



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 14749 (13) A
(51)6 C 12 N 15/00

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

без 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 pKNSCORE 100, МАЮЧИЙ ПОСЛІДОВНІСТЬ ДНК, ВІДПОВІДАЮЧУ ЗА ЕКСПРЕСІЮ В БАКТЕРІЯХ E. COLI ГІБРИДНОГО ЗЛИТНОГО БІЛКА NS4-PCORE ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С

1

2

(21) 96124984

(22) 30.12.96

(24) 04.02.97

(46) 30.06.97. Бюл. № 3

(47) 04.02.97

(72) Черепанов Пьотр Алексеевич (RU),
Міхайлова Татьяна Гавріловна (RU),
Мартиненко Дмитро Леонідович, Чумак Ро-
стислав Максимович

(73) Акціонерне товариство закритого типу
науково-виробнича компанія "Діапроф Мед"
(UA)

(57) Плазмідний експресуючий вектор pKNScore 100, маючий послідовність ДНК, відповідаючу за експресію в бактеріях E. coli гібридного злитного білка NS4-pCore вірусу гепатиту С, який кодує під контролем промотора фага лямбда послідовність білка NS4-pCore вірусу гепатиту С загальною формулою (N-бета-Gal-NS4-pCore-COOH), молекулярною масою 56 кД, що продукує штам бактерій E. coli ITG-100.

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, pp. 1429-1434). Ці вектори походять від colacZ злитих плазмід, які експресують велику кількість злитих 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 NS4-pCore вірусу гепатиту С.

Суть винаходу полягає в одержанні модифікованої послідовності плазмідної ДНК, відповідаючої за синтез злитного білка NS4-pCore вірусу гепатиту С.

Для цього була створена рекомбінантна плазміда pKNScore 100, 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 злитним послідовностям білків NS4 і pCore вірусу гепатиту С, розміром 1488 п.о.

(19) UA (11) 14749 (13) A

Одержаною модифікованою плазмідною трансформували клітини *E. coli*. Рекombінантні клони *E. coli* вирощували і тестували методом Імуноблотінгу, використовуючи сироватки крові людини, 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. Плазмідна рKNSCore 100 кодує гібридний білок молекулярною масою 56 кД (496 амінокислот).

Штам-продуцент гібридного білка (ITG-100) одержували трансформацією клітин *E. coli* Y1090 плазмідною рKNSCore 100.

Клітини-продуценти ростуть добре на простих поживних середовищах при температурах 32–42°C. При рості на м'ясо-пептонному поживному агарі формують гладкі,

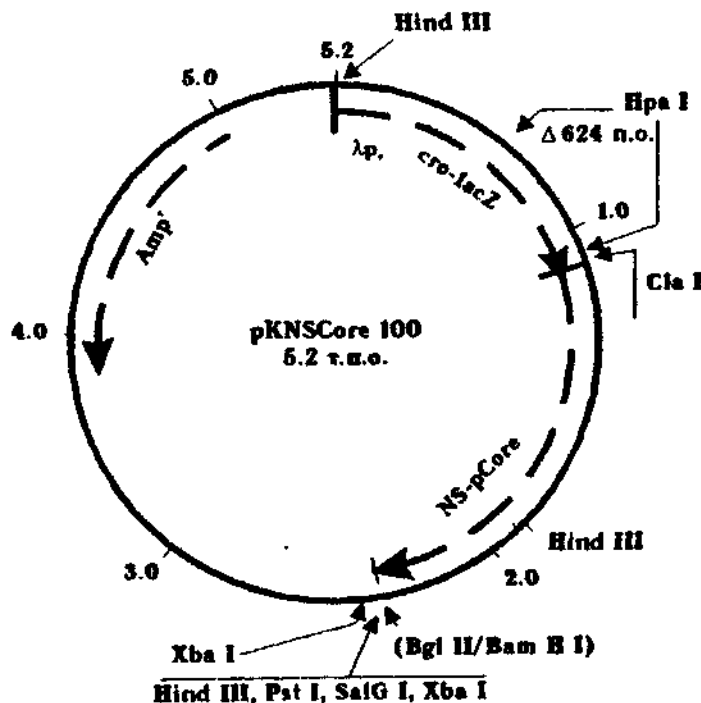
круглі, плоскі, сірі, блискучі колонії з рівними краями. При рості на рідких поживних середовищах утворюють інтенсивну муть.

