

УДК 577.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ХИМОЗИНА АЛТАЙСКОГО МАРАЛА [*Cervus Elaphus Sibiricus* (Severtzov, 1873)], НАРАБОТКА ЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ И АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТА*

© 2020 С.В. Беленькая^{1,2**}, А.А. Бондарь³, Т.А. Кургина^{2,3}, В.В. Ельчанинов⁴,
А.Ю. Бакулина^{1,2}, Е.А. Рухлова², О.И. Лаврик³, А.А. Ильичев¹, Д.Н. Щербаков^{1,5}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия; электронная почта: belenkaya.sveta@gmail.com

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

⁴ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий,
Сибирский НИИ сыроделия, 656910 Барнаул, Россия

⁵ Алтайский государственный университет, 656049 Барнаул, Россия

Поступила в редакцию 05.05.2020

После доработки 05.05.2020

Принята к публикации 19.05.2020

Впервые идентифицирован ген химозина (СУМ) алтайского марала (далее – марала). С помощью сравнительного анализа нуклеотидной последовательности установлена его экзон/интронная организация и реконструирована последовательность мРНК СУМ, кодирующая препрохимозин марала. На основе нуклеотидной последовательности мРНК СУМ марала разработан экспрессионный вектор, обеспечивающий наработку рекомбинантного фермента. Рекомбинантный прохимозин (рПроХн) марала получен в системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм BL21(DE3)). Общая молокосвертывающая активность (МА) рекомбинантного химозина марала (рХн Сег) составила 2330 УЕ/мл, удельная активность равнялась 52 955 УЕ/мг. В диапазоне температур 30–50 °С рХн Сег проявлял 100–81% МА, порог термостабильности составил 50 °С, при 70 °С фермент полностью инактивировался. В качестве образцов сравнения использовали препараты рекомбинантного химозина одногорбого верблюда (рХн Сам) и рекомбинантного химозина коровы (рХн Vos). Константа Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}) и каталитическая эффективность (k_{cat} / K_m) для рХн Сег составили $1,18 \pm 0,1$ мкМ, $2,68 \pm 0,08$ с⁻¹ и $2,27 \pm 0,10$ мкМ⁻¹·с⁻¹ соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рекомбинантный химозин, марал, молокосвертывающая активность, термостабильность, параметры кинетики Михаэлиса–Ментен.

DOI: 10.31857/S0320972520070064

ВВЕДЕНИЕ

Химозин (ЕС 3.4.23.4) является представителем группы пепсиноподобных аспартатных эндопептидаз [1]. Он синтезируется клетками слизистой оболочки желудка в форме препрохимозина с сигнальным пептидом размером 16 а.о., необходимым для его внутриклеточного транспорта. Фермент секретируется в просвет желудка в виде зимогена – прохимозина. В кислой среде происходит активация зимогена, в ходе которой с N-концевого участка элиминируется пропептид, состоящий из 42 а.о., который блокирует активный центр фермента. В результате прохимозин превращается в активный фермент – химозин (Хн). В отличие от пепсинов большинство изученных химозинов характеризуются узкой специфичностью. Их главным биологическим субстратом является к-казеин (к-КЗ) – белок молока, который находится на поверхности казеиновых мицелл и стабилизирует их. В молекуле к-казеина Хн с высокой скоростью гидролизует определенную пептидную

Принятые сокращения: СУМ – ген химозина; к-КЗ – к-казеин; МФ – молокосвертывающий фермент; МФП – молокосвертывающий ферментный препарат; рПроХн – рекомбинантный прохимозин, рХн Сам – рекомбинантный химозина одногорбого верблюда, рХн Vos – рекомбинантный химозина коровы, ТС – термостабильность, Хн, рХн – химозин и рекомбинантный химозин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), в рубрике «Papers in Press», BM20-113, 24.06.2020.

** Адресат для корреспонденции.

зина с сигнальным пептидом размером 16 а.о., необходимым для его внутриклеточного транспорта. Фермент секретируется в просвет желудка в виде зимогена – прохимозина. В кислой среде происходит активация зимогена, в ходе которой с N-концевого участка элиминируется пропептид, состоящий из 42 а.о., который блокирует активный центр фермента. В результате прохимозин превращается в активный фермент – химозин (Хн). В отличие от пепсинов большинство изученных химозинов характеризуются узкой специфичностью. Их главным биологическим субстратом является к-казеин (к-КЗ) – белок молока, который находится на поверхности казеиновых мицелл и стабилизирует их. В молекуле к-казеина Хн с высокой скоростью гидролизует определенную пептидную

связь (у коровы — это F₁₀₅—M₁₀₆), что приводит к дестабилизации и агрегации казеиновых мицелл. В результате происходит свертывание молока.

Способность Хн вызывать агрегацию казеиновых мицелл используется в пищевой промышленности для получения молочного сгустка, что является основой производства сычужных сыров. До недавнего времени по совокупности технологических свойств Хн коровы (*Bos taurus taurus* L) считался единственным эталонным и универсальным молокосвертывающим ферментом (МФ) для сыроделия [2, 3]. Другие природные протеазы, способные коагулировать молоко, применяются ограниченно, в основном из-за избыточной общей протеолитической активности (ПА), а также слишком высокой термостабильности (ТС) [2–6].

В настоящее время все большую долю на рынке коагулянтов молока начинают занимать препараты рекомбинантного химозина (рХн) [7, 8]. Результаты первых экспериментов по получению коровьего рХн в клетках *Escherichia coli* опубликованы в 1980 году [9]. Примерно через 10 лет рХн коровы впервые использовали при промышленной выработке сыра [10]. Фактически, с конца 1990-х и по настоящее время рХн коровы используется как адекватная технологическая альтернатива натуральному сычужному ферменту [1].

В период 1980–2019 гг. были получены и охарактеризованы рХн овцы [11, 12], козы [13, 14] одnogорбого верблюда [15, 16], яка [17, 18], буйвола [19], альпака [20]. При исследовании биохимических и технологических свойств было установлено, что рХн верблюда по удельной молокосвертывающей активности (МА) и специфичности (соотношению МА и неспецифической ПА) превосходит Хн коровы, но имеет более высокую ТС [16, 21, 22]. Примечательно, что первичные структуры к-КЗ верблюда и коровы имеют различия, в том числе, в непосредственном взаимодействующем с химозином районе.

Пространственные структуры Хн коровы и верблюда были определены экспериментально [16]. Химозины, как и другие пепсиноподобные эндопептидазы, состоят из двух доменов, имеющих преимущественно бета-складчатую структуру, в каждом из которых находится по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты. Субстрат-связывающая щель расположена между доменами.

Помимо решения прикладной задачи — поиска новых МФ — изучение различных видов Хн помогает понять, как специфичность и ТС фермента зависят от его структуры. Хн является привлекательным объектом для исследования,

так как в природе имеется множество вариантов этого фермента, адаптированных к разным субстратам — к-КЗ различных видов млекопитающих.

Целью данной работы была идентификация гена Хн алтайского марала [*Cervus elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873)], наработка его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии и анализ некоторых биохимических свойств полученного молокосвертывающего фермента. Достижение этой цели расширяет спектр известных Хн и открывает новые возможности для сравнительного анализа данной группы ферментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение нуклеотидной последовательности прохимозина алтайского марала. Общую ДНК выделяли из лимфоцитов крови здорового 3-х годовалого самца алтайского марала (далее — марала). Кровь была получена сотрудниками ветеринарной службы предприятия ФГУП «Новоталицкое» Чарышского района Алтайского края в ходе планового обследования животных. Для забора крови использовались вакутейнеры, содержащие динатриевую соль ЭДТА в качестве ингибитора коагуляции.

