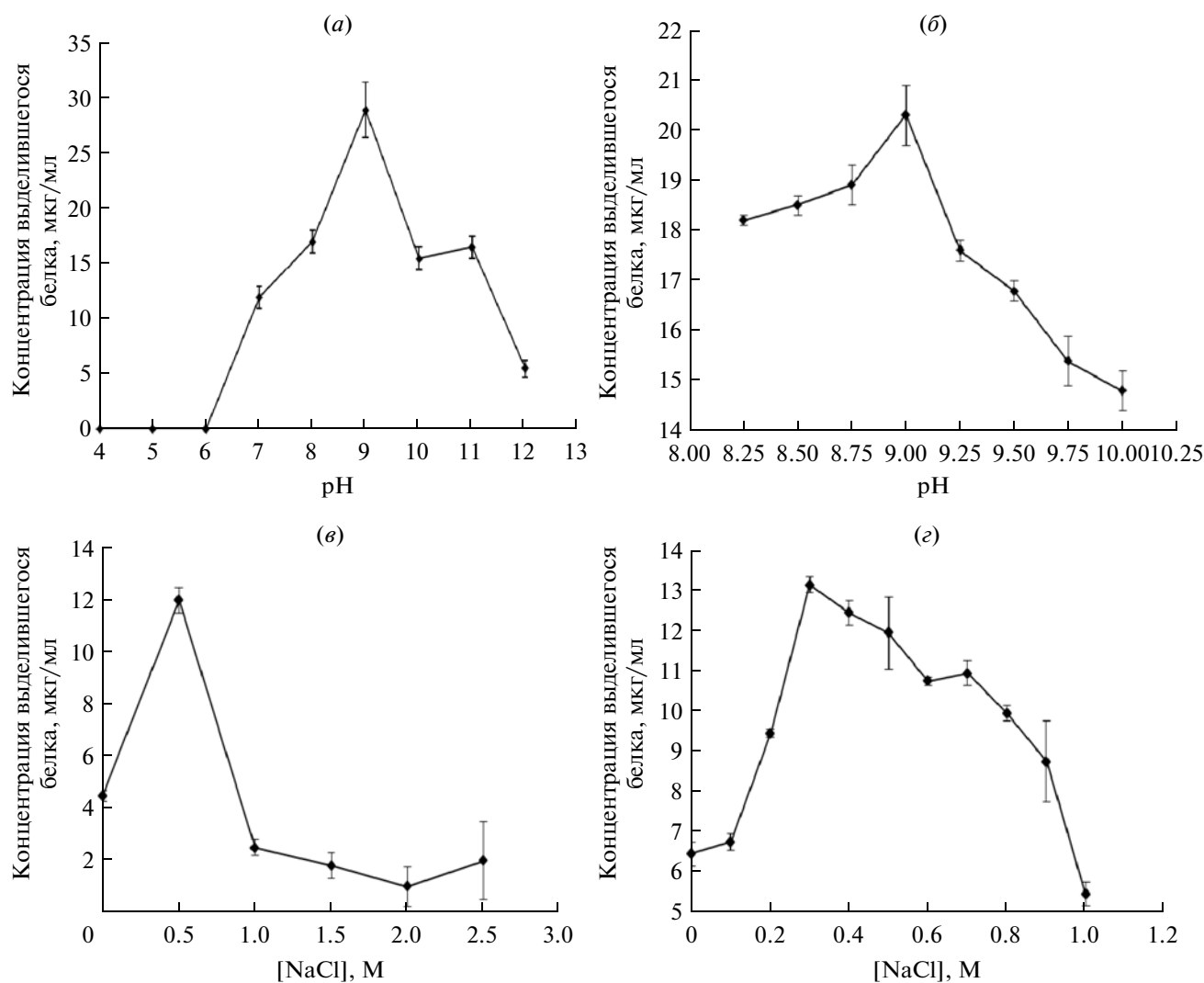


Рис. 4. Оценка литической активности препарата N-Dest по отношению к клеткам *E. coli* штамма BL21(DE3)gold-pETmin в зависимости от pH (а, б) и ионной силы буфера при pH 9.0 (в, г). Измерение количества суммарного белка в пробе проводили методом Бредфорд после добавления фермента в различной концентрации к суспензии клеток ($n = 5, p < 0.05$).

