



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14746 (13) A

(51)6 C 12 T 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) РЕКОМБІНАНТНИЙ, ОЧИЩЕНИЙ, МОДИФІКОВАНИЙ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНО БІЛОК, ПРОДУКОВАНИЙ БАКТЕРІЯМИ E. COLI, ІМІТУЮЧИЙ БІЛОК ОБОЛОНКИ TREPANEMA PALLIDUM

1

(21) 96124982
(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) Рекombінантний, очищений, мо-
дифікований генно-інженерно білок,
продукований бактеріями E. coli, імітуючий
білок оболонки Trepanema pallidum, який
має основні імунодомінантні епітопи,
притаманні нативному білку, має молеку-
лярну масу 106 кД, містить в собі 883
амінокислотних залишків і відповідає за-
гальній формулі N-бета-Gal-pTr-COOH.

Вінахід відноситься до розділу молеку-
лярної біології, генної інженерії і може бути
використаним в біотехнології і медицині для
конструювання діагностичних тест-систем і
наукової праці.

Аналогом рекомбінантного білка є
структурний білок оболонки Trepanema
pallidum.

В основу винаходу покладено завдання
створити генно-інженерними методами
білок, який би мав основні імунодомінантні
епітопи притаманні нативному білку і був
придатним для використання в ІФА тест-си-
стемах, які виявляють антитіла до
Trepanema pallidum.

Суть винаходу полягає в одержанні під
контролем плазмідного експресуючого век-
тора pKS-103 рекомбінантного білка, який
має основні імунодомінантні епітопи
притаманні нативному білку Trepanema
pallidum.

Плазмідний вектор pKS-103 розміром
5,2 т.п.н., має маркер ампіцилінре-
зистентності і, після трансформування в
E. coli (штам Y1090), під контролем
промотора фага лямбда Pr, забезпечує кон-
ститутивний синтез несекретуємого білка,
який нагромаджується в цитоплазмі клітин
бактерій в пізній логарифмічній, або ранній
стаціонарній фазі росту культури. Культиву-
вання бактерій проводять при 32-39
градусах на середовищі LB з добавкою
ампіциліна (50 мкг/мл) на протязі 6-8 годин.
Після закінчення культивування клітини
осаджують центрифугуванням при 8000
об/хв на протязі 10 хв при 4 градусах, над-
осадову рідину відкидають, а осад суспенду-
ють в ТЕ розчині (0,01M Tris-HCl, pH 8,0
ЕДТА 0,001M).

Суспензію клітин руйнують лізоцимом,
ультразвуком, обробляють ДНКазою до
зникнення в'язкості розчину, перемішують в

(19) UA (11) 14746 (13) A

емультаторі 5 хв і центрифугують при 12000 об/хв на протязі 30 хвилин. Останні дві операції проводять ще 5 раз, кожен раз ресуспендуючи осад в розчині TE.

Осад, який являє собою "тілець включення", розчиняють в воді, додають Tris-HCl до 20 mM, pH 8,0 і сечовину до 8M і інкубують ніч при 4 градусах для руйнування "тілець включення".

Кінцевий цільовий продукт являє собою злитий рекомбінантний білок молекулярною масою 106 кД, який виявляється мажорною смугою при електрофорезі в поліакриламідному гелі I в імуноблоці з антисироваткою до Trepanema pallidum, містить в собі 883 амінокислотних залишка, має ізoeлектричну точку 6,62 і відповідає загальній формулі N-бета-Gal-pTr-COOH (див. додаток 1).

Додаток

HKVGRNVYLP	PREGELSCNS	TVTSIIANID	WONNNOTNIT	FSAEVAELYP	LELGQYKLYE
ITPIGFAPTK	EKRYSSAHGR	HTRGVFVLGF	LGFLATAGSA	MGAASLTVSA	QSRTLLAGIV
QQQQQLLDVV	KRQOELLRLT	VWGTKNLQAR	VTAEKYLOD	QARLSWGCA	FROVCHTTVP
WVNDLAPDW	DNMTWOEWK	QVRYLEANIS	KSLEOAOIQO	EKNMYELOKL	NSWDIFGNWF
DLTSWVKYIQ	YGVLIIVAVI	ALRIVYVVO	MLSRRLKGYR	PVFSSPPGYI	QQIHIIHKDRG
HKVGRNVYLP	PREGELSCNS	TVTSIIANID	WONNNOTNIT	FSAEVAELYP	LELGQYKLYE
ITPIGFAPTK	EKRYSSAHGR	HTRGVFVLGF	LGFLATAGSA	MGAASLTVSA	QSRTLLAGIV
QQQQQLLDVV	KRQOELLRLT	VWGTKNLQAR	VTAEKYLOD	QARLSWGCA	FROVCHTTVP
WVNDLAPDW	DNMTWOEWK	QVRYLEANIS	KSLEOAOIQO	EKNMYELOKL	NSWDIFGNWF
DLTSWVKYIQ	YGVLIIVAVI	ALRIVYVVO	MLSRRLKGYR	PVFSSPPGYI	QQIHIIHKDRG
GCRQILGQLO	PSLOTGSEEL	BSLYNTVATL	YCVHORIIEK	DTKEALDKIE	EEQNKSKKKA
QOAAADTGHS	SOVSONYPIV	ONIOGOMVHO	AISPRTLNAW	VKVVEEKAFS	PEVIPNFSAL
SEGATPODLN	TMLNTVGGHQ	AAMQMLKETI	NEEAAEWDRV	HPVNAGPIAP	GQNPREGSD
IAGTTSTLOE	QIGWMTNPP	IPVGEIYKRW	IILGRNKIVR	MYSPTSILDI	ROGPKEPFRD
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