

УДК 577.113.6, 577.151.4

## КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА МЕТАЛЛО- $\beta$ -ЛАКТАМАЗЫ NDM-1 И ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЕРМЕНТА

В.Г. Григоренко, М.Ю. Рубцова, Е.В. Филатова, И.П. Андреева,  
Е.А. Мистрюкова, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии химического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова; e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com)

Создана система экспрессии гена бета-лактамазы NDM-1 в клетках *E. coli*, обеспечивающая синтез рекомбинантного белка в растворимой активной форме. Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного фермента. Выход гомогенного препарата белка составил 10–15 мг с 1 л культуры клеток. Определены каталитические параметры рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1 для субстратов ампициллин ( $K_M = 185$  мкМ,  $k_{кат} = 585$  с<sup>-1</sup>) и меропенем ( $K_M = 85$  мкМ,  $k_{кат} = 160$  с<sup>-1</sup>), которые согласуются с литературными данными. Впервые определены каталитические параметры для субстрата CENTA ( $K_M = 14$  мкМ,  $k_{кат} = 290$  с<sup>-1</sup>).

**Ключевые слова:** рекомбинантная бета-лактамаза NDM-1, ампициллин, меропенем, CENTA, кинетические параметры.

Антибиотики – препараты, способные обеспечить быструю защиту при инфицировании широким кругом агентов бактериальной природы. Более половины всех используемых в настоящее время антибиотиков составляют бета-лактамы [1]. Однако эффективность применения бета-лактаменных антибиотиков снижается вследствие возникновения антибиотикорезистентности (появление и распространение микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам). Основным механизмом резистентности у грамотрицательных бактерий обусловлен синтезом бактериальных ферментов – бета-лактамаз (E.C.3.5.2.6.), разрушающих структуру антибиотика. Проблема, связанная с устойчивостью микроорганизмов к бета-лактаменным антибиотикам, является одной из самых актуальных в настоящее время [2]. Изучение данного явления и поиск всевозможных способов повышения эффективности лечения инфекционных заболеваний антибиотиками является важной фундаментальной и практически значимой проблемой.

Бета-лактамазы представляют собой суперсемейство генетически и функционально различающихся ферментов, которые объединяет способность разрушать бета-лактаменное кольцо, в результате чего антибиотик теряет свою антимикробную активность. Бета-лактамазы делятся на четыре основных молекулярных класса (A–D) [3]. Классы A, C и D имеют в активном центре серин, катализирующий гидролиз. Металло-бета-лактамазы относятся к классу B и имеют в активном центре

один или два иона цинка, участвующих в катализе. Металло-бета-лактамазы разрушают почти все группы бета-лактаменных антибиотиков, кроме монобактамов. Они также устойчивы к применяемому в клинической практике известным ингибиторам бета-лактамаз молекулярного класса A, таким как сульбактам, тазобактам и клавулановая кислота [4].

Недавно выделена новая металло-бета-лактамаза NDM-1, впервые обнаруженная в *Klebsiella pneumoniae*, которая способна гидролизовать практически все известные бета-лактаменные антибиотики [5]. NDM-1 представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 270 аминокислот с N-концевым сигнальным пептидом из 28-аминокислот. В активном центре фермента находятся два атома цинка. С момента первого описания карбапенемаза NDM-1 распространилась к настоящему времени в 40 странах, охватывая все континенты, кроме Южной Америки и Антарктиды. Распространение продуцентов NDM-типа имеет сложную эпидемиологию, включающую межвидовую и межродовую передачу генетических элементов между штаммами [6].

Детальное изучение механизмов каталитической активности бета-лактамазы NDM-1 позволит получить информацию, необходимую для создания новых лекарственных средств, эффективных против устойчивых к бета-лактаменным антибиотикам микроорганизмов. Однако для проведения такого рода исследований необходимо иметь до-

статочное количество изучаемого фермента. Цель настоящей работы состояла в получении рекомбинантной формы бета-лактамазы NDM-1 и изучении ее свойств.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы реагенты фирм «Sigma», «ICN Biomedicals», «Difco» (США), «GibcoBRL» (Англия), «Химмед» (Россия); 4-(2-пиридилазо)-резорцинола натриевая соль (ПАР) («Диа-М», Россия). Ферменты рестрикции и модификации ДНК («МВІ-Fermentas», Литва); наборы для очистки ПЦР-продуктов и выделения ДНК («Qiagen», Германия). Все водные растворы готовили на деионизованной воде («Millipore», Франция).