Для выделения лимфоцитов кровь наслаивали на среду LCM («Thermo Fisher Scientific», США), центрифугировали 10 мин при 900 г («Eppendorf», Германия) и собирали лимфоцитарное кольцо. Из полученной таким способом суспензии лимфоцитов при помощи TRIzol реагента («Thermo Fisher Scientific», США) выделяли препарат геномной ДНК, согласно рекомендациям производителя. Концентрация суммарной ДНК в полученном препарате составляла 10 мкг/мл.

Предполагаемая длина гена препрохимозина ~11 000 п.н., поэтому были рассчитаны две пары олигонуклеотидных праймеров («Биоссет», Россия) для получения ампликонов этой последовательности (табл. 1). Две пары, CYM_GL_9840F + CYM_GL_16024R и CYM_GR_15342F + CYM_Gene_21717R, необходимы для получения левого и правого перекрывающихся фрагментов (примерно по 6000 п.н.). Амплификацию, согласно рекомендациям производителя, проводили с использованием полимеразы Q5 («New England Biolabs», США), имеющей пониженный уровень ошибок амплификации.

В дальнейшем ДНК обоих фрагментов гена была наработана в препаративном количестве, очищена от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах AMPure XP

Таблица 1. Праймеры, использованные для получения ДНК фрагментов гена препрохимозина марала

Название	5'–3' последовательность праймеров	Назначение
CYM_GL_9840F	TGTCTTTGTTTTCCCTTTARCC	ПЦР левое плечо
CYM_GL_16024R	GCTGGTGGTTTTCTGGAACAC	ПЦР левое плечо
CYM_GR_15342F	CAACCATCTTGGGAAATCGG	ПЦР правое плечо
CYM_Gene_21717R	AGCCAGACTTTGCAGAAAGACAA	ПЦР правое плечо
CYM_sqR_19650F	CATTTAGCCACTGCTGAGTTGG	ПЦР 3'-конец гена
gCYM_22011R	CATTCTCTACTCAATCCACCTCAAG	ПЦР 3'-конец гена

(«Beckman Coulter», США) и подвергнута прямому секвенированию с обеих сторон с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Thermo Fisher Scientific», США), и проанализирована на автоматическом генном анализаторе ABI3130XL («Applied Biosystems», США). Полученные секвенограммы последовательностей гена Хн марала длиной 850–950 п.н. анализировали, затем выравнивали с известными для других китопарнокопытных структурами генов *CYM* из базы данных GenBank для подтверждения принадлежности к гену химозина и расчета праймеров для следующего шага секвенирования. Таким образом, шаг за шагом в итоге мы получили набор перекрывающихся секвенограмм и собрали контиг перекрывающихся фрагментов гена. Для контроля корректности сборки центральная область гена была дополнительно амплифицирована и секвенирована напрямую. Дополнительно, для уточнения последовательности 3'-конца гена мы аналогичным образом рассчитали и использовали в ПЦР и секвенировании по Сэнгеру праймеры *CYM_sqR_19650F* и *gCYM_22011R* (табл. 1). Структуры праймеров, использованных для пошагового секвенирования, предоставляются по запросу.

Получение нуклеотидной последовательности цитохрома В алтайского марала. Для амплификации фрагмента митохондриального генома, перекрывающего ген *MT-CYB*, использовали праймеры (*MTCB_F* – 5'-CCGCCATAAATAGGNGAAGG-3' и *MTCB_R* – 5'-WAGAAATT-CAGCTTTGGG-3'). ДНК фрагмента была наработана в препаративном количестве, очищена от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах AMPure XP и подвергнута прямому секвенированию с обеих сторон по методу Сэнгера на автоматическом генном анализаторе ABI3130XL. Полученную нами нуклеотидную последовательность гена *MT-CYB C.e. sibiricus* (рег. номер GenBank MT331597) мы сравнили со структурами соответствующих участков митохон-

дриальной ДНК 12 подвидов благородного оленя *Cervis elaphus*, доступных в базе данных GenBank.

Клонирование фрагментов гена Хн марала в составе вектора pJET. Клонирование фрагментов гена Хн марала в составе вектора pJET осуществляли с использованием набора Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit («Thermo Fisher Scientific», США), согласно рекомендациям производителя. Для этого ПЦР продукты разделяли в геле агарозы и выделяли при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific», США). ДНК фрагмент смешивали с вектором и проводили лигазную реакцию в течение 5 мин при температуре 22 °С. Далее продуктами реакции трансформировали клетки *E. coli*, штамм NEB Stable («New England Biolabs», США).

Получение препарата рекомбинантного прохимозина марала. После установления интрон-экзонной структуры гена была определена кодирующая последовательность гена прохимозина (ПроХн). Кодонный состав гена оптимизировали под выбранную систему экспрессии при помощи онлайн-сервиса Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>). Синтезированная нуклеотидная последовательность была встроена в состав экспрессионного вектора pET21a («Novagen», Германия) по уникальным сайтам рестрикции *VamNI* и *HindIII*.

Для получения целевого белка проводили химическую трансформацию штамма BL21(DE3) *E. coli* полученной конструкцией. Индивидуальные колонии *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, культивировали в течение ночи на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия) в среде LB («AppliChem», США), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37 °С и 180 об./мин. Инокулят в соотношении 1/100 переносили в колбу Эрленмейера, содержащую среду LB, и растили до поглощения 0,8 (при $\lambda = 600$ нм). Добавляли индуктор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ)

(«Anatrace Products», США) до конечной концентрации 1 мМ. Культуру дополнительно культивировали на шейкере в течение 12 ч при 25 °С и 180 об./мин. Для выделения телец включения биомассу осаждали центрифугированием («Beckman Coulter», США) в течение 20 мин при 5000 g и 4 °С. Полученный осадок растворяли в буфере STET («AppliChem», США) (8%-ная сахароза; 50 мМ Tris-HCl; 20 мМ EDTA; 5% (w/v) Triton X-100 pH 8,0) из расчета 20 мл на 1 грамм биомассы и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После завершения инкубации клетки разрушали с использованием ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 Plus («MSE», КНР), тельца включения осаждали центрифугированием («Beckman Coulter», США) при 20 000 g в течение 20 мин при 4 °С [23]. Осажденные тельца включения солибилизовали в буфере А (50 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl, pH 10,7), содержащем 8 М мочевины, инкубировали 24 ч при 15 °С и центрифугировали при 20 000 g в течение 20 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант, содержащий рекомбинантный ПроХн (рПроХн) марала. Ренатурацию целевого белка проводили по методу Wei et al. [23]. Супернатант разбавляли 3× буфером А и инкубировали 12 ч при 15 °С. По завершении инкубации разбавленный щелочным буфером супернатант доводили до pH 8,0 с помощью 1,0 М HCl, выдерживали при 15 °С в течение 1 ч и диализировали против буфера В (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8,0) в течение ночи при 4 °С [23]. В результате был получен экспериментальный препарат рПроХн марала.

Производство рекомбинантного белка в клетках *E. coli* анализировали при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ЭФ-ДСН) по методу Лэммли [24]. Для анализа электрофоретической подвижности белка и определения размера использовали маркер молекулярных масс PageRuler Unstained Protein Ladder («Thermo Scientific», США). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [25].

