



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14748 (13) A

(51) C 12 N 15/00

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3789-ХІІ від 23.XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) ПЛАЗМІДНИЙ ЕКСПРЕСУЮЧИЙ ВЕКТОР pCcore 102 Δ, МАЮЧИЙ ПОСЛІДОВНІСТЬ ДНК, ВІДПОВІДАЮЧУ ЗА ЕКСПРЕСІЮ В БАКТЕРІЯХ E. coli ГІБРИДНОГО ЗЛИТНОГО БІЛКА pCore ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С

1

2

(21) 96124978

(22) 30.12.96

(24) 04.02.97

(46) 30.06.97. Бюл. № 3

(47) 04.02.97

(72) Черепанов П'ютр Алексеевич (RU),
Міхайлова Татьяна Гаврілівна (RU),
Мартиненко Дмитро Леонідович, Чумах Ро-
стислав Максимович(73) Акціонерне товариство закритого типу нау-
ково-виробничої компанії "Діапроф Мед" (UA)(57) Плазмідний експресуючий вектор
pCcore 102 Δ маючий послідовність ДНК,
відповідаючу за експресію в бактеріях E. coli
гібридного злитного білка pCore вірусу гепа-
титу С, який кодує під контролем промотора
фага лямбда послідовність білка pCore
вірусу гепатиту С загальною формулою (N-
beta-Gal-pCore-COOH), молекулярною ма-
сою 49,6 кД, що продукує штам бактерій
E. coli ITG-102.Винахід відноситься до розділу молеку-
лярної біології, генної інженерії і може бути
використаний при біотехнологічному син-
тезі білка pCore вірусу гепатиту С і в меди-
чині, для конструювання тест-систем,
придатних для виявлення антитіл до вірусу
гепатиту С в сироватках крові пацієнтів.Прототипами винаходу є сімейство бак-
теріальних експресійних векторів типу
pEX1-3 (Keith K Stanley and Paul Luslo,
Construction of a new family of high efficiency
bacterial expression vectors: identification of
cDNA clones for human liver proteins.//EMBO
Journal, vol 3, № 6, p. 1429-1434). Ці вектори
походять від crolacZ злитних плазмід, які
експресують велику кількість злитних білків
під контролем Pr промотору фагу лямбда.В основу винаходу покладене завдання
створити генно-інженерну конструкцію, яказабезпечить мікробіологічний синтез в E. coli
злитного білка pCore вірусу гепатиту С.Суть винаходу полягає в одержанні мо-
дифікованої послідовності плазмідної ДНК,
відповідаючої за синтез злитного білка
pCore вірусу гепатиту С.Для цього була створена рекомбінантна
плазміда pCcore 102 Δ яка містить наступні
інсерційні фрагменти ДНК: фрагмент гену
Cro, розміром 51 п.о., фрагмент LacI,
розміром 114 п.о., фрагмент Lac Z, розміром
1050 п.о. і фрагмент ДНК, відповідаючий
послідовностям білку Core вірусу гепатиту С,
розміром 1314 п.о.Одержаною модифікованою плазмідною
трансформували клітини E. coli. Ре-
комбінантні клони E. coli нарощували і тес-
тували методом Імуноблотінгу,
використовуючи сироватки крові людини.

(19) UA (11) 14748 (13) A

які утримували антитіла до структурних білків вірусу гепатиту С. Подальша модифікація плазмиди складалась в одержанні делеції розміром 624 п.о. в області бета-галактозидного гена рестриктазою Hpa-I. Фізична карта одержаного плазмідного вектора приведена в додатку 1. Плазміда рKCore 102 Δ кодує гібридний білок молекулярною масою 49,6 кД (437 амінокислот).

Штам – продуцент гібридного білка (ITG-102) одержували трансформацією клітин *E. coli* Y1090 плазмідною рKCore 102.

Клітини-продуценти ростуть добре на простих поживних середовищах при температурах 32–42°C. При рості на м'ясо-пептонному поживному агарі формують гладкі, круглі, плоскі, сірі, блискучі колонії з рівними краями. При рості на рідких поживних середовищах утворюють інтенсивну муть.