Белковый гель-электрофорез (ДСН-ПААГ) проводили в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) в 12,5%-м полиакриламидном геле с использованием набора белков (SM0431, МВІ-Fermentas) в качестве стандартов молекулярной массы. Определение общей концентрации белка проводили с использованием ВСА-теста («Sigma», США).

В работе использованы следующие субстраты бета-лактамаз: CENTA («Calbiochem», США); меропенем («Протек-СВМ ООО», Россия) и ампициллин («Sigma», США).

Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Образец бактериальной ДНК, выделенной из контрольного штамма *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующего бета-лактамазу NDM-1, предоставлен НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (г. Смоленск, Россия).

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21(DE3), плазмидный вектор pET-24 («Novagen», США). Клетки *E. coli* выращивали на жидкой и твердой питательных средах LB (10 г/л бактотриптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 5 г/л хлорид натрия, pH 7,5; 1,5% бактоагара для твердой среды).

Очистку белка проводили на хроматографе «АКТАpurifier UPC10» с использованием анионообменного носителя SOURCE<sup>TM</sup> 15Q («GE Healthcare», Швеция).

**Аmplификация полноразмерного гена бета-лактамазы NDM-1.** ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл в 0,2 мл тонкостенных пробирках в амплификаторе «Mastercycler gradient» («Eppendorf», Германия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 95°C, 2 мин; амплификация, 25 циклов: денатурация при 95°C,

30 с; отжиг праймеров при 64°C, 45 с; элонгация при 72°C, 1 мин 30 с; конечная элонгация при 72°C, 10 мин; охлаждение смеси до +4°C. Праймеры для клонирования генов бета-лактамаз в плазмидный вектор pET-24a(+) по сайтам NdeI/EcoRI: прямой – 5'-ttatattaacatgatggaattgcccaatattatgcac-3'; обратный – 5'-tttgaattctcagcgcagctgtcggccatg-3'.

Очистку полученного ПЦР-продукта проводили на колонках «QIAquick» («PCR Purification Kit», «Qiagen», Германия) согласно протоколу производителя.

Анализ продуктов ПЦР, разделение фрагментов ДНК, а также контроль на всех стадиях клонирования проводили методом электрофореза в горизонтальном геле с концентрацией агарозы 1%.

**Клонирование гена бета-лактамазы в плазмидный вектор pET-24a.** Рестрикцию плазмидного вектора pET-24a и амплифицированного гена бета-лактамазы осуществляли рестриктазами NdeI/EcoRI в течение 1 ч при 37°C. В реакционную смесь с вектором добавляли 1 мкл щелочной фосфатазы SAP («Shrimp Alkaline Phosphatase»). Для инактивации фосфатазы смесь после инкубации при 37°C в течение 30 мин помещали на 15 мин в термостат на 65°C. Рестрикционные смеси очищали с помощью набора реагентов «PCR Purification Kit» («Qiagen», Германия).

Для лигирования плазмидного вектора и ПЦР-продукта использовали T4 ДНК-лигазу в объеме 20 мкл с соотношением вставка:вектор, равным 1:1 и 3:1 (~40 нг плазмидной ДНК). Смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, далее в течение ночи (16 ч) при 16°C, а затем использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Секвенирование ДНК проводили в Центре коллективного пользования «ГЕНОМ» в институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Для обработки и визуализации результатов секвенирования использовали программу ABIsequencer.

**Трансформация клеток *E. coli*.** К 200 мкл компетентных клеток *E. coli* DH5 $\alpha$  добавляли 10 мкл лигазной смеси (или 10–40 нг плазмидной ДНК). Полученную смесь инкубировали на льду 30–40 мин при периодическом перемешивании, затем подвергали тепловому шоку (42°C, 55 с) и сразу помещали на лед на 2 мин, далее добавляли 1 мл LB-среды и инкубировали при 37°C при постоянном перемешивании (220 об/мин) в течение 1,5 ч. 100 мкл трансформационной смеси высевали на твердую LB-среду с антибиотиком (канамицин, 50 мкг/мл) и инкубировали в термостате при 37°C в течение ночи.