Активация препаратов рекомбинантного химозина марала. Активацию рПроХн марала проводили путем ступенчатого изменения pH [26]. В образец рПроХн при постоянном перемешивании вносили 2,0 М HCl до pH 3,0, после чего останавливали перемешивание и инкубировали смесь при pH 3,0 в течение 2 ч. По истечении времени инкубации доводили pH образца до 5,8 используя 0,5 М NaOH.

Определение молокосвертывающей активности. В качестве субстрата использовали 10%-ный раствор стандартизованного сухого обезжиренного молока (ОАО «МЗСФ», Россия) в 5 мМ

CaCl_2 , pH 6,5. Стандартом служил 1%-ный водный раствор сухого контрольного образца сычужного фермента (ОАО «МЗСФ», Россия), аттестованного по МА. Перед определением МА контрольный образец и жидкие препараты рХн выдерживали на водяной бане при температуре 35 °С в течение 15 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Процедуру определения МА проводили на водяной бане при температуре 35 °С. В стеклянную пробирку помещали 2,5 мл субстрата и прогревали при 35 °С в течение 5 мин. В субстрат вносили 0,25 мл исследуемого фермента, включали секундомер, полученную реакционную смесь сразу же тщательно перемешивали. Временем свертывания считали появление первых хлопьев коагуляции субстрата, образование которых контролировали путем периодического нанесения капли реакционной смеси на стенку пробирки. Молокосвертывающую активность выражали в условных единицах на 1 мл (УЕ/мл) и рассчитывали по формуле (1):

$$\text{МА (УЕ/мл)} = 0,01 \times A \times T_1/T_2, \quad (1)$$

где А – аттестованная молокосвертывающая активность контрольного образца сычужного фермента, в условных единицах на 1 грамм; T_1 – время свертывания с контрольного образца сычужного фермента; T_2 – время свертывания с исследуемым образцом.

Определение общей МА в каждом образце проводили в трех повторениях ($n = 3$). Удельную МА препарата рХн марала рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие препараты рХн коровы (гранулированная сухая форма, заявленная производителем МА – 2235 IMCU/g) и рХн верблюда (жидкая форма, заявленная МА – 1000 IMCU/мл) («Chr. Hansen», Дания). Для перевода значений IMCU (International Milk Clotting Units) в УЕ использовали повышающий коэффициент 130. Для оценки удельной МА эталонных коммерческих препаратов готовили 1,0%-ный водный раствор рХн коровы, а жидкий препарат рХн верблюда разводили в 10 раз дистиллированной водой. В полученных растворах определяли концентрацию белка по Бредфорду. Для расчета удельной МА коммерческих эталонных ферментов использовали значения МА, заявленные производителем. Удельную МА выражали в УЕ/мг.

Сравнение структур химозинов марала, коровы и верблюда. Для сравнения первичных структур белковые последовательности выравнивали с помощью программы BioEdit [27].

Для сравнения третичных структур использовали структуру Хн коровы из базы PDB (идентификатор 4AA8) и построенную нами модель Хн марала. Построение производили методом моделирования по гомологии на сервере Swiss-Model [28], в качестве шаблона для моделирования использовали структуру Хн коровы, все параметры моделирования были оставлены по умолчанию. Визуальный анализ структур проводился в программе Chimera [29].

Определение параметров кинетики Михаэлиса–Ментен рекомбинантных химозин методом флуоресцентной спектрофотометрии. В качестве субстрата использовали синтетический пептид следующего состава: DabcyI-NRPHLSF-MAIPK(5-FAM)KK-NH₂ (DabcyI = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, 5-FAM = 5-carboxyfluorescein) («CPC Scientific», США), соответствующий Хн-чувствительному участку к-казеина коровы. В районе С-концевого участка субстрата находится флуорофор – 5-FAM, на N-конце – тушитель DabcyI, причем тушитель и флуорофор сближены таким образом, что за счет резонансного диполь-дипольного переноса энергии (FRET) от 5-FAM к DabcyI флуоресценция 5-карбокCIFлуоресцеина минимальна. Гидролиз субстрата химозином приводит к разгоранию флуоресценции из-за удаления флуорофора от тушителя. Скорость увеличения флуоресценции отражает скорость ферментативной реакции. Все измерения проводили на планшетном флуориметре CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Длины волн возбуждения – 495 нм, эмиссии – 520 нм.

Реакционные смеси готовили во льду в 384-луночном планшете, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Все измерения проводили при 25 °С. Каждая лунка содержала одну реакционную смесь. Калибровку прибора проводили по раствору пептида с концентрацией 20 мкМ, подвергнутого полному гидролизу. Значение флуоресценции данной смеси принимали за 80%. Измерение проводили в режиме кинетического сканирования. Длительность цикла и количество циклов определяли индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. Все опыты повторяли трижды ($n = 3$). В качестве образцов сравнения использовали препараты коммерческих рекомбинантных Хн коровы и верблюда («Chr. Hansen», Дания).

Реакционные смеси объемом 5 мкл содержали 50 мМ ацетатный буфер (рН 5,6) и пептид различной концентрации (0–20 мкМ). Реакцию запускали добавлением 5 мкл раствора Хн с помощью встроенного во флуориметр насоса. Конечная концентрация Хн составляла 5 нМ.

Для расчета констант использовали сопутствующее программное обеспечение MARS Data Analysis («BMG LABTECH», Германия). Константу Михаэлиса (K_m) определяли по уравнению Михаэлиса–Ментен [30], константа скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента (k_{cat}) рассчитывалась по формуле (2):

$$k_{cat} = V_{max}/[E], \quad (2)$$

где k_{cat} – константа скорости реакции гидролиза; V_{max} – максимальная скорость реакции, полученная из уравнения Михаэлиса–Ментен; $[E]$ – концентрация исследуемого рекомбинантного химозина.

Каталитическую эффективность (константу специфичности) определяли, как соотношение k_{cat}/K_m .

Определение термостабильности. Растворы молокосвертывающих ферментов прогревали на водяной бане в диапазоне температур 30–70 °С в течение 30 мин и определяли в них остаточную МА. За 100% принимали значения МА, полученные в образцах, прогретых при 30 °С. Термостабильность рХн марала сравнивали с сухим коммерческим препаратом рекомбинантного химозина коровы (рХн Vos) и с жидким коммерческим препаратом рХн одногорбого верблюда (рХн Cam), которые производятся в эукариотической системе экспрессии *Aspergillus niger var. Awamori* [1, 16]. Перед проведением теста готовили 0,5%-ный водный раствор рХн коровы; рХн верблюда разводили дистиллированной водой в 100 раз. Молокосвертывающую активность растворов рХн коровы и рХн одногорбого верблюда нормировали по активности рХн марала (рХн Cer). Порогом ТС считали температуру, при которой исследуемый МФ сохранял не менее 80% от максимальной МА.

Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excell 2008 («Microsoft Corporation», США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического с указанием среднеквадратического отклонения ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение нуклеотидной последовательности гена СУМ марала. Для того, чтобы выбрать ПЦР праймеры, ориентированные на амплификацию гена препрохимозина (СУМ), с помощью ресурса BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) был проведен поиск геномных последовательностей ДНК, гомологичных мРНК химозина коровы. В ре-

зультате мы выявили последовательности генов *СУМ* яка (NW_005393277), коровы (JH880704.1), одногорбого верблюда (LOC105085668), овцы (NC_019458.2) и обезьяны (NC_013902). Мы провели выравнивание и определение наиболее консервативных участков в области, которая полностью перекрывает экзоны гена *СУМ*. В таких консервативных районах были выбраны несколько сочетающихся пар праймеров, в том числе с выродженными позициями в структуре, для амплификации *СУМ* на геномной ДНК марала. Условия амплификации подбирали с помощью температурного градиента на стадии отжига (рис. 1) и варьирования концентрации свободного магния в реакционной смеси.