Определена мурамидазная активность полученного фермента по отношению к клеточным стенкам *M. lysodeikticus* и литическая по отношению к клеткам *E. coli*. Установлено, что максимальную лизоцимную активность N-Dest проявляет при значении pH 8.8–9.0 и концентрации 0.3 M NaCl. Аналог природного белка, не содержащий в своем составе дополнительных гексагистиридиновых участков (min-Dest), проявляет максимальную активность при значении pH 6.0. Показано 10-кратное снижение жизнеспособности клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)-gold/pETmin после обработки дестабилазой по сравнению с необработанными клетками. Причем активность формы His-Dest во всех экспериментах была ниже, чем у формы min-Dest, что, по-видимому, связано с нарушением пространственной организации молекулы при наличии аффинной метки. Форма C-Dest, не имею-

щая лизоцимной активности, сохраняет способность подавлять рост бактерий, что подтверждает показанные в предыдущих работах антибактериальные свойства инактивированной дестабилазы. Результаты данной работы могут быть использованы для дальнейшего исследования полифункционального фермента – рекомбинантной дестабилазы медицинской пиявки и принципиальной возможности его практического применения в качестве тромболитического препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы. В работе использованы реактивы фирм “Merck” (Германия), “Sigma” (США), “Хеликон” (Россия) и реактивы квалификации х.ч. и о.с.ч. отечественного производства; наборы для рестрикции, лигирования и