**Экспрессия гена бета-лактамазы NDM-1, выделение и очистка рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1.** Полученную рекомбинантную плазмиду использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3). Отдельные колонии с чашек Петри были выбраны для инокуляции 10 мл LB-среды, содержащей канамицин (50 мкг/мл). После инкубации в течение ночи при 37°C (220 об/мин) ночную культуру разводили в 1000 раз свежей LB-средой с канамицином и инкубировали в течение 3–4 ч при 37°C (180 об/мин) до  $ОП_{600} \approx 0,6$ . Затем добавляли индуктор ИПТГ в концентрации 0,1 или 0,4 mM. Клетки инкубировали при заданной температуре (15 и 30°C) в течение определенного времени, центрифугировали (3200×g, 4°C, 15 мин) и замораживали (–20°C).

Для разрушения клеток проводили несколько циклов размораживания/замораживания. Замороженные (–20°C) клетки, помещали на лед, после оттаивания ресуспендировали в 20 мл буфера (20 mM Трис-НСl, 150 mM NaCl, pH 7,5), добавляли лизоцим (0,1 мг/мл) и оставляли на льду на 30 мин. Лизис клеток завершала стадия обработки ультразвуком (2 раза по 3 мин), после чего смесь центрифугировали (10000×g, 4°C, 15 мин) и супернатант диализовали против 20 mM Трис-НСl (pH 7,5).

Образец растворимой фракции белка после диализа наносили на ионообменную колонку SOURCE™ 15Q (10 см×0,75 см<sup>2</sup>); элюцию проводили в течение 1 ч в градиенте NaCl (0,0–0,3 M) со скоростью 2 мл/мин. Фракции, содержащие активный фермент, собирали и хранили при +4°C.

**Определение концентрации  $Zn^{2+}$  с помощью 4-(2-пиридилазо)-резорцинола.** Определение концентрации ионов цинка в препарате рекомбинантного фермента проводили в буферных растворах: 50 mM HEPES, 4,5 M гуанидин-НСl (pH 7,6) или 20 mM Трис-НСl (pH 8,0). Готовили растворы с концентрацией 1, 2, 4, 6, 8 и 10 мкM цинка и инкубировали их с раствором ПАР (50 и 100 мкM) в течение разных промежутков времени (10, 20, 30, 40, 60 мин, ночь). После инкубации измеряли поглощение окрашенных растворов комплекса ПАР с цинком при длине волны  $\lambda = 500$  нм. Выбирали оптимальные условия определения концентрации цинка. Для определения содержания цинка в растворе строили градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации ионов цинка. Готовили несколько разведений исследуемого препарата фермента, измеряли значения оптического поглощения комплекса с ПАР в выбранных условиях и по градуировочному графику определяли концентрацию ионов цинка.

**Измерение активности рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1.** Активность бета-лактамазы NDM-1 по субстратам CENTA, ампициллин, меропенем определяли на спектрофотометре «UV-1602» фирмы «Shimadzu» (Япония) при 25°C. Добавляли аликвоту фермента и субстрата к 50 mM натрий-фосфатному буферному раствору (pH 7,0). Общий объем смеси составлял 1 мл. Образование продукта регистрировали при длине волны 405 нм ( $\Delta\varepsilon_{405} = 6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) для CENTA, 230 нм ( $\Delta\varepsilon_{230} = -864 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) для ампициллина, 300 нм ( $\Delta\varepsilon_{300} = -10940 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) для меропенема. Для каждого измерения проводили не менее трех повторов.

**Определение  $K_M$ ,  $V$  и  $k_{кат}$  рекомбинантного фермента.** Начальная концентрация субстрата составляла от 10 до 400 мкM. Значения каталитических параметров определяли из графика в координатах Лайнуивера–Берка. Значения начальной скорости ферментативной реакции гидролиза определяли по начальному линейному участку кинетической кривой накопления продукта для CENTA и расходования субстрата для меропенема и ампициллина. Значение  $k_{кат}$  определяли как отношение  $V/[E]$ , где  $[E]$  – концентрация фермента.