В процессе подбора условий ПЦР был выбран оптимальный алгоритм, включающий амплификацию двух перекрывающихся протяженных участка гена химозина марала. ДНК двух таких фрагментов гена, после препаративной наработки и очистки, использовали для прямого секвенирования с обеих сторон по методу Сэнгера. Множество перекрывающихся секвеннограмм были собраны в контиг, включающий оба фрагмента гена. Для контроля правильности сборки была амплифицирована и секвенирована напрямую центральная область гена.

В последовательности левой половины гена *СУМ* марала при прямом секвенировании продуктов амплификации были выявлены две области точечных делеций в белок-некодирующей области и пара синонимичных однонуклетидных полиморфизмов в белок-кодирующей области. Для того, чтобы точно определить сцепление, мы произвели разделение аллелей гена с помощью клонирования полученного ПЦР фрагмента гена *СУМ* в составе вектора pJET и секвенировали ряд соответствующих ДНК клонов.

В итоге мы впервые идентифицировали два аллельных варианта гена химозина (*СУМ*) марала размером 11 161 п.н. Полученная нуклеотидная последовательность была депонирована в GenBank под номером MT225406. Нуклеотидная последовательность гена с указанием экзон-интронной структуры представлена на рис. S1 в Приложении.

Используя сравнение с последовательностями известных мРНК, кодирующими Хн у млекопитающих, мы локализовали границы экзонов/интронов исследуемого гена *СУМ* и вывели структуру мРНК *СУМ* марала.

Подтверждение видоспецифичности. В качестве дополнительного контроля принадлежности выделенной нами геномной ДНК к подвиду *Cervis elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873) мы амплифицировали и секвенировали фрагмент митохон-

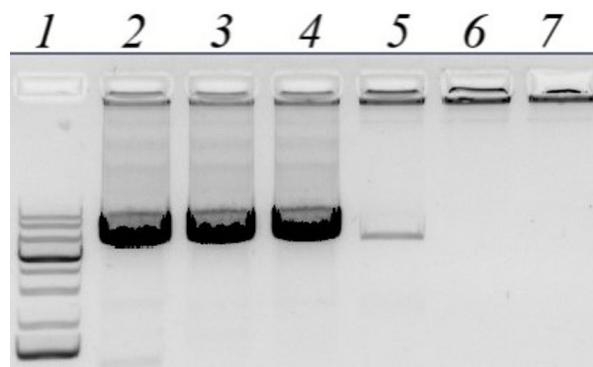


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР амплификации фрагмента гена *СУМ* марала с парой праймеров *СУМ*_GL_9840F и *СУМ*_GL_16024R: 1 – маркеры молекулярных масс, 2–7 – температуры на стадии отжига 54, 57, 60, 63, 66 и 69 °С соответственно

дриального генома, как описано ранее [31]. Необходимо отметить, что в базе данных GenBank присутствуют несколько структур *MT-CYB* подвидов *Cervis elaphus maral*, в названии которых латинское «maral» упоминается как общее название благородного оленя, обитающего на территории Ирана и Турции, что перекликается с алтайским маралом, но не означает генетической с ним идентичности. Полученную нами нуклеотидную последовательность гена *MT-CYB C.e. sibiricus* (рег. номер GenBank MT331597) мы сравнили со структурами соответствующего участка митохондриальной ДНК для 12 подвидов благородного оленя *Cervis elaphus* доступных в базе данных GenBank. Результаты выравнивания в виде филогенетического древа представлены на рис. S2 в Приложении. Как и предполагалось, секвенированная структура гена *MT-CYB C.e. sibiricus* соответствует алтайскому маралу и почти идентична структуре, известной для подвида *C.e. canadensis*, который является синонимом *C.e. sibiricus*, согласно систематике Павлинова [32], и образует с ним отдельную кладу на филогенетическом древе цитохрома В *Cervis elaphus*.

Получение препарата рПроХн марала. Для получения рекомбинантного аналога Хн марала мы использовали систему на основе штамма BL21(DE3) *E. coli* и плазмидного экспрессионного вектора серии pET. Эта система является одной из наиболее эффективных для достижения высокой продукции гетерологичных белков в прокариотах. Выход целевого белка может достигать 40% от общего белка клеток. Использование вектора pET21 в сочетании со штаммом BL21(DE3) *E. coli* позволило добиться подобного уровня при экспрессии генов химозина коровы [33] и альпака [21]. Нуклеотидная последова-

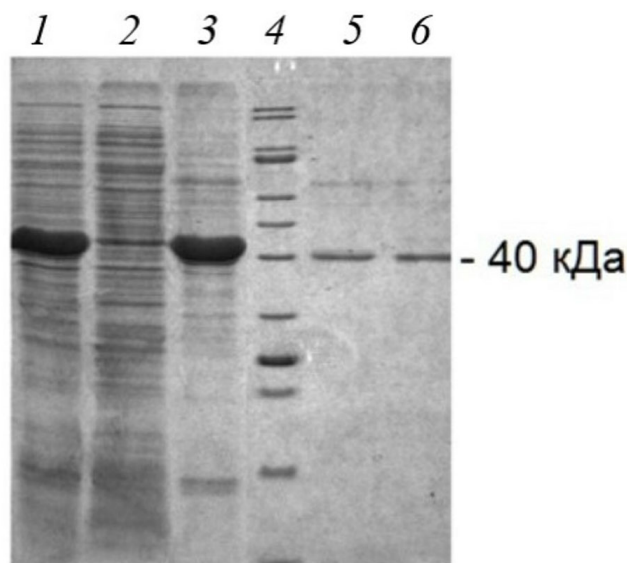


Рис. 2. Результаты ЭФ-ДСН белковых препаратов, полученных из клеток штамма-продуцента: 1 – биомасса клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рЕТ21-СУМ-Сег, через 24 ч после добавления индуктора, 2 – растворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования, 3 – нерастворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки лизирующим буфером и центрифугирования (тельца включения), 4 – маркеры молекулярных масс, 5 – рХн марала, 6 – рХн верблюда

тельность, соответствующая ПроХн марала, с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в системе *E. coli*, была встроена в экспрессионный вектор рЕТ21а таким образом, чтобы *N*-концевая часть содержала последовательность экспрессионного тага Т7.

После трансформации плазмидой рЕТ21-СУМ-Сег компетентных клеток был получен рекомбинантный штамм-продуцент. Для наработки целевого белка использовали стандартный протокол, включающий добавление индуктора ИПТГ. С целью оценки эффективности синтеза рПроХн марала, а также определения его локализации, был проведен электрофоретический анализ различных белковых препаратов, полученных из клеток рекомбинантного штамма-продуцента (рис. 2).

Анализ клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рЕТ21-СУМ-Сег, после добавления индуктора показал высокое содержание белка, по электрофоретической подвижности совпадающего с расчетной для рПроХн марала (41 кДа). Его содержание составило $\geq 30\%$ (рис. 2, дорожка 1) от общего количества белков клетки. Видно, что растворимая фракция биомассы *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования (рис. 2, дорожка 2) почти не содержит целевого белка, в то время как фракция телец включения практически полностью представлена рПроХн марала (рис. 2, дорожка 3). Таким образом, условия экспрессии гена химозина марала в системе *E. coli* приводят к высокоэффективному синтезу целевого белка, при этом почти весь он накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения. Поэтому обязательной процедурой был рефолдинг белка при помощи ступенчатого диализа.

