

УДК 577.15.02

КЛОНИРОВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ ИЗ *Escherichia coli*. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

А.С. Ясная, О.В. Ямскова,* Д.Ф. Гуранда,* Т.А. Щербакова,* В.И. Тишков, В.К. Швядас*

(кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru; *Факультет биоинженерии и биоинформатики и НИИ физикохимической биологии имени А.Н. Белозерского; e-mail: vyta@belozersky.msu.ru)

Ген пенициллинацилазы (ПА) из *Escherichia coli* был клонирован из штамма продуцента ПА, аналога штамма АТСС 11105. Оптимизация условий культивирования позволила получить до 130 мг активного фермента на литр культуральной жидкости. Методом сайт-специфического мутагенеза с помощью ПЦР был получен ряд одиночных, двойных и тройных мутантов. В результате процедур выделения и очистки были получены гомогенные препараты нативного фермента и его мутантов. Исследования показали, что 1) полученные ферменты имеют правильную структуру; 2) комплексоны и катионы металлов не влияют на их каталитическую активность; 3) мутантные ПА, аналогично дикому типу, эффективно инактивируются ФМСФ, что дает возможность титровать их активные центры; 4) полученные мутанты характеризуются большей константой специфичности в реакции гидролиза цветного субстрата, однако уступают дикому типу в синтезе ампициллина методом ацильного переноса.

Пенициллинацилаза (ПА) является одним из наиболее изученных представителей недавно открытого суперсемейства ферментов с N-концевым нуклеофилом (Ntn-гидролаз), которые активируются посредством оригинального автокаталитического расщепления неактивного полипептидного предшественника [1, 2]. ПА из различных источников широко используется в фармацевтической промышленности для производства 6-аминопенициллановой (6-АПК) и 7-аминодезацетоксицефалоспороановой кислот (7-АДЦК) – ключевых соединений синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов [3]. Широкая субстратная специфичность и стереоселективность предоставляют возможность использования ПА в тонком органическом синтезе для получения энантиомеров α -, β -, γ -аминокислот [4, 5], для высокоэффективного хемо- и стереоселективного ацилирования аминокислот в водной среде и получения энантиомеров аминов, аминокислот [6, 7], аминитрилов [8], хиральных сульфгидрильных соединений [9, 10].

Биокаталитический потенциал ПА позволяет использовать ее в биоинженерии для создания биокатализаторов с улучшенными свойствами. Показано, что методами генной инженерии можно изменить специфичность и синтетические свойства ПА [11–13]. В последней работе, в частности, в результате многоточечных замен существенным образом был изменен

участок связывания ацильной группы субстрата в активном центре, в результате чего стал возможным гидролиз цефалоспорина С [13]. Новые возможности в разработке методов рационального изменения ПА предоставляет молекулярное моделирование, позволяющее установить роль аминокислотных остатков активного центра в механизме действия фермента [14]. Другим важным для биоинженерии достижением последних лет является конструирование пермутированной одноцепочечной ПА [15], экспрессия которой не зависит от автокаталитического расщепления.

Цель настоящего исследования – клонирование гена ПА из штамма *E. coli* – продуцента ПА и создание системы экспрессии фермента, а также получение и исследование каталитических свойств ряда мутантов ПА.

Экспериментальная часть

Клонирование гена ПА из *E. coli*. Для клонирования гена ПА дикого типа был использован штамм *E. coli* (продуцент ПА) из коллекции штаммов Государственного научного центра по антибиотикам. Ген ПА дикого типа получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выделения гена применяли следующие праймеры:

1. PAC_For: 5'-cttcagaggatcatatgaaaaatagaatcgatgatc-3';
2. PAC_Rev: 5'-tgccgaattcaagcttatctctgaacgatgatcc-3'.

Для удобства клонирования праймеры содержали сайты рестрикции: праймер № 1 – NdeI (обеспечивает встраивание под ATG кодон), праймер № 2 – EcoRI. Сайты рестрикции в последовательностях праймеров отмечены полужирным шрифтом. К смеси олигонуклеотидов (20 пкмоль каждого) добавляли 2,5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР, поставляемого фирмой-производителем вместе с ферментом, 2 мкл раствора MgCl₂ (25 мМ), 2 мкл раствора dNTP (2,5 мМ каждого), 1 мкл раствора плазмидной ДНК (50 нг/мкл), 0,5 мкл Taq ДНК полимеразы (5 ед./мкл) и 17 мкл деионизованной воды до общего объема 25 мкл. Для ПЦР использовались реактивы фирмы СибЭнзим. ПЦР проводили на приборе “Терцик” (“ДНК-Технологии”, Россия) при следующих условиях: 25 циклов (1 мин при 94°C, 1 мин при 50°C и 2 мин при 72°C) с последующей 5-минутной инкубацией при 72°C. Продукты ПЦР очищали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле. Для этого продукты ПЦР разгоняли в геле и вырезали кусочек геля, содержащий полоску нужного размера. ДНК из геля выделяли с помощью набора “Diatom™ DNA Elution” (“Лаборатория Изоген”, Россия). Выделенный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI. В качестве вектора для клонирования нами был выбран рЕТ24а (“Novagen”). Данный вектор содержит ген, обеспечивающий устойчивость к канамицину. Наличие сайта рестрикции NdeI позволяет встроить ген точно по ATG-кодону. Вектор обрабатывали теми же эндонуклеазами рестрикции: NdeI и EcoRI. Продукты рестрикции также очищали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле. Рестрикционные фрагменты ПЦР-продукта и вектора для клонирования лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 (“СибЭнзим”, Россия). Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1. Плазмидную ДНК выделяли из отдельных клонов по стандартной методике [16]. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (ЦКП “Геном”).

Мутантные формы с точечными мутациями получали с помощью двухстадийной ПЦР. В каждой реакции участвовали два праймера: мутагенезный праймер (прямой или обратный) и праймер, обеспечивающий клонирование (с сайтами рестрикции BclI или PvuII). Полученные продукты очищали и добавляли в 3-ю ПЦР. Праймеры на место мутации проекти-

ровали таким образом, чтобы обеспечить достаточное перекрытие продуктов. При третьей ПЦР продукты двух предыдущих ПЦР отжигались друг с другом с образованием конечного продукта нужного размера с мутацией. Полученный на второй стадии ПЦР-продукт очищали, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BclI и PvuII. Поскольку рестриктаза BclI чувствительна к dam-метилованию ДНК, плазмиды, содержащие ген ПА дикого типа трансформировали в штамм *E. coli* JM110, дефектный по двум метилазам – dcm и dam. Неметилированную плазмиду рЕРАС, содержащую ген ПА дикого типа, обрабатывали теми же эндонуклеазами рестрикции BclI и PvuII. Очищенные продукты рестрикции лигировали и трансформировали лигазной смесью клетки *E. coli* TG1. Плазмидную ДНК выделяли из отдельных клонов по стандартной методике [16]. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов “ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1” с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК “ABI PRISM 3100-Avant” (ЦКП “Геном”).

Культивирование. Нарработку биомассы клеток *E. coli* с рекомбинантной ПА проводили в качалочных колбах объемом 100 мл или 1 л, содержащих 2 или 4 отбойника на шейкере “Multitron” (“Infors”, Германия). Рабочие объемы среды составляли 40 и 100 мл соответственно. Посевной материал выращивали в течение ночи при 37°C и 180 об/мин. Среда содержала 30 мкг/мл канамицина. В качестве индуктора биосинтеза белка использовали изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ, конечная концентрация составляла 0,1 мМ), который добавляли после достижения суспензией клеток оптической плотности 0,6–0,8 при 600 нм (A_{600}). Далее клетки культивировали еще в течение 12–40 ч при 15–17°C. Клетки осаждали центрифугированием на центрифуге “Beckman J-21” (США) 20 мин при 7500 об/мин и 4°C. В качестве добавок при подборе условий культивирования использовали глицерин.

Выделение и очистка ферментов. Процедура выделения и очистки рекомбинантных ПА включала разрушение бактериальных клеток методом осмотического шока, гидрофобную хроматографию и обессоливание. Суспензии биомассы клеток центрифугировали 20 мин при 3500 об/мин и 4°C (центрифуга “Beckman”, Германия). После отделения супернатанта осадок ресуспендировали в 1/10 объема охлажденного до 0°C осмотического шокового буфера А (20% сахара, 100 мМ Tris-HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0) и

центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин и 4°C. Супернатант отделяли, а осадок ресуспендировали в 1/10 объема охлажденного до 0°C осмотического шокового буфера В (1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и центрифугировали 15 мин при 7000 об/мин и 4°C. К полученному супернатанту при перемешивании добавляли 1 М раствор KH_2PO_4 , pH 7,0 до конечной концентрации фосфата 50 мМ, а затем – сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 М сульфата. Аликвоту (30–60 мл) полученного раствора ПА наносили на колонку “*Butyl-Toyopearl 650 M*”, уравновешенную буфером 1 (50 мМ KH_2PO_4 , 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 М KCl , 0,02% NaN_3 , pH 7,5) и элюировали в линейном градиенте 1,5–0,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при помощи буфера 2 (50 мМ KH_2PO_4 , 0,02% NaN_3 , pH 7,5). Фракции, обладающие пенициллинацилазной активностью, объединяли с учетом распределения компонентов исходного раствора, обессоливали на колонке “*HiTrap Desalting*” с сефадексом G 25 (“*Amersham Biosciences*”, Швеция) и концентрировали в ячейке для ультрафильтрации “*Amicon M-3*” (“*Amicon Corp.*”, США) с использованием мембран “*Diaflo*” (“*Amicon Corp.*”, США). К полученному препарату фермента добавляли глицерин (до 10%) и хранили при –20°C. Контроль чистоты осуществляли с помощью аналитического электрофореза в 12% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (аппаратура для электрофореза фирмы “*BioRad*”). Чистота полученных ферментных препаратов составила не менее 95%.

Определение ферментативной активности.

Активность мутантных форм ПА определяли потенциометрически и спектрофотометрически. В первом случае ферментативную активность определяли по гидролизу свежеприготовленного 2 мМ раствора бензилпенициллина титрованием образующейся в ходе реакции фенилуксусной кислоты (ФУК) раствором 0,02 н КОН на pH-стате “*Titrimo 719*” (“*Metrohm*”, Швейцария) при 25°C, pH 7,5, в присутствии 0,1 М KCl . Во втором случае активность ПА определяли по накоплению хромофора в процессе гидролиза 1 мМ раствора *n*-нитро-*m*-карбоксиванилида ФУК (NIPAB) при 400 нм на спектрофотометре “*Shimadzu UV-1601*” (Япония). Реакцию проводили при 25°C в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,5, 0,1 М KCl .

Определение концентрации активных центров.

Абсолютную концентрацию активных центров каждой из мутантных форм ПА определяли титрованием активных центров фермента необратимым ингибитором фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ) по традици-

онной методике [17]. Остаточную ферментативную активность определяли спектрофотометрически по гидролизу цветного субстрата и потенциометрически по гидролизу природного субстрата, как описано выше.

Изучение влияния ионов металлов и комплексонов на ферментативную активность. Влияние комплексонов и ионов металлов Me^{2+} на каталитическую активность нативной и рекомбинантных ПА изучали при определении ферментативной активности в отсутствие и в присутствии комплексонов – этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и этиленгликоль-бис(2-аминоэтил)-*N,N,N',N'*-тетрауксусной кислоты (ЭГТА), а также солей CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 при pH 7,5, 25°C в 0,1 М Трис- HCl , 0,1 М KCl . Концентрация добавленного эффектора в реакционной смеси составляла 1 мМ.

Определение кинетических параметров. Кинетические параметры ферментативного превращения (K_M и $k_{\text{кат}}$) определяли путем анализа зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата. Реакции проводили в рамках схемы Михаэлиса–Ментен ($S_0 \gg E_0$) в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,5, 0,1 М KCl) при 25°C.

ВЭЖХ анализ. Количественное определение компонентов реакционной смеси проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографической системе “*Perkin Elmer 200 Series*” (США): колонка “*Luna C18*” (“*Phenomenex*”, США), 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза CH_3CN –вода (40:60), 0,78 г/л KH_2PO_4 , 0,5 г/л додецилсульфата натрия, pH 3,0; скорость потока 0,8 мл/мин; объем вкола 10 мкл; УФ-детектирование при 210 нм.

Исследование соотношения С/Г реакции ферментативного синтеза ампициллина.

Начальные скорости накопления продуктов синтеза (С) и гидролиза (Г) в реакции синтеза ампициллина методом ацильного переноса от амида фенилглицина (Д-ФГА) на 6-АПК, катализируемого ПА, изучали при pH 6,3 в безбуферной среде при 25°C. Начальные концентрации реагентов: 500 мМ Д-ФГА, 300 мМ 6-АПК. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке pH-стата “*Titrimo 719*” (“*Metrohm*”, Швейцария) при 25°C, pH 7,5, 0,1М KCl при постоянном перемешивании. Время проведения эксперимента составляло от 1 до 4 ч в зависимости от каталитической активности и концентрации препарата фермента. По ходу протекания реакции из реакционной смеси отбирали алиquotы, добавляли их мобильной фазой и анализировали методом ВЭЖХ.