## Результаты и обсуждение

**Клонирование гена бета-лактамазы NDM-1.** Полноразмерный ген бета-лактамазы NDM-1 был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием ДНК, выделенной из клинического штамма *Klebsiella pneumoniae*. Для удобства клонирования праймеры содержали сайты рестрикции NdeI и EcoRI. Для амплификации использовали термостабильную Pfu ДНК-полимеразу, обладающую 3'-5'-экзонуклеазной активностью, что значительно снижает вероятность введения замен в процессе ПЦР. Размер продукта по результатам гель-электрофореза в 1%-м агарозе соответствовал расчетным значениям.

В качестве вектора для клонирования был использован pET-24a, содержащий ген устойчивости к канамицину и позволяющий клонировать целевые гены под контролем сильного промотора T7. Ген бета-лактамазы NDM-1 был клонирован по сайтам NdeI и EcoRI. Модель экспрессионного вектора представлена на рис. 1.

Установлено, что как минимум для одного из трех отсекуированных клонов нуклеотидные последовательности полностью соответствовали соответствующей референсной последовательности бета-лактамазы NDM-1 из банка данных, и ни на одной из стадий клонирования не было введено случайных мутаций.

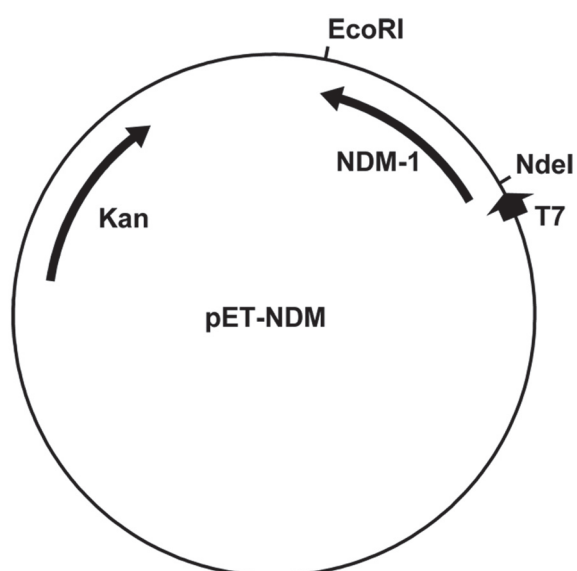


Рис. 1. Схема экспрессионного вектора pET-NDM-1

Таким образом, нами был создан рекомбинантный плазмидный вектор, содержащий полноразмерный ген бета-лактамазы NDM-1.

**Экспрессия гена бета-лактамазы NDM-1 в клетках *E. coli* BL21(DE3).** Экспрессия гена NDM-1 ранее была описана в литературе [7, 8]. Во всех случаях рекомбинантный фермент синтезировался в клетках с олиго-гистидиновыми (6×His или 8×His) последовательностями на N- или C-концах, а также в составе химерных белков, например, в комплексе с SUMO (small ubiquitin-related modifier) и GST (glutathione *s*-transferase), что повышает общий выход и упрощает процесс выделения и очистки в случае His-последовательностей, но требует введения дополнительной стадии отщепления соответствующего домена. Такие модификации целевой последовательности NDM-1 бета-лактамазы могут оказывать влияние на свойства рекомбинантного фермента, поэтому в данной работе поставлена задача оптимизации условий получения рекомбинантного фермента, имеющего нативную структуру.

Изучено влияние температуры, времени инкубации и концентрации индуктора на уровень экспрессии. Показано, что увеличение концентрации индуктора ИПТГ от 0,1 до 0,4 мМ не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии гена NDM-1 в клетках *E. coli* (рис. 2, линии 4, 5). Доля целевого белка в растворимой форме повышалась с увеличением времени инкубации и понижением температуры с 30 до 15°C. Максимальный выход (порядка 35% от общего содержания клеточного белка) наблюдался при инкубации в течение ночи (16 ч) при 15°C.