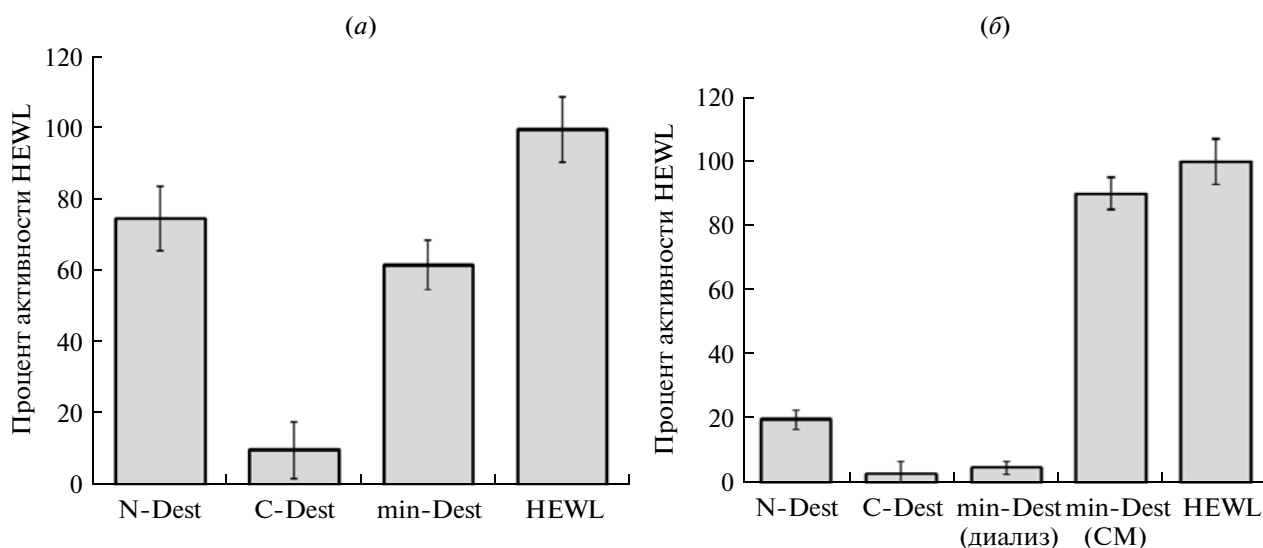


Рис. 5. Оценка лизоцимной активности рекомбинантных препаратов N-Dest, C-Dest, min-Dest после рефолдинга. min-Dest (диализ) – предварительно диализованная и очищенная форма, min-Dest (CM) – форма, чья очистка была сопряжена с диализом. *a* – литическая активность по отношению к клеткам *E. coli*, определенная по количеству высвобожденного белка, *б* – мурамидазная – по методу просветления суспензии клеточных стенок *M. lysodeikticus*. Активность ферментов выражена в процентах от активности HEWL ($n = 6, p < 0.05$).

ПЦР фирмы Thermo Scientific (США), Таq-полимеразу (НПФ “Литех”, Россия), ампициллин ОАО “Синтез” (Россия); дрожжевой экстракт, бактоагар, триптон, пептон Difco (США), клеточные стенки *M. lysodeikticus* “MP Biomedicals, LLC” (Франция), HEWL, протеиназу К, РНК-азу А Sigma-Aldrich, (США). Использовали ДНК-маркеры молекулярной массы, белковые маркеры молекулярной массы фирмы “Thermo Scientific” (США); бычий сывороточный альбумин (BSA) и Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent фирмы Bio-Rad (США). Наборы GeneJET Gel Extraction Kit и GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Хроматографические сорбенты CM Sepharose® Fast Flow и Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare Life Sciences, США).

Штаммы и плазмиды. В работе были использованы бактериальные штаммы *E. coli* Top10, Origami (DE3), Origami (DE3) pLysS, BLR, BLRpLysS, BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)gold, B834 фирм Novagen (США) и Life Technologies (США). В процедурах клонирования и экспрессии использовали плазмиды серии pET (Novagen, США) и pBAD (Life Technologies, США). Плазмиды pURLV, pURLH, pURLB, pURLT, pUC18R(H) были получены ранее [12].

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 20–25 мкл в присутствии 2–3 мМ MgCl₂; 0.2 мМ каждого из dNTP; 67 мМ Трис-НСl (рН 8.3); 16.7 мМ (NH₄)₂SO₄; 0.5 ед. Таq-полимеразы; 1–10 нг ДНК; 5 пмоль каждого праймера. Режим амплификации (°С/с): 1) 95/120; 2) 95/10; 3) 60/10; 4) 72/20; 5)

72/180. Стадии 2–4 – 25–30 циклов; стадии 1, 5 – 1 цикл.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд с использованием реагента Bio-Rad Protein Assay и стандартных растворов BSA (Bio-Rad, США) по протоколу High concentration assay от производителя.

Конструирование плазмид с контролем экспрессии промотором арабинозного оперона *E. coli*. Для клонирования участка, кодирующего дестабилазу, были использованы коммерчески доступные плазмиды pBAD/GIII-B и pBAD/Мус-HisA (Life Technologies, США). Кодированную часть гена дестабилазы амплифицировали путем ПЦР с ис-

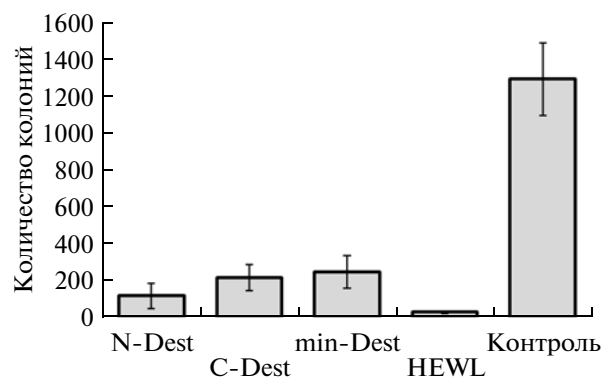


Рис. 6. Оценка антимикробной активности препаратов N-Dest, C-Dest, min-Dest после рефолдинга. Подсчет колоний *E. coli* визуально осуществлялся на чашках Петри после обработки ферментами.

