

УДК 577.151.34

РЕФОЛДИНГ ГЕКСАГИСТИДИНСОДЕРЖАЩЕЙ ОРГАНОФОСФАТГИДРОЛАЗЫ ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ

Д.А. Гудков, Е.Н. Ефременко

(кафедра химической энзимологии, химический факультет; e-mail:
efremenko@enzyme.chem.msu.ru)

Из клеток *E. coli* DH 5 α выделены и очищены тельца включения, содержащие органофосфатгидролазу, с гексагистидиновой последовательностью на N-конце молекулы белка. При исследовании процесса солиобилизации телец включения были установлены оптимальные условия его проведения: 6 М мочевины в фосфатно-солевом буфере с pH 7,6; 37°C; 2 ч. Проведен рефолдинг фермента из растворов солиобилизованных телец включения с использованием металл-хелатирующей хроматографии. Изучен процесс активации фермента после проведения рефолдинга. Показано, что максимум активности фермента может быть достигнут после 24 ч его инкубирования при 4°C в среде с 0,05 М CO₃²⁻-ионов в присутствии ионов Co²⁺ (10⁻⁵ М).

Органофосфатгидролаза (ОРН, ЕС 3.1.8.1) катализирует гидролиз фосфорорганических соединений, к числу которых относятся пестициды, широко применяемые в сельском хозяйстве, и боевые отравляющие вещества (зарин, зоман, Vx) [1, 2]. Генетическая модификация ОРН введением на N-конец молекулы белка гексагистидиновой His₆-последовательности позволила существенно упростить процедуру выделения белка и получить высокоактивный фермент His₆-ОРН с эффективностью каталитического действия, существенно улучшенной по сравнению с нативной ОРН в отношении ряда субстратов [3]. Вместе с тем созданная для биосинтеза данного белка в клетках *E. coli* высокоэффективная система экспрессии pTES-His₆-ОРН [4], позволившая получать высокий выход фермента от суммарного клеточного белка (до 45%) [3], обеспечивала выход большей его доли (до 60%) в виде неактивных нерастворимых телец включения (ТВ) независимо от используемого для трансформации штамма-хозяина.

Исследование возможности проведения рефолдинга данного белка представляет большой интерес, так как позволяет рассчитывать на то, что последовательное выделение из клеток и очистка растворимой формы His₆-ОРН с последующим рефолдингом His₆-ОРН из ТВ при употреблении одного и того же клеточного материала может обеспечить более полное и рациональное использование биомассы клеток, а также суммарно увеличить выход активной рекомбинантной формы фермента.

Считается, что проведение рефолдинга белков, содержащих полигистидиновые последовательности, в

техническом плане имеет ряд существенных преимуществ перед белками, не содержащими такие последовательности [5]. Это обусловлено тем, что становится возможным применение металл-хелатирующей хроматографии, в основе проведения которой лежит образование прочного комплекса, образующегося между введенной на один из концов молекулы белка His₆-последовательностью и ионами металла (чаще всего Ni²⁺ или Co²⁺), которыми заряжен хроматографический носитель, предварительно модифицированный хелатирующими лигандами. Показано, что образование таких металло-комплексов возможно даже в растворах с большими концентрациями хаотропных агентов, таких как мочевина или гуанидиний гидрохлорид [6–10]. В результате молекулы фермента оказываются прочно иммобилизованными на носителе, что позволяет, во-первых, существенно упростить процедуру очистки ТВ от клеточного дебриса, а во-вторых, осуществить распределение молекул белка в объеме носителя и удерживать их на определенном расстоянии друг от друга, и тем самым снизить возможность их агрегации в процессе рефолдинга. Следует отметить, что агрегация молекул белка, считающаяся негативным явлением, проявляющимся при рефолдинге, возникает в результате межмолекулярных взаимодействий гидрофобных участков белковых глобул, а также при их взаимодействии с гидрофобными компонентами клетки, которые переходят в раствор при солиобилизации ТВ [5].

В качестве носителя для металл-хелатирующей хроматографии чаще всего применяется агароза, модифицированная нитрилтриуксусной кислотой (NTA)

и заряженная ионами Ni^{2+} [6–10], а в качестве денатурирующих агентов – мочевины [5–10] и гуанидиний гидрохлорид [9, 10]. Оптимальные условия проведения рефолдинга не поддаются строгой систематизации и являются уникальными для каждого конкретного белка.