**Выделение и очистка бета-лактамазы NDM-1.** Выделение рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1 проводили методом анионообменной хроматографии на SOURCE™ 15Q («GE Healthcare», Швеция), поскольку расчетное значение pI для данного белка составляет 5,9, и при pH 8 белок имеет отрицательный заряд. Препарат фермента элюировали в солевом градиенте NaCl (0,0–0,3 М) при концентрации соли 110 мМ. Полученные препараты были гомогенными по результатам ДСН-ПААГ-электрофореза; общий выход очищенного рекомбинантного фермента составил около 10–15 мг с 1 л культуры клеток *E. coli*.

Для дальнейшей характеристики рекомбинантного фермента необходимо определить содержание ионов цинка. Определение концентрации  $Zn^{2+}$  проводили с помощью 4-(2-пиридилazo)-резорцинола (ПАР) [9, 10], который при взаимодействии с ионом цинка образует окрашенный комплекс. Это позволяет изучать протекание реакции комплексообразования спектрофотометрически по поглощению окрашенного продукта при длине волны 500 нм.

Для определения цинка в составе рекомбинантного фермента предварительно оптимизированы условия определения: состав буферного раствора, концентрация ПАР, время инкубации с ПАР.

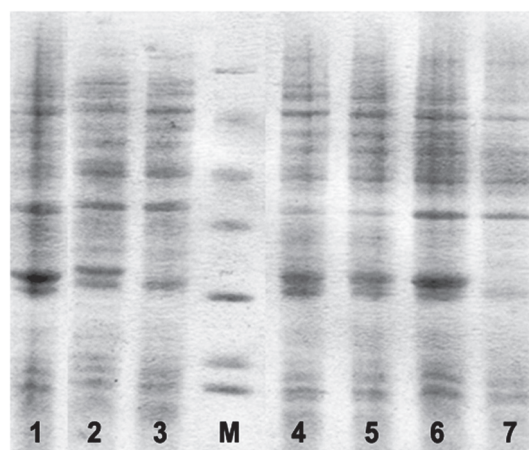


Рис. 2. ДСН-ПААГ-электрофорез белковых фракций клеточного лизата рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3) – продуцента бета-лактамазы NDM-1 (12,5% геля). Фракции 1–3 получены при синтезе белка при 15°C: 1 – фракция, полученная из растворимой части препарата; 2 – фракция, выделенная из нерастворимой части; 3 – отрицательный контроль синтеза белка. Фракции 4–7 получены при 30°C: 4, 5 – фракции, полученные из растворимых частей препарата, при концентрации индуктора 0,4 и 0,1 мМ соответственно; 6 – фракция, выделенная из нерастворимой части препарата, при концентрации индуктора 0,1 мМ; 7 – отрицательный контроль синтеза белка; М – маркеры молекулярной массы (14,4; 18,4; 25; 36; 45; 66,2 и 116 кДа)

Показано, что состав буферного раствора не влияет на протекание реакции. Градуировочные зависимости, полученные для стандартных растворов цинка в разных буферных растворах, незначительно отличаются друг от друга. Установлено, что комплексообразование достигает максимальных значений в диапазоне концентраций ПАР 50–100 мкМ. Оптимальное время для образования комплекса ПАР–цинк составило 1 ч, кинетические кривые при этом выходили на плато и оставались стабильными. На рис. 3 приведена градуировочная зависимость для определения концентрации  $Zn^{2+}$  по стандартным растворам. Концентрация ионов цинка в выделенном препарате фермента составила 2,5 мкМ. С учетом концентрации белка в данном образце, равной 1,3 мкМ, можно заключить, что на одну молекулу рекомбинантного фермента в выделенном образце приходится два иона цинка.

Таким образом, была выделена рекомбинантная бета-лактамаза NDM-1 в активной и растворимой формах с общим выходом 43%. Степень чистоты полученного препарата составила не менее 95% по данным электрофореза (ДСН-ПААГ). Концентрация очищенного препарата 2,2 мг/мл.