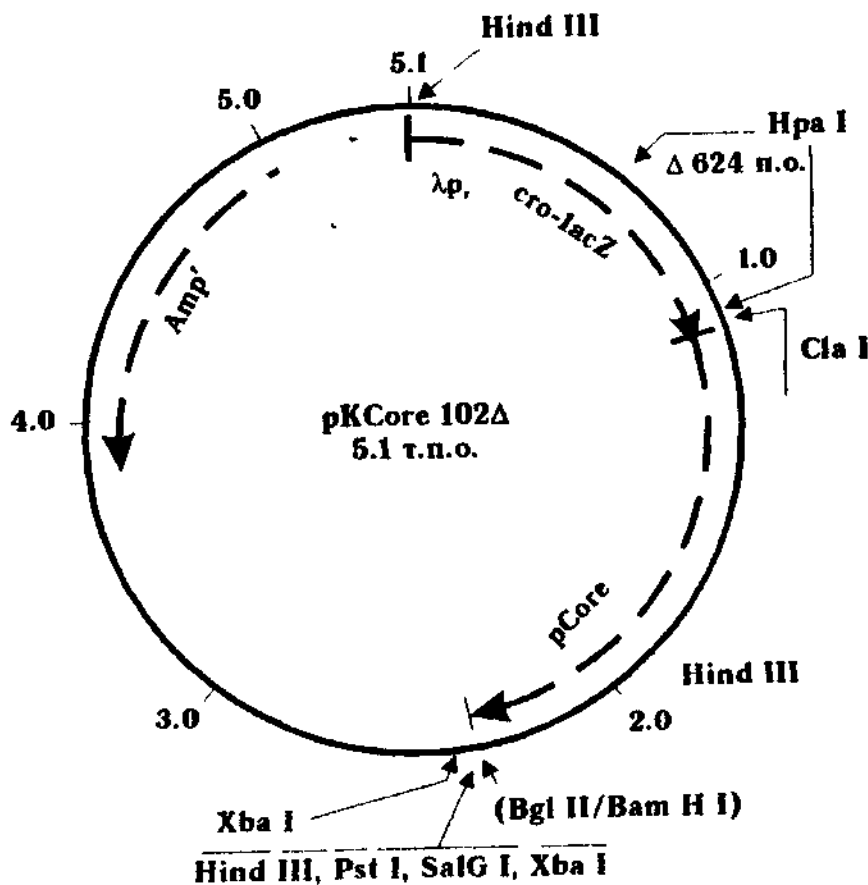
Джерелом вуглеводів для клітин є вуглеводи, спирти, органічні кислоти. Клітини не споживають ацетат, аданіт, лактозу, ксилоту. Джерелом азоту з'являються пептон, амінокислоти і мінеральні солі в амонійній і нітратній формах. Клітини ростуть при pH 6,0–8,0. Синтез гібридного білка відбувається при вирощуванні культури *E. coli* ITG-102 при температурі 32–42°C.

В оптимальних умовах ферментації рекомбінантного штаму гібридний білок нагромаджується усередині клітин в нерозчиненій формі у вигляді тілець включення і по кількості складає до 10% всього білка клітин. Гликозилювання білка відсутнє.

Клітини рекомбінантного штаму виявляють стійкість до ампіциліну, обумовлену рекомбінантною плазмідною рKCore 102 Δ .

20

ДОДАТОК 1



Рестриційна карта рекомбінантної плазмиди рKCore 102 Δ
 Δ - делеція

Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка

рCoreΔ, 437 амінокислоти. Молекулярна маса рекомбінантного білка 49,6 кД. Ізоелектрична точка рекомбінантного білка PI = 9,94

MEQRITLKEA WDRSGAWLLP VSLVKRKTIL APNTQTASPR ALADSLMOLA RQVSRLNRLA
 AHPPFASWRN SEEARTDRPS QQLRSLNGEW RFAWFPAPEA VPESWLECDL PEADTVVVPS
 NWQMHGYDAP IYTNVTYPIT VNPPFVPTEN PTGCYSLTFN VDESWLOEGO TRIIFDGVNS
 AFHLWCNGRW VGYGQDSRLP SEFDLSAFLR AGENRLAVMV LRWSDGSYLE DQDMWRMSGI
 FRDVSLLHKP TQISDFHVA TRFNDDFSRA VLEAEVQMCQ ELRDYLRVTV SLWQGETOVA
 SGTAPFGGEI IEFPGIPNPK PQRKTKRNTN RRPQDVKEFG GGQIVGGVYL LPRRGPRLGV
 RAPRKTSERS QPRGRRQPIP KARRPEGRW AQPGYPWPLY GNEGIGWAGW LLSPRGSRPS
 WGPTDPRRRS RNOCSQAC

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор О. Кравцова

Замовлення 4149

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
 254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрито акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