В настоящей работе для иммобилизации His₆-ОРН использован полученный при замораживании полимеризующейся системы (крио-ПААГ) полиакриламидный гель, модифицированный остатками иминодиуксусной кислоты (IDA) [11,12] и заряженный ионами Co^{2+} (Co^{2+} -IDA-крио-ПААГ) [13]. Выбор данного носителя для проведения рефолдинга His₆-ОРН обусловлен тем, что крио-ПААГ обладает существенно большим размером пор по сравнению с агарозой [11,12], что должно способствовать улучшенному пространственному разделению молекул белка по сравнению с низкопористыми носителями на основе агарозы.

Сохранение вторичной структуры белка в процессе его денатурации является важным фактором с точки зрения эффективности рефолдинга, так как это связано с функциональной способностью молекулы ренатурировать в правильном направлении [14]. В качестве хаотропного агента использовали только мочевины, поскольку известно, что использование гуанидиния гидрохлорида для денатурации нативной ОРН приводит к необратимым изменениям во вторичной структуре фермента [15].

Помимо денатурирующего агента на эффективность рефолдинга влияет pH среды [14]. Согласно литературным данным [16], полученным методом кругового дихроизма, вторичная структура нативной ОРН в значительной степени зависит от pH раствора. Показано, что фермент принимает правильную конформацию при pH 7,6, что соответствует его изоэлектрической точке. При этом значении pH проводили процессы денатурации и рефолдинга.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы продемонстрировать принципиальную возможность рефолдинга His₆-ОРН из ТВ и исследовать влияние условий его проведения на выход активной формы фермента из клеточной биомассы. Следует отметить, что ранее рефолдинг органофосфатгидролазы никем не проводился.

Экспериментальная часть

В работе использовали параоксон (диэтил *n*-нитрофенилфосфат), 2-[N-циклогексиламино]этансульфоновую кислоту (CHES, pK_a 9,3), имидазол, хлорид кобальта шестиводный, глицерин, бромфеноловый синий, кумасси бриллиантовый синий R-250, натриевая соль

ампициллина, яичный альбумин, додецилсульфат натрия – препараты фирмы “Sigma” (США); триптон, дрожжевой экстракт фирмы “Difco” (США); акриламид, бисакриламид фирмы “Merck” (Германия), изопропил-²-D-тио-галактопиранозид (ИПТГ), маркеры для белкового электрофореза – набор белков с молекулярными массами 21,5; 31,0; 45,0; 66,2; 94,6 кДа фирмы “Fermentas” (Литва), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония фирмы “Bio-Rad” (США). В качестве носителя для аффинной хроматографии использовали Co^{2+} -IDA-крио-ПААГ, предоставленный компанией “Protiste” (Швеция). Все остальные использованные в работе реактивы марки “ч.д.а.” были приобретены в фирмах “Лабтехника” и “Химмед” (Россия).

Для получения ТВ использовали трансформированные плазмидой pTES-His₆-ОРН [4] клетки *E. coli* DH5 α , которые культивировали при 37°C в питательной среде следующего состава: триптон (12,0 г/л), дрожжевой экстракт (24,0 г/л), глицерин (4,0 мл/л), KH_2PO_4 (6,95 г/л), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (12,54 г/л), pH среды 7,0. Для индукции биосинтеза целевого белка в среду вносили 1 мМ ИПТГ. Через 5 ч после индукции клетки осаждали центрифугированием (5000 g, 15 мин), ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (300 мМ NaCl, 50 мМ фосфата, pH 7,6) и подвергали дезинтеграции ультразвуком (частота 44 кГц, 6 раз по 45 с, между обработками биомассу выдерживали в течение 1 мин во льду). После центрифугирования (15000 g, 30 мин), осадок, содержащий ТВ, несколько раз промывали тем же фосфатно-солевым буфером, дополнительно содержащим 1% Triton X-100 для удаления остатков растворимой формы His₆-ОРН.