**Определение pH-оптимума рекомбинантного фермента.** Определение pH-зависимости активности фермента проводили по субстрату меропенем (концентрация 100 мкМ) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере в диапазоне pH от 4,4 до 8,7. Значения начальной скорости ферментативной реакции гидролиза определяли по начальному линейному участку кинетической кривой накопления продукта реакции. Строили

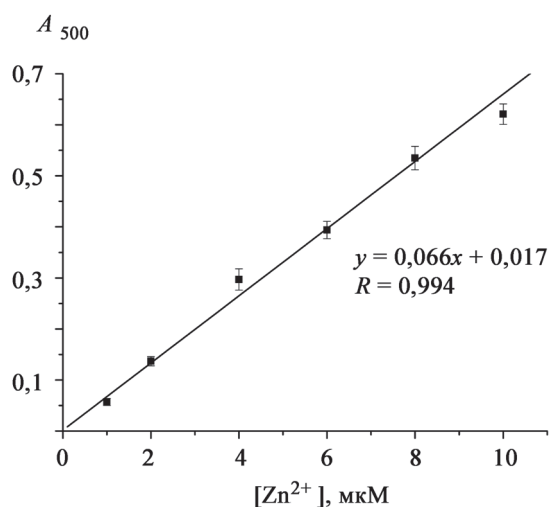


Рис. 3. Градуировочный график определения концентрации  $Zn^{2+}$  с использованием реагента ПАР (50 мкМ) в 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0; время инкубации 1 ч)

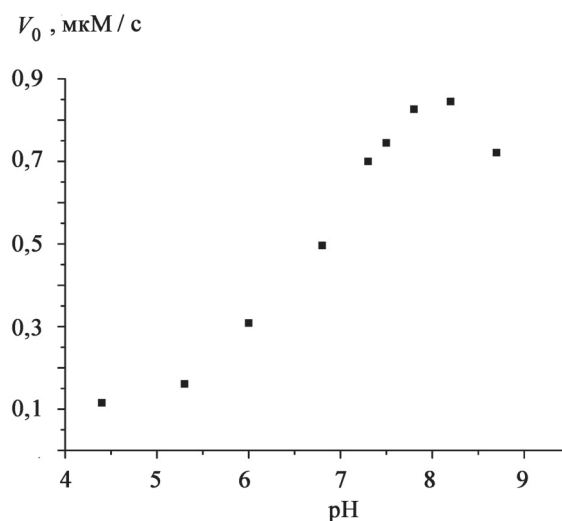


Рис. 4. Зависимость от pH начальной скорости реакции гидролиза меропенема (100 мкМ) ферментом NDM-1

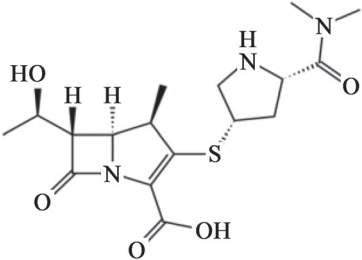
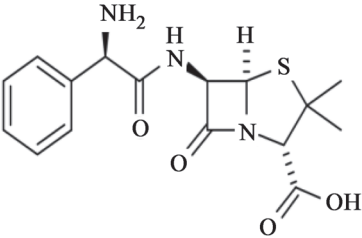
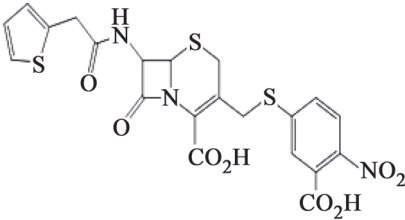
график зависимости значений начальной скорости гидролиза субстрата от значений pH (рис. 4). Оптимальное значение pH составило 7,5–8,5. Однако все дальнейшие измерения проводили при pH 7,0, что позволило сравнивать полученные значения каталитических параметров с литературными данными.

**Определение каталитических параметров рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1.**

Определение каталитических параметров проводили по субстратам меропенем, ампициллин и CENTA. Меропенем является основным субстратом для карбапенемазы NDM-1; ампициллин (производное пенициллина) также относится к бета-лактамам антибиотикам; субстрат CENTA – синтетический субстрат на основе цефалотина, часто используемый для исследования бета-лактамаз, при гидролизе которого образуется окрашенный продукт с пиком поглощения на длине волны 405 нм.