Обсуждение результатов

Для клонирования ПА использовали описанную ранее систему на основе векторов рЕТ [18, 19]. В результате были получены клоны, содержащие ген ПА дикого типа. Пробное культивирование рекомбинантной ПА показало наличие фермента в активной и растворимой формах. Культивирование при температуре 30–37°C приводит к преимущественному переходу фермента в тельца включения. Снижение температуры часто позволяет получить фермент в активной и растворимой формах [20], но вместе с тем приводит к замедлению роста клеток и увеличению времени культивирования. В связи с вышесказанным посевной материал выращивали при 37°C, и непосредственно перед добавлением индуктора (ИПТГ) температуру снижали. Оптимальная температура культивирования (17°C) была подобрана экспериментально. Дальнейшее снижение температуры в случае ПА дикого типа вызывает уменьшение выхода фермента. Оптимизация условий культивирования позволила получить примерно 20 мг активного фермента с литра культуральной жидкости. Таким образом, нами была создана конструкция для получения рекомбинантной ПА в активной и растворимой формах.

Созданная конструкция в дальнейшем была использована для получения ряда одиночных, двойных и тройных мутантов. При изучении влияния условий культивирования на выход мутантных форм было показано, что при снижении температуры культивирования от 17 до 15°C для двойного мутанта М11 выход фермента возрастает с 10,2 до 72,2 мг/л, т.е. в 7 раз (табл. 1). В случае двойного мутанта М12 уменьшение температуры приводит к снижению выхода активного фермента. Добавление в систему глицерина до конечной концентрации 5 г/л приводит к аналогичному результату: выход фермента дополнительно удваивается и составляет 136 г/л в первом случае, а во втором – снижается в 2 раза. Причины снижения выхода мутанта М12 с уменьшением температуры культивирования и при добавлении глицерина не выявлены и требуют дальнейшего изучения. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о необходимости оптимизации условий культивирования каждого мутанта ПА.

С учетом особенностей культивирования каждого из препаратов, была наработана биомасса для препаративного получения ПА дикого типа, а также мутантных форм. После соответствующих процедур выде-

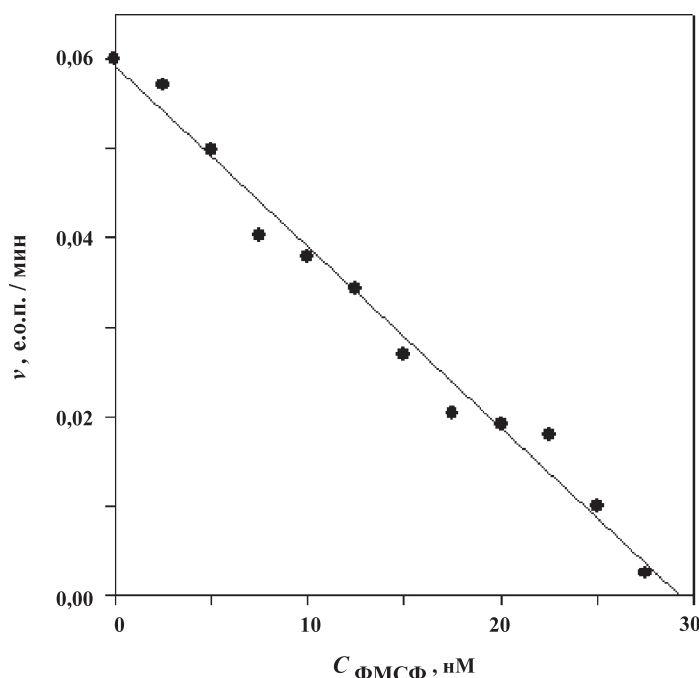
Таблица 1

Культивирование биомассы клеток *E. coli* с рекомбинантной ПА при 17°C

Мутант	Выход фермента		
	ЕД на 1 л среды, ед/л	среда, мг/л	влажные клетки, мг/г
ДТ	153	17,9	2,3
М1	150	18,1	2,4
М11	5	0,6	0,1
М12	80	10,2	2,1
М101	138	16,5	2,4

ления и очистки были получены гомогенные препараты рекомбинантных ферментов для дальнейших исследований. Согласно данным РСА [21] в структуре ПА из *E. coli* присутствует ион Ca^{2+} , который координирует шесть аминокислотных остатков белковой глобулы с образованием EF-мотива, связывающего две α -спирали обеих полипептидных цепей фермента. Кинетические исследования показали, что присутствие в реакционной смеси комплексонов ЭДТА и ЭГТА и/или катионов ряда s- и d-металлов не влияет на активность исследуемых мутантных форм ПА.

