



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14745 (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 р.Публікується
в редакції заявника

(54) ПЛАЗМІДНИЙ ЕКСПРЕСУЮЧИЙ ВЕКТОР pCcore 101, МАЮЧИЙ ПОСЛІДОВНІСТЬ ДНК, ВІДПОВІДАЮЧУ ЗА ЕКСПРЕСІЮ В БАКТЕРІЯХ E.coli ГІБРИДНОГО ЗЛИТНОГО БІЛКА pCore ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С

1

(21) 96124981

(22) 30.12.96

(24) 04.02.97

(46) 30.06.97. Бюл. № 3

(47) 04.02.97.

(72) Черепанов Пётр Алексеевич (RU),
Міхайлова Татьяна Гаврілівна (RU),
Мартиненко Дмитро Леонідович, Чумак Ро-
стислав Максимович(73) Акціонерне товариство закритого типу нау-
ково-виробнича компанія "Діапроф Мед" (UA)

2

(57) Плазмідний експресуючий вектор pCcore 101, маючий послідовність ДНК, відповідаючу за експресію в бактеріях E. coli гібридного злитного білка pCore вірусу гепатиту С, який кодує під контролем промотора фага лямбда послідовність білка pCore вірусу гепатиту С загальною формулою (N-бета-Gal-pCore-COOH), молекулярною масою 132 кД, що продукує штам бактерій E. coli ITG-101.

Винахід відноситься до розділу молекулярної біології, генної інженерії і може бути використаний при біотехнологічному синтезі білка pCore вірусу гепатиту С і в медицині, для конструювання тест-систем, придатних для виявлення антитіл до вірусу гепатиту С 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 spoIacZ злитних плазмід, які експресують велику кількість злитних білків під контролем Pr промотору фага лямбда.

В основу винаходу покладене завдання створити генно-інженерну конструкцію, яка

забезпечить мікробіологічний синтез в E. coli злитного білка pCore вірусу гепатиту С.

Суть винаходу полягає в одержанні модифікованої послідовності плазмідної ДНК, відповідаючої за синтез злитного білка pCore вірусу гепатиту С.

Для цього була створена рекомбінантна плазміда pCcore 101, яка містить наступні інсерційні фрагменти ДНК: фрагмент гену Cro, розміром 51 п.о., фрагмент Lac1, розміром 114 п.о., фрагмент Lac Z, розміром 1050 п.о. і фрагмент ДНК, відповідаючий послідовностям білку Core вірусу гепатиту С, розміром 3492 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) 14745 (13) A

С. Фізична карта одержаного плазмідного вектора приведена в додатку 1. Плазмідна рKCore 101 кодує гібридний білок молекулярною масою 132 кД (1161 амінокислота).

Штам – продуцент гібридного білка (ITG-101) одержували трансформацією клітин *E. coli* Y1090 плазмідною рKCore 101.

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.

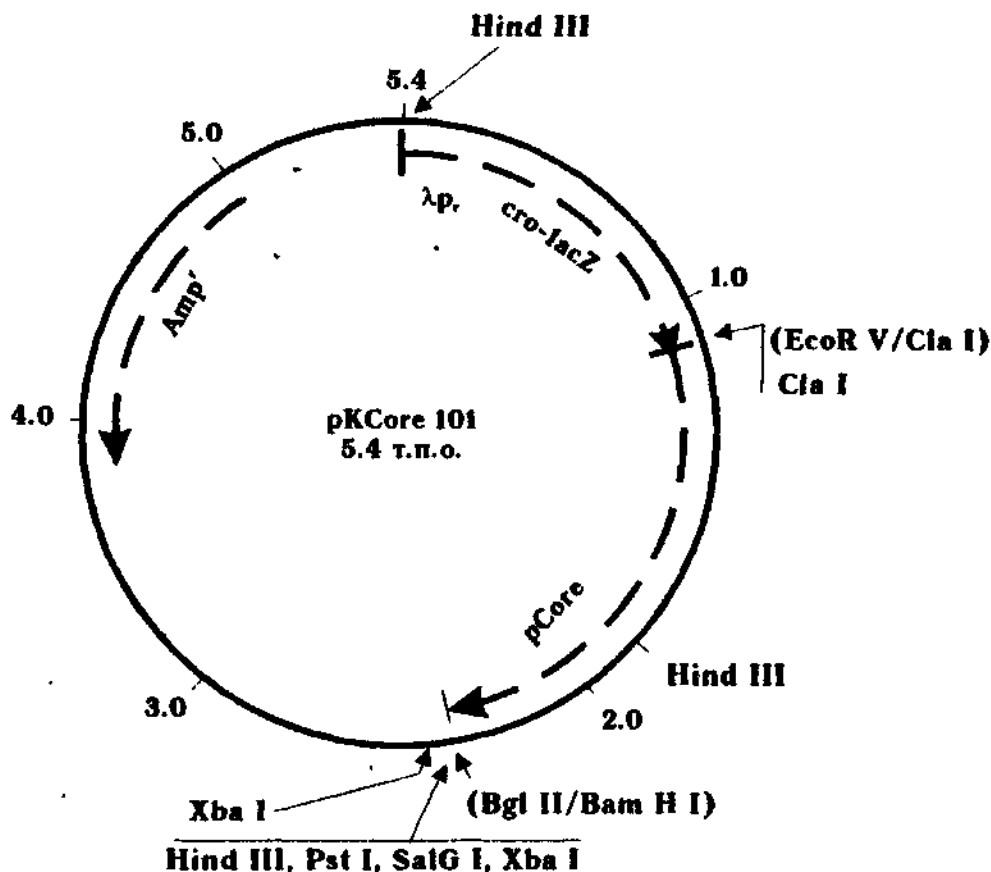
Джерелом вуглеводів для клітин є вуглеводи, спирти, органічні кислоти. Клітини не