Гидролиз субстратов регистрировали при длине волны 300, 230 и 405 нм для меропенема, ампициллина и CENTA соответственно. Концентрация фермента в смеси составляла 6,5 нМ. Значения начальной скорости ферментативной реакции определяли по начальному линейному участку кинетической кривой накопления продукта гидролиза. Для определения кинетических параметров строили графики в координатах Лаинувера–Берка (данные не представлены). При расчетах предполагали, что концентрация активных центров ферментов соответствует концентрации фермента в реакционной смеси. Линеаризацию проводили по методу наименьших квадратов.

**Каталитические параметры рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1 по субстратам меропенем, ампициллин и CENTA**

Субстрат	Структурная формула субстрата	$K_M$ , мкМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>
Меропенем		85±7* 73±17**	160±23* 398±44**
Ампициллин		185±19* 270±53**	585±54* 834±86**
CENTA		14±3*	290±37*

\*Полученные данные; \*\*литературные данные [7].

Полученные значения каталитических параметров рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1 представлены в таблице. Численные расхождения в значениях констант  $K_M$  и  $k_{кат}$  можно объяснить различиями в структуре рекомбинантных форм фермента [7]. Литературные данные соответствуют рекомбинантным формам NDM-1, содержащим

олигогистидиновые последовательности на N- или C-конце, что может оказывать влияние на активность фермента. Впервые были экспериментально определены значения  $K_M$  и  $k_{кат}$  для рекомбинантной бета-лактамазы NDM-1 по гидролизу субстрата CENTA, которые составили 14±3 мкМ и 290±37 с<sup>-1</sup> соответственно.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-ЕМБЛ № 15-54-74007 «Изучение структуры бета-лактамаз и механизмов регуляции их активности».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elander R.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 61. N 5–6. P. 385.
2. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance 2014 World Health Organization <http://www.who.int/drugresistance/en/>
3. Bush K. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2013. Vol. 1277. P. 84.
4. Bebrone C. // Biochem. Pharm. 2007. Vol. 74. P. 1686.
5. Yong D., Toleman M., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., Walsh T.R. // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. Vol. 53. P. 5046.
6. Dortet L., Poirel L., Nordmann P. // BioMed. Res. Int. 2014. P. 249856 (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/249856>).
7. Chiou J., Leung T. Y.-C., Chen S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. Vol. 58. P. 5372.
8. Zhang H., Hao Q. // FASEB J. 2011. Vol. 25. P. 2574.
9. Fast W., Wang Z., Benkovic S.J. // Biochem. 2001. Vol. 40. P. 1640.
10. Siemann S., Brewer D., Clarke A.J., Dmitrienko G.I., Lajoie G., Viswanatha T. // Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj. 2002. Vol. 1571. P. 190.

## CLONING, EXPRESSION OF NDM-1 METALLO- $\beta$ -LACTAMASE GENE AND STUDY OF CATALYTIC PROPERTIES OF THE RECOMBINANT ENZYME

V.G. Grigorenko, M.Yu. Rubtsova, E.V. Filatova, I.P. Andreeva, E.A. Mistryukova, A.M. Egorov

(Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University)

The gene expression system of NDM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in *E. coli* cells, which provides a synthesis of a recombinant protein in soluble, active form, has been developed. A method for the isolation and purification of the recombinant enzyme allowed for homogeneous protein preparation to 10–15 mg from 1 liter of *E. coli* culture medium. Kinetic parameters for recombinant NDM-1  $\beta$ -lactamase measured for ampicillin ( $K_{M\text{eff}} = 185 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 585 \text{ s}^{-1}$ ) and meropenem ( $K_{M\text{eff}} = 85 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 160 \text{ s}^{-1}$ ) correlate well with literature data. For the first kinetic parameters have been obtained for chromogenic substrate CENTA:  $K_{M\text{eff}} = 14 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 290 \text{ s}^{-1}$ .

**Key words:** recombinant metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1, ampicillin, meropenem, CENTA, kinetic parameters.

**Сведения об авторах:** Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); Филатова Екатерина Викторовна – студентка химического факультета МГУ (ek\_filatova@mail.ru); Андреева Ирина Петровна – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (imtek@newmail.ru); Мистрюкова Елизавета Александровна – студентка химического факультета МГУ (li.mistryukova@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, акад. РАН (alex.m.egorov@gmail.com).