Таблица 2. Последовательности используемых олигонуклеотидов (5' → 3')

Название	Последовательность
DstN-Sal	ATAGTCGACTCTCAAACATTTCTGTACCTTG
DstN-Bam	TTGGATCCCAATTCACCTGATTCTTGCCCTTC
DstN-Bgl	TTAGATCTCAATTCACCTGATTCTTGCCCTTC
DstN-min	ATAGTCGACTTATCTCAAACATTTCTGTACCTTG
15MCSf	TATGGGATCCCCCGGGGTCGACGGTACCT
15MCSr	GATCAGGTACCGTCGACCCCGGGGGATCCCA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
DsEc-Bam	TGGATCCCAGTTTACCGATAGCTGCCTGCGTTGCATTTGCAAAG
DsEc-02	CCTGCGTTGCATTTGCAAAGTGGAAAGGCTGCGATAGCCAGATTG
DsEc-03	AGGCTGCGATAGCCAGATTGGCAAATGCGGCATGGATGTGGGCAG
DsEc-04	TGCGGCATGGATGTGGGCAGCCTGAGCTGCGGTCCGTATCAGAT
DsEc-05	AGCTGCGGTCCGTATCAGATTAAGAAACCGTATTGGATTGATTGC
DsEc-06	GAAACCGTATTGGATTGATTGCGGCAAACCGGGTGGTGGCTATGA
DsEc-07	CAAACCGGGTGGTGGCTATGAAAGCTGCACCAAAAACAAGCGTG
DsEc-08	TACGCACGCACGCAGGTTTTCGCTGCACGCTTTGTTTTTGGTGCAG
DsEc-09	GCAAAGGTGCCATAACGTTTTATATACGCACGCACGCAGGTTTTCG
DsEc-10	CAGGTCGGAGTACGACCACCGGTGCAAAGGTGCCATAACGTTTTCA
DsEc-11	CGTTATGAATACGCGCATAATCCTGGCAGGTCGGAGTACGACCAC
DsEc-12	GCTTTTGCAGCCACGCGGACCACCGTTATGAATACGCGCATAATC
DsEc-13	TGTTCCAATAGCCCACGGTCGCGCTGCTTTTGCAGCCACGCGGA
DsEc-14	TCAACGCAGGCATTTCTGCACTTTGTTCCAATAGCCCACGGTC
DsEc-Sal	ATTAGTCGACTCAACGCAGGCATTTCTGCA

пользованием олигонуклеотидов DestN-Bgl и DestN-Sal (табл. 2) и плазмиды pQE-Dest [8] в качестве матрицы. Полученный ДНК-фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglII и SalI. Реципиентные плазмиды pBAD/GIII-B и pBAD/Мус-His обрабатывали теми же эндонуклеазами, лигировали с полученным фрагментом и трансформировали продуктами реакции клетки *E. coli* Top10, которые высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Выросшие колонии анализировали путем ПЦР с использованием олигонуклеотидов DestN-Bgl и DestN-Sal (табл. 2). Колонии, содержащие плазмиды со вставкой, пересевали в жидкую среду LB, после чего из культуры выделяли плазмидную ДНК. Соответствие структуры полученных плазмид подтверждали путем секвенирования по методу Сэнгера с использованием капиллярного секвенатора AbiPrism 3730xl (Applied Biosystems, США).

Конструирование плазмид с контролем экспрессии промотором гена уридинфосфорилазы *E. coli*.

Фрагмент ДНК, кодирующий дестабилазу, был клонирован в составе плазмид pURLB, pURLH, pURLV, pURLT и pUC18R(H) [12]. Кодированная часть гена была амплифицирована путем ПЦР с использованием олигонуклеотидов DestN-Bam и DestN-Sal (табл. 2) и плазмиды pQE-Dest в качестве матрицы. Полученный ДНК-фрагмент и реципиентную плазмиду расщепляли эндонуклеазами BamHI и SalI. Дальнейшие действия проводились аналогично тому, как это описано выше.