Для целей количественного исследования и сравнения каталитических свойств мутантов ПА необходимо определить абсолютную концентрацию активных центров препаратов фермента. Известно, что ферменты этого семейства обладают высоким сродством к бензильному радикалу, а ФМСФ является чрезвычайно эффективным титрантом активных центров ПА [22]. Для оценки возможности применения ФМСФ для титрования полученных рекомбинантных ПА была изучена инактивация мутантов при инкубировании с этим реагентом. Исследования показали, что ФМСФ является сильным необратимым ингибитором всех мутантов ПА: реакция образования неактивного ковалентного комплекса фенилметилсульфонил-ПА, как и в случае фермента дикого типа, протекает за несколько минут при эквимольной концентрации титрующего агента, а комплекс в данных условиях очень стабилен. Независимое слежение за остаточной активностью по отношению к природному бензилпенициллину и его аналогу – цветному субстрату NIPAB в процессе титрования активных центров ПА дикого



Титрование гомогенного препарата рекомбинантной пенициллинацилазы из *E. coli* фенолметилсульфонил-фторидом. Условия инкубирования: 0,002 М KH_2PO_4 ; pH 6,5; 25°C. Определение остаточной активности: 0,01 М KH_2PO_4 ; pH 7,5; 25°C

типа и мунантных форм показало, что модификация серина активного центра ПА во всех случаях приводит к одинаковой потере ферментативной активности по отношению к исследованным субстратам. Таким образом, можно утверждать, что ферментативное превращение субстратов происходит на одном и том же участке активного центра, что согласуется с данными [23]. Следует отметить, что концентрация каждого из рекомбинантных ферментов, определенная по титрованию активных центров (рисунок), равнялась концентрации белка, определенной по известному ко-

эффициенту молярного поглощения нативной ПА из *E. coli* при 280 нм ($\mu = 2,22 \text{ мл}/(\text{мг}\cdot\text{см})$). Этот факт свидетельствует о том, что полученные рекомбинантные ПА имеют правильную структуру.

Определение концентрации активных центров белка позволяет количественно охарактеризовать и сравнить каталитические свойства полученных препаратов ПА на основании абсолютных величин кинетических параметров ферментативных реакций. Кинетические параметры ферментативного гидролиза NIPAB (табл. 2) для ПА дикого типа, найденные в настоя-

Таблица 2

Кинетические параметры ферментативного гидролиза NIPAB (pH 7,5; 25°C; 0,1 М KCl)

Препарат фермента	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_M, \text{мкМ}$	$k_{\text{кат}}/K_M, \text{мкМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	$(k_{\text{кат}}/K_M)/(k_{\text{кат}}/K_M)$
ДТ	26	30	0,87	1
М1	53	9,0	5,9	6,8
М11	38	45	0,84	0,97
М12	40	15	2,7	3,1
М101	35	15	2,3	2,7

Таблица 3

Начальные скорости накопления продуктов синтеза (С) и гидролиза (Г) реакции ферментативного синтеза ампициллина методом ацильного переноса

Препарат ПА из <i>E. coli</i>	Начальные концентрации, мМ		Начальные скорости	
	Д-ФГА	6-АПК	$v(C)/E_0, c^{-1}$	С/Г
ДТ	15	25	-	1,9
	500	300	20	8,3
М1	500	300	1,2	3,7
М11	500	300	4,8	7,2
М12	500	300	1,3	0,8
М101	500	300	1,2	1,1

щей работе, полностью соответствуют результатам полученных нами ранее для ПА из штамма *E. coli* ATCC 9637. Экспериментальные данные показывают, что полученные мутанты характеризуются большей величиной каталитических параметров по сравнению с ферментом дикого типа (табл. 2).

Особый интерес представляет использование пенициллинацилазы как катализатора биокаталитического получения антибиотиков, в частности ампициллина. Определение начальных кинетических параметров реакции синтеза ампициллина методом ацильного переноса ацильного донора (Д-ФГА) на «ядро антибиотика» (6-АПК) показало (табл. 3), что в условиях, близких к оптимальным, для препаративного получения ампициллина мутант М11 наи-

более эффективно катализирует ацильный перенос и лишь немногим уступает в этой реакции ферменту дикого типа.