До проведения диализа активированные препараты рПроХн марала не проявляли коагуляционной активности. После процедуры диализа активированные препараты рПроХн марала демонстрировали высокую удельную МА (см. ниже), которая свидетельствовала о том, что зимоген успешно восстанавливает корректную третичную структуру.

Активация рПроХн и получение рХн марала. Во избежание аутокаталитической активации [34] препараты рПроХн марала после выделения и очистки хранили в слабощелочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8,0). Для активации рПроХн была выбрана процедура титрования до pH 3,0 [26]. Исходная МА препарата рПроХн составляла $< 1,0$ УЕ/мл, после активации МА была равна 2329,8 УЕ/мл. Таким образом, в результате активации общая МА препарата увеличилась более чем в 2300 раз, что свидетельствует об эффективности превращения рПроХн в активный рХн марала. Выход рХн марала составил ~ 44 мг/л, что сопоставимо с выходом рХн верблюда (37 мг/л) при его получении в системе *Pichia pastoris* [35].

Сравнение МА препарата рХн марала и коммерческих рекомбинантных коагулянтов молока представлено в табл. 2.

Таблица 2. Общие и удельные молокосвертывающие активности рекомбинантных химозинов марала, коровы и верблюда

Препарат рХн	Общая МА (УЕ/мл)	Концентрация белка (мг/мл)	Удельная МА (УЕ/мг)
Корова (1,0% р-р)	2750*	0,033 \pm 0,005	83 333 \pm 12 925
Верблюд	130 000*	0,928 \pm 0,029	140 086 \pm 4382
Марал	2330 \pm 10	0,044 \pm 0,002	52 955 \pm 2184

* Значения МА, заявленные производителем.

Удельная МА рХн марала оказалась ниже, чем удельная активность рХн коровы и верблюда примерно в 1,6 и 2,6 раза соответственно. Вероятно, это объясняется тем, что рХн Сам и рХн Vos производится в системе экспрессии *Aspergillus niger var. Awamori* (штамм dgr246purG) [15], которая обеспечивает более эффективный рефолдинг и качественно иной уровень посттрансляционной модификации ферментов эукариот.

Общая МА используемых в сыроделии жидких коммерческих препаратов: натурального сычужного фермента «Naturen® Premium 225» («Chr. Hansen», Дания), «Clerici 96/04» («Caglificio Clerici», Италия) и генно-инженерных химозинов коровы и верблюда «Chy-Max® Extra», «Chy-Max® M 1000» («Chr. Hansen», Дания) составляет 225–1000 ИМСУ/мл, что соответствует $\approx (30–130) \times 10^3$ УЕ/мл. Для производства жидких молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП) с активностью больше 30×10^3 УЕ/мл применяется концентрирование исходных разбавленных растворов ферментов методом ультрафильтрации (УФ). В некоторых технологиях рПроХн секретируется продуцентом в культуральную жидкость [19, 34, 36, 37], и если ее компоненты коагуляционно неактивны, не содержат токсинов продуцента, то выделение и очистка рХн не требуется. Активация профермента и превращение его в активный рХн производится непосредственно в культуральной жидкости, которую впоследствии осветляют и концентрируют методом УФ до необходимой МА. Значения МА рХн-содержащих культуральных жидкостей могут колебаться в диапазоне $\approx (400–12\ 480)$ УЕ/мл [36, 37], и для достижения активности, сравнимой с МА коммерческих МФП, их необходимо сконцентрировать в 10–75 раз. Чтобы увеличить МА полученного нами препарата рХн марала до $\approx (30–130) \times 10^3$ УЕ/мл, его необходимо сконцентрировать в 13–56 раз.

Таким образом, препарат рХн марала обладал коагуляционной активностью, сопоставимой с активностью препаратов, используемых на промежуточных технологических стадиях производства коммерческих МФП.

Сравнение структур химозинов марала, коровы и верблюда. Мы провели сравнительный анализ аминокислотной последовательности Хн марала с последовательностями Хн коровы и верблюда. Первичные структуры зрелых Хн коровы и марала имеют идентичность 92,6% и выравниваются без вставок или делеций (рис. 3).

Это позволяет предполагать, что третичные структуры этих белков также близки и результаты моделирования по гомологии имеют высокую степень достоверности. Известно, что химозины коровы и верблюда имеют схожие

пространственные структуры, при этом идентичность их первичных последовательностей составляет только 84,8% [38].

Хн коровы содержит 32 отрицательно заряженных а.о. и 19 – положительно заряженных а.о., Хн марала – 36 и 22 соответственно. Суммарные заряды этих химозинов практически не отличаются (–13 у коровы и –14 у марала). В то же время у Хн верблюда общий заряд составляет –7, у него 33 отрицательно заряженных а.о. и 26 – положительно заряженных а.о. И у Хн верблюда, и у Хн марала суммарное число заряженных а.о. больше, чем у Хн коровы.

Химозин, как и другие подобные пептидазы, состоит из двух доменов, имеющих преимущественно бета-складчатую структуру, в каждом из которых находится по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты (рис. 4).

При сравнении структур Хн коровы и марала видно, что большинство замен сконцентрировано в С-концевом домене. В N-концевом домене все замены находятся достаточно далеко от каталитически значимого остатка D13, а в С-концевом домене целых три замены, из них две с изменением заряда (Q280E и G281D), расположены в одной петле с каталитически значимым остатком D279. Можно предположить, что эти замены серьезно влияют на каталитические свойства химозина. Интересно, что у Хн верблюда в этом районе находится единственная замена Q278K, также меняющая заряд, но в другом направлении.

Часть замен расположена в субстрат-связывающей щели Хн марала, это Q189K, K221L, Q242R, а также шесть замен в районе 289–295. Такие замены могут влиять на связывание фермента с к-КЗ и в конечном итоге – на наблюдаемую каталитическую активность. Химозин верблюда также имеет несколько замен в субстрат-связывающей щели по сравнению с Хн коровы [38].

Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен. Гидролиз химозином синтетического флуорогенного субстрата, имитирующего Хн-чувствительный участок к-КЗ коровы, приводит к нелинейному росту флуоресценции, интенсивность которой зависит от концентрации субстрата и отражает изменение скорости ферментативной реакции. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что параметры кинетики Михаэлиса–Ментен для рХн марала и коммерческого жидкого препарата рХн верблюда близки, но заметно отличаются от значений кинетических констант, полученных для рХн коровы.