Джерелом вуглеводів для клітин є вуглеводи, спирти, органічні кислоти. Клітини не споживають ацетат, аданіт, лактозу, 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-100 при температурі 32–42°C.

В оптимальних умовах ферментації рекombінантного 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 рекombінантного штаму виявляють стійкість до ампіциліну, обумовлену рекombінантною плазмідною рKNSCore 100.

ДОДАТОК 1



Рестриційна карта рекombінантної плазмиди рKNSCore 100
Δ - делеція

Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка
NS-pCore, 1488 амінокислоти. Молекулярна маса рекомбінантного білка 56 кД.
Iзоелектрична точка рекомбінантного білка $PI \approx 6,62$

```
MEQRITLKEA WDRSGAWLLP VSLVKRKTTL APNTQTASPR ALADSLMOLA ROVSRLNRLA
AHPPFASWRN SEEARTDRPS QQLRSLNGEW RFAWFPAPEA VPESWLECDL PEADTVVVP
NWQMHGYDAP IYTNVTYPIT VNPPFVPTEN PTGCYSLTEN VOESWLOEGQ TRIIFDGVNS
AFHLWCNGRW VGYGQDSRLP SEFDLSAFLR AGENRLAVMV LRWSGGSYLE DODMWRMSGI
FRDVSLHKP TQISDFHVA TRFNDDFSRA VLEAEVQMG ELRDYLRVT SLWOGETOVA
SGTAPFGGEI IDERGGYADR VTLRLNVENP KLWSAEIPNL YRAVVELHTA DGTLEAEAC
DVGFEVRIE NGLLLLNGKP LLIRGVNRHE HHPLHGQVMD EQTMVODILL MKONNFNAVR
CSHYPNHPLW YTLCDRYGLY VVDEANIETH GMVPMNRLTD DPRWLPAMSE RVTAMVQRDR
MHPSVIIWSL GNESEGHGANH DALYRWIKSV DPSRPVQYEG GGADTTATDI ICPMYARVDE
DQPFPAVPKW SIKKWLSLPG ETRPLILCEY AHAMGNSLGG FAKYWOAFRQ YPRLOGGFVW
DWVDQSLIKY DENGPNWSAY GGDFGDTPOD RQFCMNGLVF ADRTPHPALT EAKHQOQFFQ
FRLSGOTIEV TSEYLFHSD NELLHWMVAL DGKPLASGEV PLDVAPOGKQ LIELPELPOP
ESAGQLWLT RVVOPNATAW SEAGHISAWQ QWRLAENLSV TLPAASHAIP HLTSEMDFC
IELGNKRWF NRQSGFLSOM WIGDKKQLT PLRDQFTRAP LNDIGVSEA TRIDPNAWVE
RWKAAGHYQA EAALLOCTAD TLADAVLITT AHAWQHOGKT LFISRKTYRI DSGGQMAITV
DVEVASDTPH PARIGLNCQL AQVAERVNWL GLGPQENYPO RLTAACFORW DLPLSDMYTP
YVFPSENGLR CGTRELNYPG HQWRGDFOFN ISRYSQOQLM ETSRHLHA EGTWLNIDG
FHMIGGDDS WSPSVSAEFP GIPNPKPQK TKRNTNRRPQ DVKFPGGGQI VGGVYLLPRR
GPRLGVRAPR KTSERSQPRG RROPIPKARR PEGRTWAOPG YPWPLYGNEG LGWAGWLLSP
RGSRPSWGPT DPRRHSRNC S QACAGSTMGA ASMTLTVQAR QLLSGIVQOQ NNLLRAIEAQ
QHLLQLTVWG IKQLQARILA VERYLKDOOL LGIWGCSGKL ICTTAVPWA SWSNKSLEQI
WNNMTWMEWD REINNYTSLI HSLIEESONQ OEKNEQELLE LDKWASLWNW FNITNWLWYI
KLFIMIVGGL VGLRIVFAVL SVVNRVROGY SPLSFOTHLP IPRGPDREGE IEIEGGERDR
ORSIRLVNGS LALIWDLRS LLLFSYHRLR DILLIVTRIV ELLGARGWEA LKYWWNLLQY
WSQELKNSAV SLLNATAIAV AEGTDRIEV VQAYRAIRH IPRRIROG
```

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, 10^а

A

.

.

.