Реципиентные плазмиды pETmin и pET15MCS. На основе коммерчески доступных плазмид pET-22b и pET-15b (Novagen, США) были получены плазмиды с измененным полилинкером (pET15MCS) и вырезанным участком, кодирующим сигнальный пептид (pETmin). Для этого pET-22b и pET-15b обрабатывали эндонуклеазами NdeI и BamHI. К раствору расщепленной плазмиды добавляли предварительно прогретый раствор, содержащий эквивалентные количества олигонуклеотидов 15MCSf и 15MCSr (табл. 2) в молярном отношении олигонуклеотид–плазмиды, равном 2000 : 1. Таким образом, на основе плазмиды pET-15b была получена плазми-

да рЕТ15MCS, содержащая, как и исходная, участки, кодирующие His₆-аффинную метку и сайт расщепления тромбина, за ним следует введенный полилинкер, заканчивающийся терминатором трансляции. На основе плазмиды рЕТ-22b была получена плазида рЕТmin, в которой участок ДНК, кодирующий сигнальный пептид, был заменен полилинкером.

Плазмиды рЕТmin/C-Dest и рЕТ15/N-Dest. Для получения форм дестабилазы, имеющих в своем составе гексагистидиновые участки в N-концевой либо C-концевой части, с использованием олигонуклеотидов DestN-Vam и DestN-Sal (табл. 2) и матричной ДНК – плазмиды рQE-Dest, была амплифицирована структурная часть гена, не содержащая стоп-кодона. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмид рЕТ15MCS и рЕТmin по сайтам BamHI и SalI, для чего плазмиду рЕТ15MCS расщепляли с помощью тех же ферментов, а рЕТmin – посредством BamHI и XhoI.

Плазида рЕТmin/min-Dest. Для получения дестабилазы, не имеющей дополнительной His₆-аффинной метки, в плазмиду рЕТmin был встроено участок ДНК, кодирующий дестабилазу и имеющий стоп-кодон. Конструирование проводили аналогично тому, как это описано для рЕТmin/C-Dest, за исключением того, что для амплификации использовали олигонуклеотиды DestN-Vam и DestN-min (табл. 2).

Плазида рЕТ32/Dest. Структурная часть гена дестабилазы, имеющая стоп-кодон, была ПЦР-амплифицирована с использованием олигонуклеотидов DestN-Vam и DestN-Sal (табл. 2) и матричной ДНК – плазмиды рQE-Dest. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в составе плазмиды рЕТ-32a(+) (Novagen, США). Для этого ПЦР-фрагмент, очищенный с помощью электрофореза в агарозном геле, обрабатывали ферментами BamHI и SalI. Плазмиду расщепляли с помощью тех же ферментов.

Оптимизированный по кодонному составу фрагмент ДНК, кодирующий дестабилазу, был получен путем ферментативной дестройки синтетических олигонуклеотидов (табл. 2). Для этого готовили смесь, олигонуклеотидов DsEc02–DsEc14 с концентрацией каждого 10 мкМ. 1 мкл смеси переносили в пробирку, содержащую 20 мкл раствора следующего состава: однократный ПЦР-буфер (Литех, Россия), 0.2 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0.25 ед. Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали циклическому изменению температуры в режиме: 95°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 15 с, суммарно 25 циклов. Продукты реакции использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с использованием олигонуклеотидов DsEc-Vam и DsEc-Sal в качестве праймеров. ПЦР-фрагмент клонировали в составе плазмид рЕТ15MCS и рЕТmin.

Культивирование штаммов-продуцентов дестабилазы. Отдельные колонии *E. coli* BL21(DE3)gold-pET15/N-Dest* высевались в среду SB (50 мл) без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Ночную культуру добавляли к свежей среде SB в количестве 1/20 объема (1 литр) и подращивали до значения OD₆₀₀ = 0.8, после чего в культуру добавляли лактозу до концентрации 10 мМ и растили 6–7 ч при 37°C. Отдельные колонии *E. coli* BL21(DE3)gold-pETmin/min-Dest* высевались в среду LB2x без индуктора и культивировались при 37°C в течение ночи. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в объеме свежей среды LB2x, равном объему исходной ночной культуры. После инкубации в течение 1 ч при 25°C добавляли IPTG до концентрации 1 мМ. Растили 8 ч при 25°C.