Рекомбинантный Хн марала продемонстрировал самые низкие значения K_m , что указывает на наибольшую аффинность к использованному

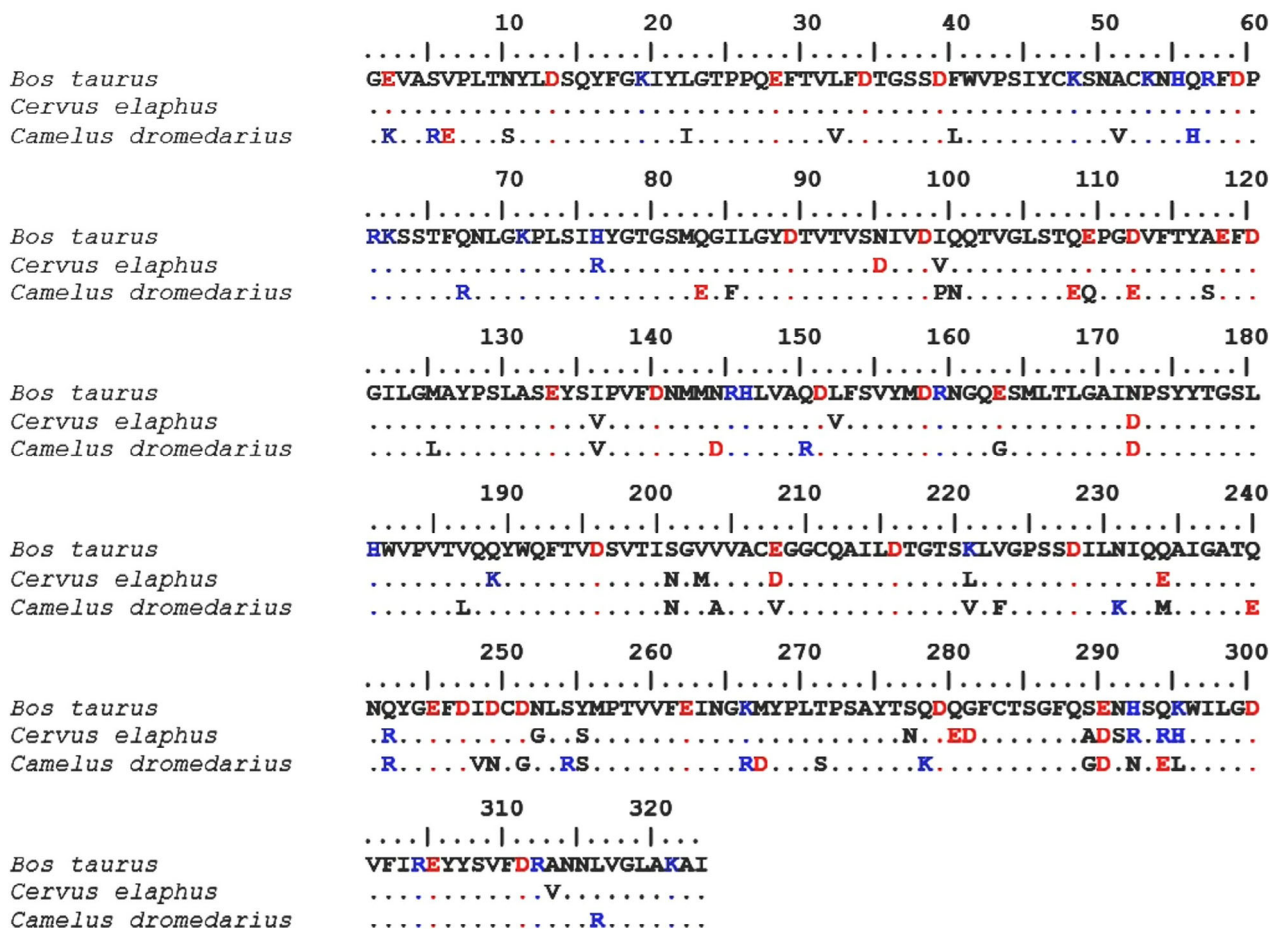


Рис. 3. Выравнивание химозинов коровы, марала и верблюда. Положительно заряженные а.о. выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые а.о. показаны точками. (С цветными вариантами рис. 3–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

хромогенному субстрату. По скорости насыщения субстратом рХн марала превосходит коровий рХн в 3,4 раза. Аффинность к субстрату рХн верблюда превышает этот показатель для рХн коровы в 3,1 раза. Аналогичные результаты были получены при сравнении K_m рХн коровы и одногорбого верблюда, с использованием хромогенного андекапептида, имитирующего Хн-чувствительный участок коровьего к-КЗ [16]. В диапазоне рН 5,50–6,65 константы Михаэлиса коммерческого рХн верблюда, рассчитанные с

использованием такого же флуорогенного субстрата, что и в данном исследовании, также были меньше K_m коммерческого рХн коровы в 2,1–3,1 раза [39].

Анализ Хн-чувствительных участков (96–119) к-КЗ одногорбого верблюда и коровы показывает, что они различаются на 9 а.о., включая замену М106I в гидролизуемой пептидной связи (105–106). Идентичность участков 96–119 к-КЗ коровы и верблюда составляет 62,5%. Напротив, первичная структура Хн-чувствительных участ-

Таблица 3. Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен рекомбинантных химозинов

Параметр	рХн Cer	рХн Cam	рХн Bos
K_m (мкМ)	1,18 ± 0,10	1,28 ± 0,14	3,97 ± 0,34
k_{cat} (с ⁻¹)	2,68 ± 0,08	3,66 ± 0,09	16,9 ± 0,21
k_{cat}/K_m (мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹)	2,27 ± 0,10	2,45 ± 0,16	4,26 ± 0,52

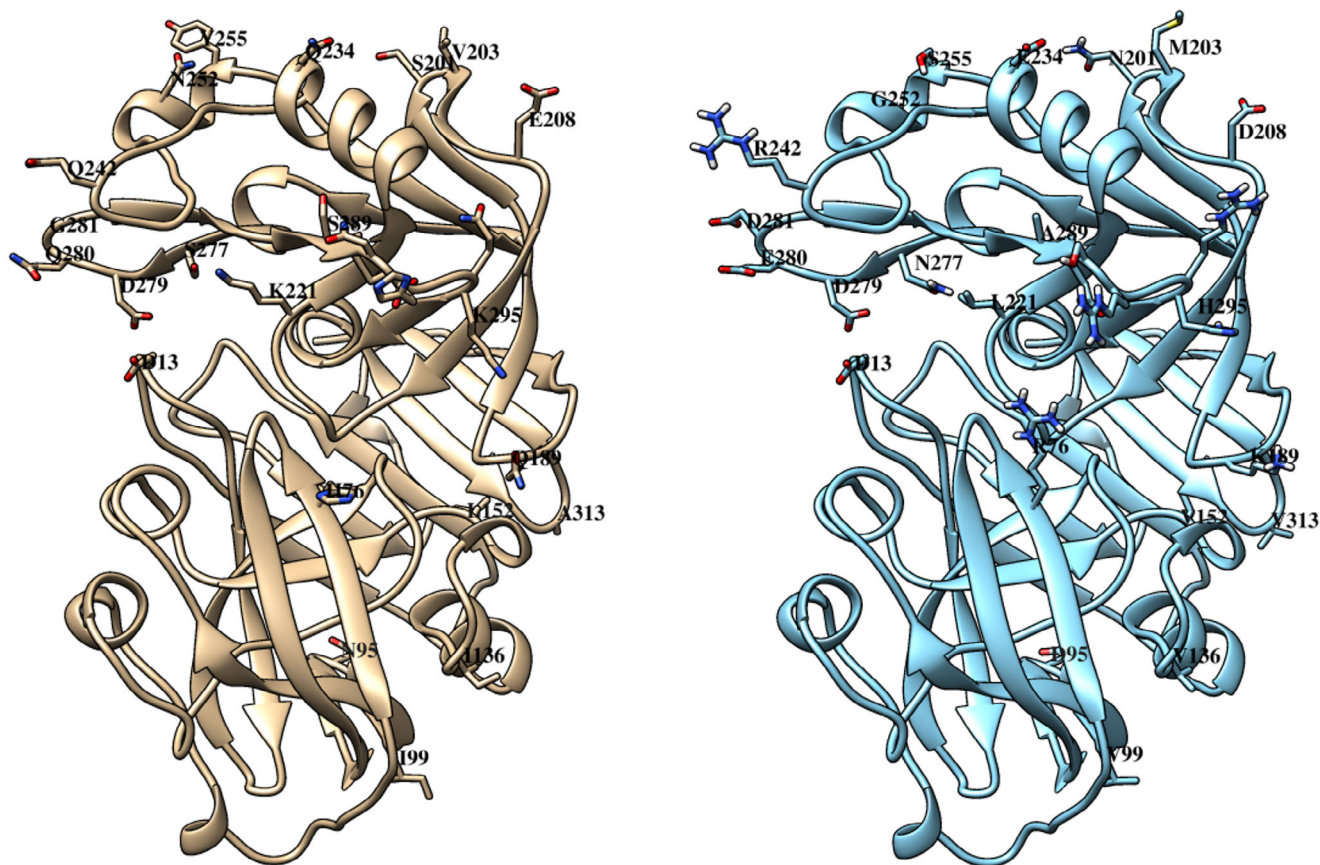


Рис. 4. Пространственные структуры химозинов коровы и марала. Слева – химозин коровы, справа – марала. Подписаны каталитические остатки D13 и D279, а также выделены позиции с заменами и границы района 289–295, в котором сконцентрировано пять замен. N-концевой домен находится снизу, C-концевой – сверху

