



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14744 (13) A

(51)6 C 12 N 15/00

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) ПЛАЗМІДНИЙ ЕКСПРЕСУЮЧИЙ ВЕКТОР PKS 103, МАЮЧИЙ ПОСЛІДОВНІСТЬ ДНК, ВІДПОВІДАЮЧУ ЗА ЕКСПРЕСІЮ В БАКТЕРІЯХ E. COLI ЗЛИТНОГО БІЛКА ОБОЛОНКИ ТРЕПАТЕМА PALLIDUM

1

(21) 96124980

(22) 30.12.96

(24) 04.02.97

(46) 30.06.97. Бюл. № 3

(47) 04.02.97

(72) Черепанов П'ютр Алексєєвич (RU),
Міхайлова Тат'яна Гавріловна (RU),
Мартиненко Дмитро Леонідович, Чумак Ро-
стислав Максимович(73) Акціонерне товариство закритого типу на-
уково-виробнича компанія "Діапроф Мед" (UA)

2

(57) Плазмідний експресуючий вектор pKS 103, маючий послідовність ДНК, відповідаючу за експресію в бактеріях E. coli злитного білка оболонки Трепанема Pallidum, який кодує під контролем промотора фага лямбда послідовність білка, відповідаючу за експресію в бактеріях E. coli злитного білка оболонки Трепанема Pallidum загальною формулою (N-бета-Gal-pTr-COOH) молекулярною масою 106 кД, що продукує штам бактерій E. coli Tr 15.

Винахід відноситься до розділу молекулярної біології, генної інженерії і може бути використаний при біотехнологічному синтезі білка оболонки Трепанема Pallidum і в медицині, для конструювання тест-систем, придатних для виявлення антитіл до Трепанема Pallidum в сироватках крові пацієнтів.

Прототипами винаходу є сімейство бактеріальних експресійних векторів типу pEX1-3 (Keith K Stanley and Paul Lusio, 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, яка забезпечить мікробіологічний синтез в

E. coli злитного білка оболонки Трепанема Pallidum.

Суть винаходу полягає в одержанні модифікованої послідовності плазмідної ДНК, відповідаючої за синтез злитного білка оболонки Трепанема Pallidum.

Для цього була створена рекомбінантна плазміда pKS 103, яка містить наступні інсерційні фрагменти ДНК: фрагмент гену Cro, розміром 51 п.о., фрагмент LacI, розміром 114 п.о., фрагмент LacZ, розміром 1050 п.о. і фрагмент ДНК, відповідаючий послідовностям білку оболонки Трепанема розміром 2649 п.о.

Одержаною модифікованою плазмідною трансформували клітини E. coli. Рекомбінантні клони E. coli вирощували і тестували методом імуноблотінгу, використовуючи сироватки крові людини, які утримували антитіла до структурних білків вірусу гепатиту

(19) UA (11) 14744 (13) A

С. Фізична карта одержаного плазмідного вектора приведена в додатку 1. Плазмід рKS 103 кодує гібридний білок молекулярною масою 106 кД (883 амінокислоти).

Штам - продуцент гібридного білка (Tr-15) одержували трансформацією клітин *E. coli* Y1090 плазмідом рKS 103.

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.