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* ITG-101 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 101.

ДОДАТОК 1



Рестриційна карта рекомбінантної плазмиди рKCore 101

Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка
pCore, 1163 амінокислота. Молекулярна маса реком-
бінантного білка 132 кД. Ізоелектрична точка
рекомбінантного білка PI = 6,62

MEQRITLKEA WDRSGAWLLP VSLVKRKITL APNTQTASPR ALADSLMOLA ROVSRLNRLA
 AHPPFASWRN SEEARTDRPS QQLRSLNGEW RFAWFPAPEA VPESWLECDL PEADTVVVPS
 NWQMHGYDAP IYTNVTYPIT VNPPFVPTEN PTGCYSLTFN VDESWLQEGQ TRIIFDGVNS
 AFHLWCNGRW VGYGQDSRLP SEFDLSAFLR AGENRLAMV LRWSDGSYLE DQDMWRMSGI
 FRDVSLLHKP TQISDFHVA TRFNDDFSRA VLEAEVOMCG ELRDYLRVTV SLWOGETOVA
 SGTAPFGGEI IDERGGYADR VTLRLNVENP KLWSAEIPNL YRAVVELHTA DGTLEAEAC
 DVGFEVRIE NGLLLNGKP LLIRGVNRHE HHPLHGQVMD EQTMVQDILL MKONNFNAVR
 CSHYPNHLW YTLCDRYGLY VVDEANIETH GMVPMNRLTD DPRWLPAMSE RVTMVRDR
 NHPSVIIWSL GNEGHGANH DALYRWIKSV DPSRPVQYEG GGAOTATDI ICPMYARVDE
 DQPFPAVPKW SIKKWLSLPG ETRPLILCEY AHAMGNSLGG FAKYWOAFRO YPRLOGGFVW
 DWVDOSLIKY DENGPNWSAY GGDGFDTPND RQFCMNGLVF ADRTPHPALT FAKHQQFFQ
 FRLSGOTIEV TSEYLFHSD NELLHWMVAL DGKPLASGEV PLOVAPOGKO LIEPELPOP
 ESAGQLWLTV RVVOPNATAW SEAGHISAWQ QWRLAENLSV TLPAASHAIP HLTSEMDFC
 IELGNKRWF NROSGFLSOM WIGDKKOLLT PLRDQFTRAP LDNDIGVSEA TRIDPNAWVE
 RWKAAGHYOA EAALLOCTAD TLADAVLIT AHAWOHOGKT LFISRKTYRI DGGGOMAITV
 DVEVASDTPH PARIGLNCOL AQVAERVNWL GLGPOENYPD RLTAACFDRW DLPLSDMYTP
 YVFPSENGLR CGTRELNYGP HQRGDFQFN ISRYSOQQLM ETSRHLHA EEGTWNIDG
 FHMIGGDDS WSPSVSAEP GIPNPKPQK TKRNTNRRPO DVKFPGGGQI VGGVYLLPRR
 GPRLGVRAPR KTSERSQPRG RRQIPKARR PEGRTWAQPG YPWPLYGNEG LGWAGWLLSP
 RGRPSWGPT DPRRRSRNCS QAC

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