Для солюбилизации ТВ использовали растворы мочевины разной концентрации, приготовленные на основе того же фосфатно-солевого буфера с добавлением 5 мМ имидазола. К навескам влажных ТВ добавляли растворы мочевины так, чтобы соотношение их масс составило 1:10. После тщательного ресуспендирования с применением прибора “Vortex” (“Biosan”, “Bio Vortex VI”) проводили инкубирование полученных суспензий при 30 или 37°C при постоянном перемешивании на термостатируемом шейкере (“Biosan ES-20”, 200 об/мин). Для отделения нерастворившейся части ТВ использовали центрифугу “Beckman J-2-21” (США) (15000 g, 30 мин).

Перед нанесением солюбилизированного белка металл-хелатирующий носитель уравнивали тем же буфером, в котором проводили солюбилизацию ТВ. Процесс нанесения раствора белка на хромато-

графический носитель, фолдинг His₆-ОРН в линейном градиенте концентрации мочевины и элюирование фолдированного белка с колонки в линейном градиенте концентраций имидазола (от 0 до 300 мМ) проводили при 4°C и скорости потока 0,5 мл/мин.

Уровень биосинтеза His₆-ОРН, а также гомогенность белкового препарата оценивали с помощью электрофоретического анализа, который проводили в денатурирующих условиях в 12% ПААГ с использованием ячейки "Miniprotean II Bio-Rad" (США), с последующим окрашиванием Кумасси R-250.

Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [17] с применением реагента фирмы "Bio-Rad" (США).

Активность фермента определяли спектрофотометрически (спектрофотометр "Agilent 8453-UV", Германия) при 25°C по накоплению продукта гидролиза 1мМ параоксона (4-нитрофенолят аниона) при 405 нм в 50 мМ карбонатном буфере (рН 10,5, ε = 18000 М⁻¹см⁻¹). Каталитическую реакцию инициировали внесением раствора His₆-ОРН в кювету с буфером и субстратом так, чтобы концентрация фермента в реакционной среде составляла 10⁻¹⁰–10⁻⁹ М.

За единицу ферментативной активности принимали такое количество фермента, которое обеспечивало гидролиз 1кмоль субстрата за 1 мин при 20°C и рН 10,5.

Расчет скоростей ферментативной реакции проводили по начальным линейным участкам кинетических кривых ($v_0 = \text{tg } \alpha$).

Результаты и их обсуждение

Первоначально при подготовке ТВ к сольubilизации необходимо было максимально избавиться от присутствия растворимой активной формы His₆-ОРН во влажном осадке ТВ для более точной оценки эффективности процесса рефолдинга и расчета выхода фермента в активной форме. В связи с этим проводилась трехкратная промывка осадка ТВ фосфатно-солевым буфером, содержащим 1% Triton X-100. Выбор таких условий подготовки ТВ к сольubilизации был обусловлен наличием многочисленных литературных данных [7, 9–10, 18–20], согласно которым в присутствии детергента Triton X-100 отмывка ТВ проходит наиболее эффективно. Остаточная ферментативная активность в осадке контролировалась на каждом этапе обработки ТВ.

Вместе с тем абсолютного удаления растворимой формы из осадка ТВ достичь не удалось, и остаточная активность после всей процедуры отмывки составляла 1,6×10⁻³ ед/мг.

Зависимость эффективности сольubilизации ТВ от условий проведения процесса. Первоначально необходимо было определить концентрацию мочевины, обеспечивающую максимальный переход белка из осадка ТВ в раствор. Для этого сольubilизацию ТВ проводили в растворах мочевины разной концентрации при 37°C. Эффективность процесса перехода белка в растворимую форму контролировали электрофоретически. Из рис. 1 видно, что при увеличении концентрации мочевины, которая применялась для обработки ТВ, наблюдалось увеличение полосы, соответствующей массе целевого белка (36 кДа) от 1 к 3 дорожке электрофореграммы. При этом белковая полоса на 4 дорожке практически не отличалась по ширине от аналогичной полосы на 3 дорожке, что указывает на нецелесообразность увеличения концентрации используемого денатурирующего агента свыше 6 М, так как концентрация белка, переходящего в растворимую форму из осадка ТВ, не увеличивается. Следует отметить, что похожие результаты ранее были получены для других полигистидинсодержащих белков [7, 8]. Помимо этого, согласно литературным данным по денатурации нативной ОРН в растворах мочевины с различной концентрацией [15], 8 М растворы этого денатурирующего агента полностью разрушают вторичную структуру фермента, которая сохраняется более чем на 50% вплоть до концентрации 7 М. При дальнейшей оптимизации процесса сольubilизации ТВ, учитывая полученные результаты, использовали растворы мочевины с концентрацией до 6 М.