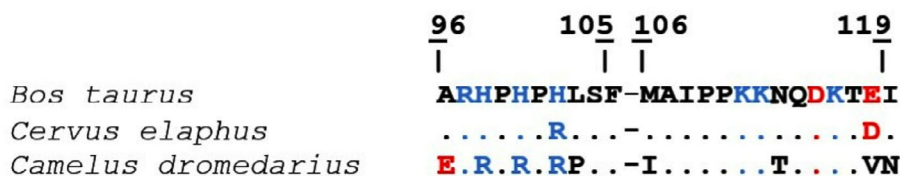


Рис. 5. Выравнивание Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы, марала и верблюда. Положительно заряженные а. о. выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые а.о. показаны точками. Последовательности 105–106 обозначены пробелами

ков к-КЗ марала и коровы различается всего на 2 аминокислоты, а идентичность последовательностей 96–119 этих белков составляет 91,7%. Можно предполагать, что повышенная аффинность рХн Сам и рХн Сег к субстрату, имитирующему к-КЗ коровы, обусловлена различиями в структуре Хн-связывающих участков к-казеинов и субстрат-связывающей щели Хн коровы, верблюда и марала (рис. 5).

Возможно, те же причины, которые усиливают сродство рХн Сег и рХн Сам к использованному флуорогенному субстрату, замедляют осво-

бождение этих ферментов от продуктов реакции, что приводит к наблюдаемому нами уменьшению каталитической константы скорости (k_{cat} (c^{-1})) и каталитической эффективности (k_{cat}/K_m ($мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$)).

Термостабильность. Результаты исследования ТС рХн коровы, одногорбого верблюда и марала представлены на рис. 6.

При 40 °С МА коммерческих препаратов рХн коровы и одногорбого верблюда составила соответственно 101 и 82%. При 50 °С рХн Vos почти полностью инактивировался (остаточная МА –

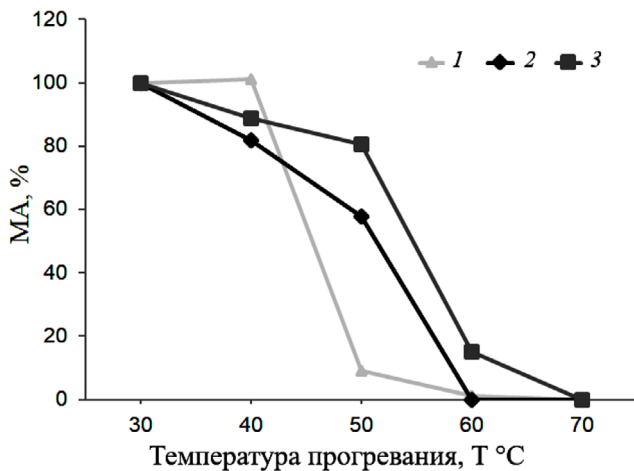


Рис. 6. Зависимость остаточной молокосвертывающей активности от температуры прогревания фермента (термостабильность). Условные обозначения: 1 – коммерческий рХн коровы, 2 – коммерческий рХн одногорбого верблюда, 3 – рХн марала

9%), тогда как рХн Сам сохранил при этой температуре 58% МА. Полная термоинактивация верблюжьего рХн наблюдалась при 60 °C. Согласно выбранному критерию (см. Материалы и методы), диапазон ТС рХн коровы и верблюда составил 30–40 °C, но при температурах прогревания выше 40 °C верблюжий фермент инактивировался медленнее. Полученные нами результаты согласуются с данными Carreler et al. [16], которые также отмечали более высокую ТС рХн верблюда по сравнению с рХн коровы. Рекombинантный Хн марала оказался термостабилен в более широком диапазоне температур (30–50 °C). После прогревания при 40 и 50 °C фермент сохранял 89 и 81% МА соответственно. При 60 °C рХн марала проявлял всего 15% от исходной коагуляционной способности, а при 70 °C фермент полностью инактивировался. Таким образом, порог термоинактивации рХн марала оказался на 10 °C выше, чем у контрольных препаратов рХн, и составил 50 °C.

Возможно, более высокая ТС рХн марала обусловлена особенностями его аминокислот-

ного состава. Известно, что у белков термофильных микроорганизмов увеличено число заряженных остатков по сравнению с ортологами из мезофильных микроорганизмов [40]. В частности, у фенилаланин-тРНК-синтетазы из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* имеется повышенное содержание остатков аргинина и аспарагиновой кислоты по сравнению с ортологом из *Escherichia coli* [41]. Химозины марала и верблюда имеют больше заряженных остатков, чем Хн коровы, и это может быть фактором, влияющим на их повышенную ТС.

В результате данного исследования идентифицирован ген Хн алтайского марала [*Cervis elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873)] и получен его рекombинантный аналог в прокариотической системе экспрессии. Изучены и проанализированы некоторые структурные особенности и биохимические свойства нового генно-инженерного молокосвертывающего фермента. В планах дальнейших работ нашего научного коллектива – сравнительный анализ свойств рХн, полученного в про- и эукариотической системе экспрессии.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекombинантных ферментов для сыроделия»).

Благодарности. Секвенирование ДНК было выполнено в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Harboe, M., Broe, M. L., and Qvist, K. B. (2010) The production, action and application of rennet and coagulants, in *Technology of Cheesemaking*, 2, 98-129.
- Белов А. Н., Коваль А. Д., Авданина Е. А., Ельчанинов В. В. (2009) Влияние молокосвертывающего препарата на органолептические показатели сыра, *Сыроделие Маслоделие*, 1, 22-24.
- Jacob, M., Jaros, D., and Rohm, H. (2011) Recent advances in milk clotting enzymes, *Int. J. Dairy Technol.*, 64, 14-33.
- Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Luis Rodriguez-Rama, J., Barros-Velázquez, J., de Miguel, T., Sánchez-Pérez, A., and G Villa, T. (2014) Recent patents on microbial proteases for the dairy industry, *Recent Adv. DNA Gene Seq.*, 8, 44-55.
- Kimberlin, R. H. (1996). Bovine spongiform encephalopathy and public health: some problems and solutions in assessing the risk, in *3rd International Symposium on Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Diseases, Paris* (Court, L., and Dodet, B., eds.) Amsterdam, Elsevier, pp. 487-502.
- Lebedev, L. R., Kosogova, T. A., Teplyakova, T. V., Kriger, A. V., Elchaninov, V. V., Belov, A. N., and Koval, A. D. (2016). Study of technological properties of milk-clotting

- enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (fr.) fr.), *Foods Raw Mater.*, **4**, 58-65.
7. Ельчанинов В. В. (2006) Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя, *Сыроделие и маслоделие*, **4**, 42-44.
 8. Ельчанинов В. В. (2006) *Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей*, Дисс. канд. техн. наук, Кемеров. Технол. Ин-т Пищевой Пром., Кемерово, стр. 121-147.
 9. Uchiyama, H., Uozumi, T., Veppu, T., and Arima, K. (1980) Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1373-1381.
 10. Flamm, E. L. (1991) How FDA approved chymosin: a case history, *Biotechnology*, **9**, 349.
 11. Pungercar, J., Strukelj, B., Gubensek, F., Turk, V., and Kregar, I. (1990) Complete primary structure of lamb preprochymosin deduced from cDNA, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4602.
 12. Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., and Pungercar, J. (2001). Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production, *J. Dairy Sci.*, **84**, 1020-1026.
 13. Vega-Hernández, M. C., Gómez-Coello, A., Villar, J., and Claverie-Martín, F. (2004) Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin, *J. Biotechnol.*, **114**, 69-79.
 14. Eskandari, M. H., Hosseini, A., and Aminlari, M. (2008) Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat (*Capra hircus*) from Iran, *Iranian J. Veterinary Res.*, **9**, 262-265.
 15. Kappeler, S., Farah, Z., van den Brink, J. M., Rahbek-Nielsen, H., and Budtz, P. (2016) U.S. Patent No. 9,307,775, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 16. Kappeler, S. R., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhani, Z., Hansen, E. B., and Johansen, E. (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 647-654.
 17. Ersöz, F., and Inan, M. (2019) Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **154**, 126-133.
 18. Luo, F., Jiang, W. H., Yang, Y. X., Li, J., and Jiang, M. F. (2016) Cloning and expression of yak active chymosin in *Pichia pastoris*, *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, **29**, 1363.
 19. Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2008). Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10606-10610.
 20. Бельская С. В., Рудометов А. П., Щербаков Д. Н., Балабова Д. В., Кригер А. В., Белов А. Н., Коваль А. Д., Ельчанинов В. В. (2018) Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.), *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **54**, 585-593.
 21. Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2012) A comparative analysis of recombinant chymosins, *J. Dairy Sci.*, **95**, 609-613.
 22. Bansal, N., Drake, M. A., Piraino, P., Broe, M. L., Harboe, M., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (2009) Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese, *Int. Dairy J.*, **19**, 510-517.
 23. Wei, C., Tang, B., Zhang, Y., and Yang, K. (1999) Oxidative refolding of recombinant prochymosin, *Biochem. J.*, **340**, 345.
 24. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
 25. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
 26. Рудометов А. П., Бельская С. В., Щербаков Д. Н., Балабова Д. В., Кригер А. В., Ельчанинов В. В. (2017) Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus* L.), *Сыроделие и маслоделие*, **6**, 40-43.
 27. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in *Nucleic Acids Symposium Series*, Information Retrieval Ltd., Vol. 41, pp. 95-98.
 28. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., and Lepore, R. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296-W303.
 29. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
 30. Johnson, K. A., and Goody, R. S. (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry*, **50**, 8264-8269.
 31. Naidu, A., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., and Culver, M. (2011) Novel primers for complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequencing in mammals, *Mol. Ecol. Res.*, **12**, 191-196.
 32. Павлинов И. Я. (2006) *Систематика современных млекопитающих*, Московский гос. Университет, Москва.
 33. Щербаков Д. Н., Рудометов А. П., Ельчанинов В. В., Бельская С. В., Кригер А. В., Ильичев А. А. (2006) *Рекомбинантная плазмида pET21a-ProChym, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина В Bos Taurus, и штамм Escherichia coli BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – продуцент химерного белка прохимозина В Bos Taurus.*, Патент РФ на изобретение № 2670071, СПК C12N 9/6483 (2006.01); C12N 15/64 (2006.01); C12N 15/70 (2006.01); C12Y 304/23004 (2006.01).
 34. Pedersen, V. B., Christensen, K. A., and Foltmann, B. (1979) Investigations on the activation of bovine prochymosin, *Eur. J. Biochem.*, **94**, 573-580.
 35. Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., and Liu, D. (2015) Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **111**, 75-81.
 36. Jiang, X. P., Yin, M. L., Chen, P., and Yang, Q. (2012) Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 2087-2093.
 37. Nosedá, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., and Galvagno, M. A. (2013) Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter, *Protein Expr. Purif.*, **9**, 235-244.
 38. Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., Lorentzen, A. M., and Larsen, S. (2013) Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 901-913.
 39. Jensen, J. L., Jacobsen, J., Moss, M. L., Rasmussen, F., Qvist, K. B., Larsen, S., and van den Brink, J. M. (2015) The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay, *J. Dairy Sci.*, **98**, 2853-2860.
 40. Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., and Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins, *Amino Acids*, **34**, 25-33.
 41. Бобкова Е. В., Гедрович А. В., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Баратова Л. А., Шишков А. В. (1990) Сравнительное исследование фенилаланил-тРНК-синтетаз из *Escherichia coli* и *Thermus thermophilus* методом триэтовой топографии, *Биохимия*, **55**, 1570-1577.

**IDENTIFICATION OF THE CHYMOSIN GENE OF ALTAI MARAL
[*Cervus Elaphus Sibiricus* (Severtzov, 1873)], DEVELOPMENT
OF ITS RECOMBINANT ANALOG IN THE PROKARYOTIC
EXPRESSION SYSTEM AND ANALYSIS OF SOME BIOCHEMICAL
PROPERTIES OF THE CREATED ENZYME**

S. V. Belenkaya^{1,2}, A. A. Bondar³, T. A. Kurgina^{2,3}, V. V. Elchaninov⁴, A. Yu. Bakulina^{1,2},
E. A. Rukhlova², O. I. Lavrik³, A. A. Ilyichev¹, and D. N. Shcherbakov^{1,5}**

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", 630559 Koltsovo,
Novosibirsk Region, Russia; E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

⁴ Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies,
Siberian Research Institute of cheese making, 656910 Barnaul, Russia

⁵ Altai State University, 656049 Barnaul, Russia

Received May 5, 2020

Revised May 5, 2020

Accepted May 19, 2020

For the first time, the chymosin gene (*CYM*) of a maral was characterized. Its exon/intron organization was established using comparative analysis of the nucleotide sequence. The *CYM* mRNA sequence encoding a maral pre-prochymosin was reconstructed. Nucleotide sequence of the *CYM* maral mRNA allowed developing an expression vector to ensure production of a recombinant enzyme. Recombinant maral prochymosin was obtained in the expression system of *Escherichia coli* [strain BL21 (DE3)]. Total milk-coagulation activity (MCA) of the recombinant maral chymosin was 2330 AU/ml. The recombinant maral prochymosin relative activity was 52955 AU/mg. The recombinant maral chymosin showed 100-81% MCA in the temperature range 30-50°C, thermal stability (TS) threshold was 50°C, and the enzyme was completely inactivated at 70°C. Preparations of the recombinant chymosin of a single-humped camel and recombinant bovine chymosin were used as reference samples. Michaelis–Menten constant (K_m), turnover number (k_{cat}), and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the recombinant maral chymosin, were $1.18 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $2.68 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ and $2.27 \pm 0.10 \mu\text{m M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively.

Keywords: recombinant chymosin, milk-clotting activity, thermal stability, Michaelis–Menten kinetics parameters