Выделение тельц включения. Биомассу осаждали центрифугированием при 5000 g 15 мин и ресуспендировали в буфере для лизиса (20 мМ Трис-Cl, 100 мМ NaCl, 0.1% TritonX-100), после чего разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson 250 Sonifier (Branson, США) при 22 кГц 10 мин. Лизат центрифугировали (20000 g, 15 мин). Полученный осадок ресуспендировался в 1% растворе Triton X-100 и осаждался центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин. Отмывку детергентом повторяли трехкратно, после чего однократно промывали PBS. Отмытые тельца включения, содержащие His-Dest, солиобилизировали в буфере А (8 М мочевины, 20 мМ Na-фосфат, 10 мМ имидазол, 0.5 М NaCl, 0.1% 2-меркаптоэтанол, pH 7.5) из расчета не менее 10 мл буфера на тельца включения, полученные из 1 л культуры. Отмытые тельца включения min-Dest солиобилизировали в буфере Б (8 М мочевины, 20 мМ цитрат натрия, 0.1% 2-меркаптоэтанол, pH 5.0) из расчета не менее 5 мл буфера на тельца включения, полученные из 1 л культуры. Раствор инкубировался 1 ч при 50°C. Растворимую фракцию отделяли от осадка центрифугированием (15000 g, 15 мин), отбирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм (Sartorius).

Очистка His-Dest методом МХХ в денатурирующих условиях. Тельца включения, содержащие His-Dest, растворяли в буфере А. Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку XK-16/20 (GE Healthcare, США), наполненную 10 мл сорбента Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare, США) и уравновешенную тем же буфером. Затем колонку последовательно промывали буфером А (не менее 50 мл) и буфером А, содержащим 40 мМ имидазол. Связавшиеся с сорбентом полипептиды элюировали буфером А, в котором концентрация имидазола составляла 500 мМ. Скорость потока буфера составляла 1 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на

основании проточного измерения A_{280} с помощью хроматографа АКТА FPLC (GE Healthcare, США).

Ренатурация His-Dest методом диализа. Очищенный с помощью МХХ препарат дестабилазы разводили буфером А до концентрации ≤ 0.5 мг/мл. Полученный препарат подвергали 4-ступенчатому диализу с уменьшающейся концентрацией мочевины в буфере (8 М \rightarrow 4 М, 4 М \rightarrow 2 М, 2 М \rightarrow 1 М, 1 М \rightarrow 0 М) против 20 мМ фосфатного буфера (рН 5.0) при температуре 4°C. Продолжительность каждой стадии составляла не менее 12 ч. Ренатурированный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин.

Одностадийная очистка и ренатурация N-Dest на хроматографической колонке. Очищенную с помощью МХХ N-Dest диализовали против буфера Б. Раствор наносили на хроматографическую колонку XK-26/40 (GE Healthcare, США), наполненную 150 мл сорбента CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) и уравновешенную тем же буфером. Затем колонку промывали буфером Б (≥ 300 мл). Концентрацию мочевины в колонке последовательно снижали линейным градиентом буфера Б, не содержащим в своем составе мочевины (общий объем 150 мл), сначала со скоростью протока 3 мл/мин до 4 М. Далее, скорость протока снижали до 1.5 мл и полностью удаляли мочевины из колонки. Связавшиеся с сорбентом полипептиды элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl в 20 мМ карбонате натрия (рН 10.5) (0 \rightarrow 250 мМ, общий объем 150 мл). Скорость протока буфера составляла 3 мл/мин, контроль процесса и сбор фракций осуществлялся на основании проточного измерения A_{280} элюата.