Таким образом, в данной работе был выделен и клонирован ген ПА дикого типа, создана система экспрессии рекомбинантной ПА в активной и растворимой форме в клетках *Escherichia coli*, получены мутанты ПА, оптимизированы условия культивирования, выделения и очистки рекомбинантных ПА, а также отработана процедура характеристики препаратов ПА и проведены начальные кинетические исследования соответствующих ферментативных превращений. Секвенирование ДНК проводили в межинститутском Центре коллективного пользования "Геном" ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.na-rod.ru/>).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-08-00696).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murzin A.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. **6**. P. 386.
- Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C. // J. Mol. Biol. 1995. **247**. P. 536.
- Bruggink A., Roos E.C., de Vroom E. // Org. Process Res. Dev. 1998. **2**. P. 128.
- Solodenko V.A., Belik M.Y., Galushko S.V., Kukhar V.P., Kozlova E.V., Mironenko D.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 1993. **4**. P. 1965.
- Svedas V.K., Savchenko M.V., Beltser A.I., Guranda D.F. // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1996. **799**. P. 659.
- Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. **12**. P. 1645.
- Guranda D.T., Khimiuk A.I., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2004. **15**. P. 2901.
- Chilov G.G., Moody H.M., Boesten W.H.J., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2003. **14**. P. 2613.
- Гуранда Д.Т., Шаповалова И.В., Шведас В.К. // Биоорганическая химия. 2004. **30**. С. 451.
- Guranda D.T., Kudryavtsev P.A., Khimiuk A.Y., Shvedas V.K. // J. Chromatogr. A. 2005. **1095**. P. 89.
- Alkema W.B., de Vries E., Floris R., Janssen D.B. // Eur. J. Biochem. 2003. **270**. P. 3675.
- Alkema W.B., Dijkhuis A.-J., de Vries E., Janssen D.B. // Eur. J. Biochem. 2002. **269**. P. 2093.

13. Oh B., Kim K., Park J., Yoon J., Han D., Kim Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. **319**. P. 486.
14. Чилов Г.Г., Строганов О.В., Швядас В.К. // Биохимия. 2007 (в печати).
15. Flores G., Soberyn X., Osuna J. // J. Protein Science 2006. **13**. P. 1677.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y., 1989.
17. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1977. **3**. С. 546.
18. pET System Manual. 11th edition. Merck. Germany. 2004.
19. Xu Y., Rosenkranz S., Weng C.L., Scharer J.M., Moo-Young M. Chou C.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. **72**. P. 529.
20. Gabor E.M., Janssen D.B. // Protein Engineering. 2004. **17**. P. 571.
21. McDonough M.A., Klei H.E., Kelly J.A. // Protein Sci. 1999. **8**. P. 1971.
22. Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Биорг. химия. 1977. **3**. С. 546.
23. Юшко М.И., Шамолина Т.А., Гуранда Д.Ф., Синев А.В., Швядас В.К. // Биохимия. 1998. **63**. С. 1295.

Поступила в редакцию 23.11.07

CLONING OF PENICILLIN ACYLASE FROM *Escherichia coli*. CATALYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT ENZYMES

A.S. Jasnaya, O.V. Jamskova, D.T. Guranda, T.A. Shcherbakova, V.I. Tishkov,
V.K. Shvedas

(Faculty of Chemistry, Chair of Chemical Enzymology; Faculty of Bioengineering and Bioinformatics and Belozersky Institute of Physicochemical Biology)

Gene of penicillin acylase (PA) from *Escherichia coli* has been cloned from a producing strain analogous to strain ATCC 11105. Optimization of cultivation conditions allowed to obtain up to 130 mg of active enzyme from per litre of culture broth. A number of single, double and triple mutants has been produced by site specific mutagenesis. Homogeneous preparations of wild type enzyme and its mutants have been received due to isolation and purification. It was shown that 1) isolated enzymes have correctly folded structure; 2) complexing agents and metal ions do not inhibit catalytic activity; 3) penicillin acylase mutants are inactivated by phenylmethylsulphonyl fluoride as effective as a wild type enzyme what allows to use this reagent to titrate active sites of the mutants; 4) some of the tested enzyme mutants are characterized by higher specificity constants in hydrolysis of colorimetric substrate, however they are not as effective as a wild type penicillin acylase in biocatalytic ampicillin synthesis by acyl transfer.