Предварительные эксперименты показали, что эффективность растворения ТВ зависит от многих факторов, в частности от температуры проведения процесса, времени экспонирования белка в растворе со-

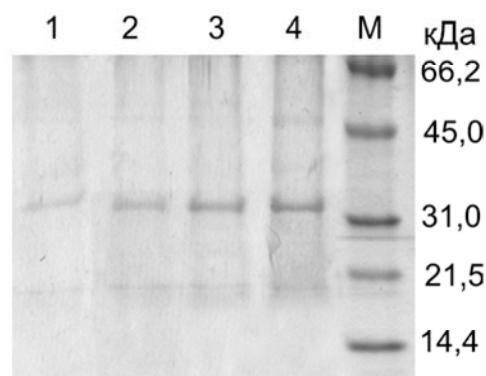


Рис. 1. Электрофореграмма, отражающая уровень растворения ТВ в зависимости от концентрации мочевины в 50 мМ фосфатно-солевом буфере с 300 мМ NaCl (рН 7,6): 1 – 2 М; 2 – 4 М; 3 – 6 М; 4 – 8 М; М – маркеры молекулярного веса

любилизирующего агента и концентрации хаотропного агента (в данной работе – мочевины). Для исследования влияния этих основных факторов на процесс солюбилизации нерастворимой His₆-ОРН навески влажных ТВ ресуспендировали в одинаковых объемах растворов мочевины разной концентрации (2 М, 4 М и 6 М), при этом время экспонирования суспензии ТВ при 30 или 37°C варьировали от 2 до 14 ч. Анализ эффективности солюбилизации ТВ проводили электрофоретически. Согласно полученным результатам (рис. 2), при увеличении концентрации мочевины, а также температуры процесса солюбилизации ТВ доля белка, переходившего в растворимую форму, увеличивалась. Об этом свидетельствовала нарастающая толщина полосы в области 36 кДа. Было показано, что при длительности процесса солюбилизации свыше 2 ч содержание His₆-ОРН в растворе остается неизменным.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что благоприятными условиями для солюбилизации нерастворимой формы His₆-ОРН являются: 6 М мочевины, 37°C и время экспозиции ТВ в мочеvine 2 ч.

Проведение рефолдинга на металл-хелатирующем носителе. Известно, что ренатурация *in vitro* протекает по пути, в основном повторяющему природный, но в искусственной среде путь может разветвляться, приводя в итоге к неправильному сворачиванию полипептидных цепей. Правильное протекание процесса зависит от условий среды, которые не должны препятствовать реализации нативной структуры белка. Состав, температура, рН среды, концен-

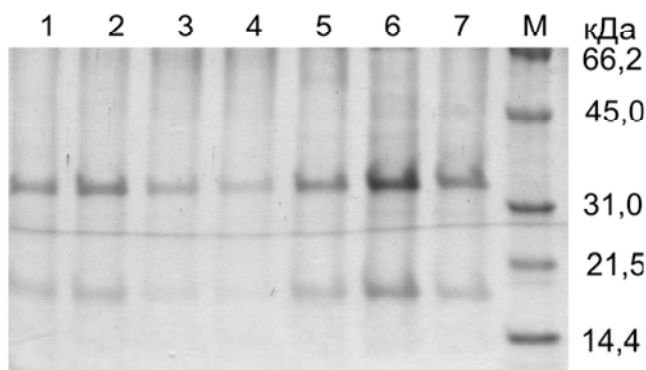


Рис. 2. Электрофореграмма, отражающая эффективность растворения ТВ в зависимости от используемой концентрации мочевины в 50 мМ фосфатно-солевом буфере с 300 мМ NaCl (рН 7,6), температуры и времени инкубирования: 1 – 2 М, 30°C, 2 ч; 2 – 2 М, 30°C, 14 ч; 3 – 4 М, 30°C, 2 ч; 4 – 4 М, 30°C, 36 ч; 5 – 4 М, 37°C, 2 ч; 6 – 6 М, 37°C, 2 ч; 7 – 6 М, 37°C, 10 ч; М – маркеры молекулярного веса