Ренатурация min-Dest методом диализа. Тельца включения растворяли в буфере Б. Полученный препарат подвергался 4-ступенчатому диализу против 20 мМ цитратного буфера (рН 5.0) с уменьшающейся концентрацией мочевины в буфере на каждой ступени (8 М \rightarrow 4 М, 4 М \rightarrow 2 М, 2 М \rightarrow 1 М, 1 М \rightarrow 0 М) при комнатной температуре. Продолжительность каждой стадии составляла не менее 12 ч. Ренатурированный препарат очищали от выпавшего в осадок белка центрифугированием при 20000g в течение 20 мин.

Очистка формы min-Dest с помощью ИОХ на CM-сефарозе. Раствор ренатурированных телец включения наносили на хроматографическую колонку Tricorn 5/50 (GE Healthcare, США), наполненную 4.5 мл сорбента CM Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare LS, США) и уравновешенную буферным раствором 20 мМ цитрата натрия (рН 5.0). После промывки элюируют min-Dest осуществляли в линейном градиенте концентрации NaCl (0 \rightarrow 250 мМ, общий объем градиента 50 мл) в 20 мМ карбонате натрия (рН 10.5) при скорости потока 1.5 мл/мин.

Одностадийная ренатурация и очистка min-Dest с помощью ИОХ. Тельца включения, содержащие рекомбинантную форму min-Dest, солибилизовали в буферном растворе Б, рН 5.0. Дальнейшие операции полностью соответствовали описанным ранее для хроматографической ренатурации формы N-Dest.

Определение литической активности образцов дестабилазы по отношению к клеткам *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)gold, трансформированных плазмидой pETmin, разбавляли в 20 раз средой LB и растили 2.5–3 ч при 37°C до значения оптической плотности $OD_{600} = 1.0–1.5$. Клеточную культуру в объеме 200 мкл осаждали центрифугированием (15000 g, 1 мин), а затем ресуспендировали в 200 мкл холодного гипертонического буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl (рН 9.0), 10 мМ EDTA, 20% сахарозу, 0.3 М NaCl. К полученной суспензии добавляли исследуемый фермент до концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 15–20 мин при 37°C. После добавления 1.6 мл воды, клетки осаждали центрифугированием (15000 g, 10 мин). Концентрацию белка в растворе определяли методом Бредфорд. Активность фермента определяли либо как разницу концентрации выделившегося белка из проб, обработанных ферментом (за вычетом концентрации самого фермента), и из необработанных проб (контроль), либо в процентах от активности HEWL.

Определение мурамидазной активности образцов дестабилазы методом просветления клеточных стенок *M. lysodeikticus*. Клеточные стенки *M. lysodeikticus* ресуспендировались в буферном растворе, содержащем 20 мМ цитрат натрия (рН 7.4) в концентрации 0.5 мг/мл. В лунки 96-луночного планшета добавляли по 200 мкл суспензии. Суспензию обрабатывали образцами фермента (конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 25°C. Мурамидазную активность фермента измеряли в процентах от активности HEWL по формуле: $A = (\Delta OD^{\text{dest}} / \Delta OD^{\text{HEWL}}) \times 100\%$, где ΔOD^{dest} – разница конечных оптических плотностей суспензии с формами дестабилазы и контрольным образцом, ΔOD^{HEWL} – разница конечных оптических плотностей суспензии с HEWL и контрольным образцом. Измерения проводили при 405 нм.