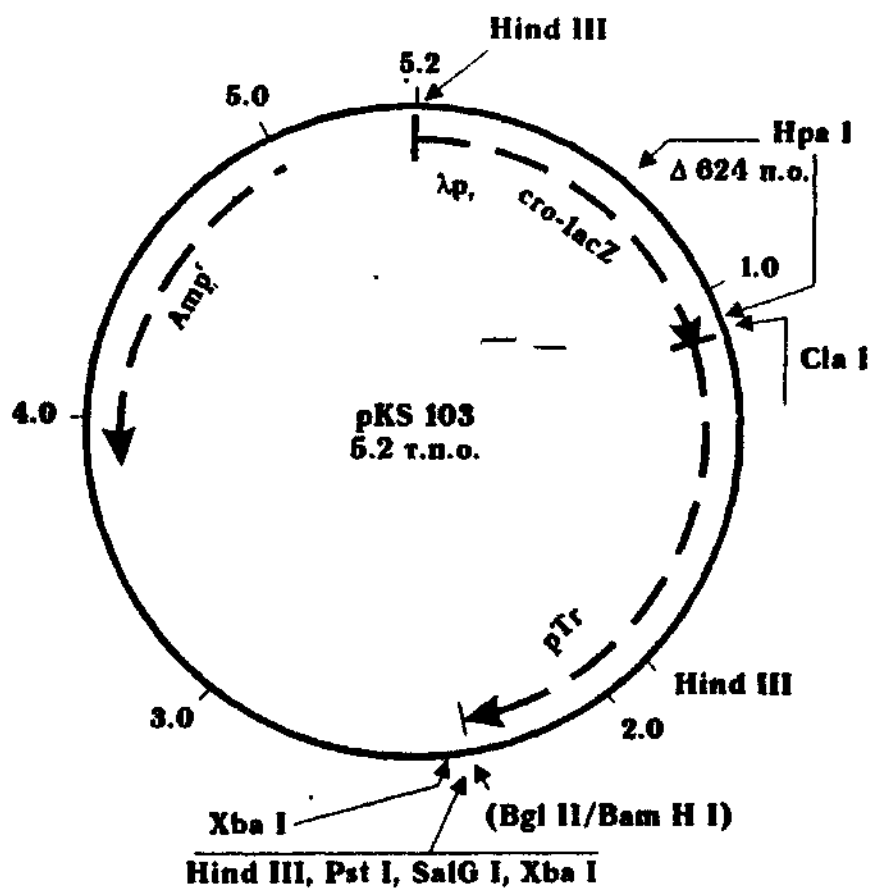
Джерелом вуглеводів для клітин є вуглеводи, спирти, органічні кислоти. Клітини не

споживають ацетат, аданін, лактозу, ксилозу. 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* Tr-15 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 плазмідом рKS 103.

ДОДАТОК 1



Рестриційна карта рекомбінантної плазмиди рKS 103

Δ - делеція

Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка
Теропепа pallidum, 883 амінокислоти. Молекулярна маса реком-
 бінантного білка 106 кД.

HKVGRNVYLP	PREGELSCNS	TVTSIIANID	WONNNQTNIT	FSAEVAELYS	LELG DYKLVE
ITPIGFAPTK	EKRYSSAHGR	HTRGVFVLGF	LGFLATAGSA	MGAASLTVSA	QSRTLLAGIV
QQQQQLLDVV	KRQOELLRLT	VMGKNLOAR	VTAEIKYLOD	QARLNSWGCA	FROVCHTTPV
WNDSLAPDW	DNMTWQEWK	QVRYLEANIS	KSLEQAQIQO	EKNMYELOKL	NSWDIFGNWF
DLTSWKYIQ	YGVLIIVAVI	ALRIVIVVVO	MLSRRLKGYR	PVFSSPPGYI	QQIHINKDRG
HKVGRNVYLP	PREGELSCNS	TVTSIIANID	WONNNQTNIT	FSAEVAELYS	LELG DYKLVE
ITPIGFAPTK	EKRYSSAHGR	HTRGVFVLGF	LGFLATAGSA	MGAASLTVSA	QSRTLLAGIV
QQQQQLLDVV	KRQOELLRLT	VMGKNLOAR	VTAEIKYLOD	QARLNSWGCA	FROVCHTTPV
WNDSLAPDW	DNMTWQEWK	QVRYLEANIS	KSLEQAQIQO	EKNMYELOKL	NSWDIFGNWF
DLTSWKYIQ	YGVLIIVAVI	ALRIVIVVVO	MLSRRLKGYR	PVFSSPPGYI	QQIHINKDRG
GCRQILGQLQ	PSLOTGSEEL	RSLYNTVATL	YCVHQRIEIK	DTKEALDKIE	EEQNKSCKKA
QAAAADTGHS	SQVSONYPIV	QNIQGMVHO	AISPRTLNAW	VKVVEEKAFS	PEVIPNFSAL
SEGATPDQLN	TMLNTVGGHQ	AAMQMLKETI	NEEAAEWDRV	HPVHAGPIAP	GONREPRGSD
IAGTTSTLQE	QIGWMTNNPP	IPVGEIYKRW	IILGRNKIVR	MYSPTSILDI	RQGPKEPFRD
YVDRFYKTLR	AEQASQEVKN	WMTETLLVON	ANPDCKTILK	ALG	

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор О. Кравцова

Замовлення 4149

Тираж

Підписне

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

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