трация белка и денатурирующего агента оказывают существенное влияние на рефолдинг белка [14]. От этих параметров зависит общий заряд и степень гидратации молекулы, величина и соотношение ее заряженных участков, степень их взаимодействия, что определяет ее конформацию, которая в гораздо большей степени зависит от свойств среды перед ренатурацией, чем нативная. Кроме того, ТВ содержат целевой продукт в комплексе с липидными компонентами клетки, нуклеиновыми кислотами и клеточными белками. Эти компоненты могут препятствовать приобретению белковой молекулой нативной пространственной структуры. Освобождение от этих примесей является необходимым условием успешной ренатурации [14].

Опираясь на результаты, полученные в результате предыдущих экспериментов и анализа литературных данных, начальные условия проведения рефолдинга было решено сделать следующими: 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,6, 300 мМ NaCl, 6 или 4 М мочевины, 5 мМ имидазол, 20 или 4°C. Присутствие имидазола в буфере было необходимо для того, чтобы снизить неспецифическое связывание примесных компонентов, возможно, присутствовавших в солюбилизированных ТВ, с хроматографическим носителем.

Поскольку при понижении температуры процесса рефолдинга разница между минимумами энергии, соответствующими промежуточным состояниям молекулы белка, образующимся в ходе рефолдинга, увеличивается, тем самым повышая вероятность попадания белковой глобулы в глобальный минимум, соответствующий нативной конформации, то было решено проводить рефолдинг His₆-ОРН при 4°C.

Профиль процесса рефолдинга His₆-ОРН из ТВ, солюбилизированных в фосфатно-солевом буфере, содержащем 6 М мочевины, при 4°C отражен на рис. 3. Контроль процессов нанесения и элюирования проводили электрофоретически (данные не приводятся). По уменьшению ширины полосы в области 36 кДа был сделан вывод об успешной иммобилизации препарата на носителе.

Скорость линейного градиента мочевины поддерживалась низкой (~0,15 М/ч). Согласно известным результатам [7–10], низкие скорости снижения концентраций хаотропных агентов способствуют протеканию процесса рефолдинга в правильном направлении и увеличивают выход нативной формы фермента. Было установлено, что фермент элюируется с носителя в линейном градиенте имидазола при концентрации 50–150 мМ. Те же условия элюирования ранее были установлены для растворимой формы His₆-ОРН [4].

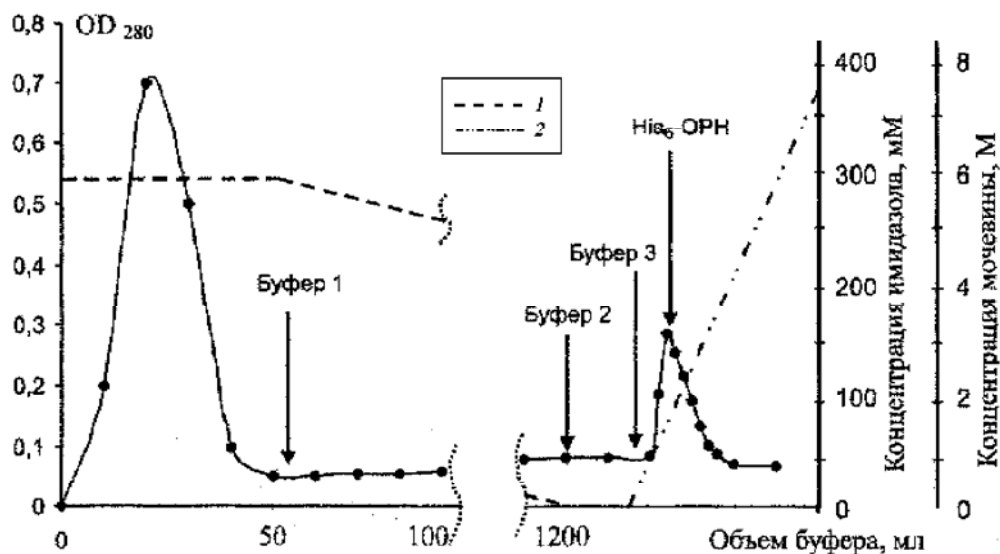


Рис. 3. Хроматографический профиль, отражающий нанесение раствора ТВ, солюбилизированных в 6М мочеvine, на хроматографический носитель Co^{2+} -IDA-криоПААГ, рефолдинг белка и его элюирование. Буфер 1: 50 мМ фосфатно-солевой буфер с 300 мМ NaCl (pH 7,6), линейный градиент мочевины 6-0М (1). Буфер 2: 300 50 мМ фосфатно-солевой буфер с 300 мМ NaCl (pH 7,6). Буфер 3: 50 мМ фосфатно-солевой буфер с 300 мМ NaCl (pH 7,6), градиент имидазола 0–400 мМ (2)