Определение общей антибактериальной активности рекомбинантной дестабилазы по отношению к *E. coli*. Ночную культуру клеток *E. coli* штамма BL21(DE3)gold-pETmin добавляли к 20 объемам среды LB и растили 2.5–3 ч при 37°C до значения $OD_{600} = 1–1.5$. Клеточную культуру в объеме 200 мкл осаждали центрифугированием, клетки ресуспендировались в 200 мкл гипертонического буфера (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ EDTA, 200 г/л сахарозы, 0.3 М NaCl). К клеточной суспензии добавляли исследуемый фермент

до концентрации 20 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали буферный раствор в суммарном объеме всех добавленных компонентов. Полученную смесь инкубировали в течение 20 мин при 37°C. После окончания реакции к суспензии добавляли 1.6 мл воды. Нерастворимый осадок осаждали центрифугированием (15000 g, 10 мин), а затем ресуспендировали в 1 мл среды LB. Серийные разведения полученной суспензии на высевали на твердую питательную среду (концентрация ампициллина 100 мкг/мл) и инкубировали 18 ч при 37°C. Подсчет выросших колоний производили визуально на чашках Петри.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Д.С. Матюшкиной (НИИ физико-химической медицины ФМБА России) за проведение MALDI-TOF-анализа, Л.Л. Заваловой (ИБХ РАН) за ценные консультации и поддержку. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (Государственный контракт № 14.N08.11.0016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баскова И.П., Никонов Г.И. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 424–431.
2. Baskova I.P., Nikonov G.I. // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1991. V. 2. P. 167–172.
3. Zavalova L.L., Baskova I.P., Lukyanov S.A., Sass A.V., Snezhkov E.V., Akopov S.B., Artamonova I.I., Archipova V.S., Nesmeyanov V.A., Kozlov D.G., Benevolensky S.V., Kiseleva V.I., Poverenny A.M., Sverdlov E.D. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1478. P. 69–77.
4. Завалова Л.Л., Никонов Г.И., Кузина Е.В., Попова Г., Баскова И.П. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 115–124.
5. Завалова Л.Л., Кузина Е.В., Левина Н.Б., Баскова И.П. // Биохимия. 1992. Т. 57. № 3. С. 468–472.
6. Zavalova L.L., Kuzina E.V., Levina N.B., Baskova I.P. // Thromb. Res. 1993. V. 71. № 3. P. 241–244.
7. Zavalova L.L., Yudina T.G., Artamonova I.I., Baskova I.P. // Chemotherapy. 2006. V. 52. № 3. P. 158–160.
8. Завалова Л.Л., Лазарев В.Н., Левицкий С.А., Юдина Т.Г., Баскова И.П. // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 1173–1181.
9. Yudina T.G., Piskunkova N.F., Pavlova I.B., Zavalova L.L., Baskova I.P. // Front. Chem. Sci. Eng. 2012. V. 6. P. 203–209.
10. Завалова Л.Л., Баскова И.П., Барсова Е.В., Снежков Е.В., Акопов С.Б., Лопатин С.А. // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 952–958.
11. Манувера В.А., Гулько Л.Б., Огорокова Н.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2008. Т. 6. С. 3–14.
12. Завалова Л.Л., Антипова Н.В., Фадеева Л.Л., Павлюков М.С., Плетнёва Н.В., Плетнёв В.З., Баскова И.П. // Биоорганическая химия. 2012. Т. 38. С. 229–233.

Recombinant Destabilase from the Medicinal Leech: Preparation and Properties

A. S. Kurdyumov^{*, #}, V. A. Manuvera^{*, **}, D. N. Akhaev^{***}, I. P. Baskova^{***}, V. N. Lazarev^{*, **}

[#]Phone: +7 (499) 255-28-46; e-mail: aleks-kuzmaland@bk.ru

^{*}Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine FMBA of Russia, Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435 Russia

^{**}Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia

^{***}Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia

We developed the process of obtaining an active recombinant destabilase-2 from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) in *Escherichia coli*. This work received various plasmids encoding destabilase carrying polyhistidine sequence, and without it, the strain-producing destabilase and optimized the process of their cultivation. We developed the conditions for renaturation of destabilase-2 from inclusion bodies by dialysis and on chromatographic sorbent. Lysozyme activity was studied in relation to the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus* bacterial cells and *E. coli*, it is determined from the dependence of pH and ionic strength. We showed the antibacterial activity of destabilase towards cells *E. coli*.

Keywords: lysozyme, izopeptidase, destabilase, recombinant protein, *Hirudo medicinalis*