Белок после рефолдинга, элюированный с металл-хелатирующего носителя, подвергали диализу против 50 мМ фосфатного буфера, содержащего 300 мМ NaCl (pH 7,6), в течение 24 ч и проводили его активацию. Диализ His₆-ОРН применяли для удаления имидазола из ферментного препарата, присутствие которого, согласно нашим данным, даже в незначительных концентрациях приводило к серьезным затруднениям при проведении активации фермента.

Активация фермента после рефолдинга. Активацию фермента His₆-ОРН проводили путем добавления к раствору фермента карбонатного буфера (до конечной концентрации 50 мМ) и ионов Co^{2+} (до 10^{-5} М), концентрация фермента при этом составляла $1,2 \times 10^{-7}$ М.

Известно, что ОРН является металлоферментом с двумя ионами Co^{2+} в активном центре и проявляет максимальную ферментативную активность в присутствии ионов Co^{2+} в растворе [1, 2]. Кроме того, известно, что ионы металла в активном центре ОРН координированы при участии карбамилированного остатка Lys-169 [21], который в апо-форме фермента не модифицирован. Также известно, что при концентрации бикарбоната от 30 до 50 мМ ускоряется процесс формирования активного центра фермента [22]. Нами показано, что в присутствии 0,05 М карбонат-ионов и ионов Co^{2+} (10^{-5} М) в буферах с pH 10,5 и 9,0 активность рефолдированного фермента His₆-ОРН достигает максимума в течение 24 ч при 4°C (рис. 4).

Исследована зависимость активации фермента от pH среды. При этом использовался 50 мМ CHES-буфер с 300 мМ NaCl с различными значениями pH (8,0, 8,5 и 9,0). Максимум каталитической активности фермента был отмечен при pH 8,5 и 9,0 только через 10 дней после начала активации (рис.4). Таким образом, буферы, содержащие карбонат-ионы, оказались лучшими для проведения активации исследуемого фермента.

Было установлено, что уровень активности полученного рефолдированного белка (6200 ед/мг) и его каталитические характеристики полностью совпадают с таковыми, ранее установленными для растворимой формы His₆-ОРН [3].

В данной работе впервые была показана принципиальная возможность проведения рефолдинга His₆-ОРН из ТВ, солюбилизированных в мочеvine, с использованием металл-хелатирующего носителя. Были установлены условия, максимально благоприятные для солюбилизации исследуемого белка. Проведен рефолдинг His₆-ОРН и показано получение высокоактивного белка с характеристиками, установленными для растворимой формы His₆-ОРН.

Таким образом, достигнутый результат в процессе проведения рефолдинга His₆-ОРН из ТВ позволил существенно увеличить общий выход активной формы His₆-ОРН из клеточного материала, который используется для выделения растворимой формы His₆-ОРН.

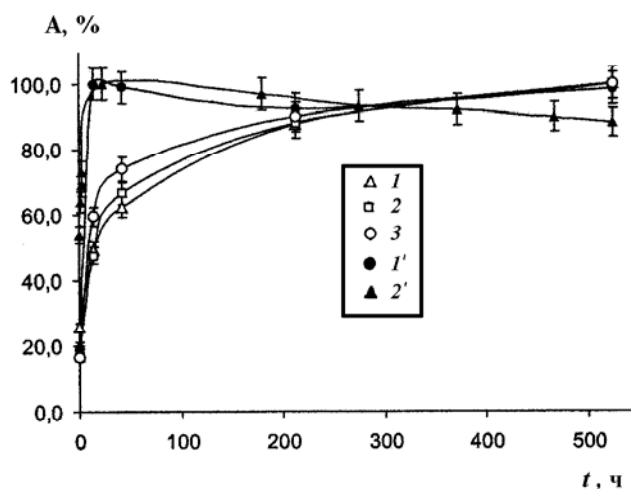


Рис. 4. Активация His₆-ОРН в присутствии ионов Co²⁺ в различных буферах: 50 мМ CHES (1 – pH 8,0; 2 – pH 8,5; 3 – pH 9,0); 50 мМ CHES с добавлением 50 мМ CO₃²⁻, pH 9,0 (1'); 50 мМ COO⁻, pH 10,5 (2')

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко Е., Сергеева В. // Изв. РАН. Сер. Хим. 2001. **10**. С. 1743.
2. Ефременко Е., Варфоломеев С. // Успех. биол. хим. 2004. **44**. С. 307.
3. Вотчищева Ю., Ефременко Е., Алиев Т., Варфоломеев С. // Биохимия. 2006. **76**. С. 216.
4. Ефременко Е.Н., Вотчищева Ю.А., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. // Патент РФ на изобретение № 2255975. (10.07.2005).
5. Jungbauer A., Kaar W., Schleg R. // Curr. Opin. Biotechnol. 2004. **15**. С. 487.
6. Тихонов Р., Печенов С., Гуревич А., Есинов Р., Швец В., Вульфсон А. // Биоорганическая химия. 2001. **27**. С. 40.
7. Lemerciera G., Bakalara N., Santarelli X. // J. Chromatogr. B. 2003. **786**. P. 305.
8. Glynou K., Ioannou P., Christopoulos Th. // Protein Expr. Purif. 2003. **27**. P. 384.
9. Vincent P., Dieryck W., Maneta-Peyret L., Moreau P., Cassagne C., Santarelli X. // J. Chromatogr. B. 2004. **808**. P. 83.
10. Rehm B., Qi Q., Beermann Br., Hinz H.-J., Steinbuechel A. // Biochem. J. 2001. **358**. P. 263.
11. Lozinsky V., Galaev I., Plieva F., Savina I., Jungvid H., Mattiasson B. // TRENDS in Biotechnol. 2003. **21**. P. 445.
12. Arvidsson P., Plieva F., Lozinsky V., Galaev I., Mattiasson B. // J. Chromatogr. A. 2003. **986**. P. 275.
13. E. Efremenko, Y. Votchitseva, F. Plieva, I. Galaev, B. Mattiasson. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. **70**. P. 558.
14. Вульфсон А., Тихонов Р., Печенов С. // Докл. РАН. 2001. **380**. С. 400.
15. Grimsley J., Scholtz M., Pace N., Wild J. // Biochemistry. 1997. **36**. P. 14366.
16. Zheng J., Constantine C., Rastogi V., Cheng T.-Ch., DeFrank J., Leblanc R. // J. Phys. Chem. B. 2004. **108**. P. 17238.
17. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. **72**. P. 248.
18. Middelberg A. // TRENDS in Biotechnol. 2002. **20**. P. 437.
19. Li M., Su Zh.-G., Janson J.-Ch. // Protein Expr. Purif. 2004. **33**. P. 1.
20. Vallejo L., Rinas U. // Microb. Cell Fact. 2004. **3**. P. 11.
21. Raushel F. // Curr. Opin. Microbiol. 2002. **5**. P. 288.
22. Shim H., Raushel F. // Biochemistry. 2000. **39**. P. 7357.

Поступила в редакцию 13.06.07

THE REFOLDING OF ORGANOPHOSPHOROUS HYDROLASE CONTAINING THE HEXAHISTIDINE TAG FROM INCLUSION BODIES

D.A. Gudkov, E.N. Efremenko

(Division of Chemical Enzymology)

The inclusion bodies of organophosphorous hydrolase with hexahistidine tag at the N-terminus of protein molecule were isolated from *E.coli* DH5± cells and purified. Optimal conditions for solubilization of the inclusion bodies, as it was established, were following: 6 M urea in phosphate-saline buffer with pH 7.6; 37°C; 2h. The refolding of the enzyme from solutions of solubilized inclusion bodies was carried out using metal-chelating chromatography. The enzyme activation after its refolding was studied. It was shown that maximum of catalytic activity of the enzyme can be obtained after 24h-incubation at 4°C in solutions with 0.05M CO₃²⁻-ions and Co²⁺ ions (10⁻⁵M).