



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013141777/10, 11.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.09.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.09.2013

(45) Опубликовано: 10.01.2015 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2447181 C1, 10.04.2012. GenBank: AAT42221.1, 12.06.2004, Найдено в Интернет по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAT42221>, Найдено 03.06.2014. GenBank: ABD92772.1, 12.02.2008, Найдено в Интернет по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABD92772>, Найдено 03.06.2014. US 20020082209, 27.06.2002

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостоку, 159, ФГБУ науки ТИБОХ им.
Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения
Российской академии наук, зав. патентным
отделом Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Балабанова Лариса Анатольевна (RU),
Ковальчук Светлана Николаевна (RU),
Голотин Василий Александрович (RU),
Булгаков Александр Александрович (RU),
Рассказов Валерий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pET40CmAP/MBL-T, КОДИРУЮЩАЯ ГИБРИДНЫЙ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИПЕПТИД CmAP/MBL-T СО СВОЙСТВАМИ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ CMAP И МАННАН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЛЕКТИНА С-ТИПА MBL-T, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T - ПРОДУЦЕНТ ГИБРИДНОГО БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОЛИПЕПТИДА CmAP/MBL-T И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и представляет собой плазмиду pET40CmAP/MBL-T, определяющую синтез гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* (CmAP) и маннан-связывающего лектина С-типа дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (MBL-T). Плазида включает NcoI/SalI - фрагмент плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмент ДНК размером 2034 пар оснований, который является химерным геном, кодирующим структурные гены щелочной фосфатазы CmAP и маннан-

связывающего лектина С-типа MBL-T, соединенных между собой полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность линкера (G)₄S(G)₄S(G)₄SEL. Описан рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/MBL-T, трансформированный указанной плазмидой, - продуцент гибридного бифункционального белка CmAP/MBL-T. Предложен также способ получения гибридного бифункционального белка CmAP/MBL-T с использованием заявленного штамма. Изобретение позволяет получать высокоочищенный препарат гибридного белка

СтАР/MBL-Т со свойствами рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы СтАР и высокоспецифичного маннан-связывающего лектина С-типа MBL-Т по отношению к углеводным компонентам гликопротеинов

раковых клеток шейки матки и может быть использован для высокочувствительного лектин-иммуноферментного метода ранней дифференциальной диагностики рака шейки матки.3 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 пр.

RU 2 5 3 8 1 6 9 C 1

RU 2 5 3 8 1 6 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 538 169** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013141777/10, 11.09.2013

(24) Effective date for property rights:
11.09.2013

Priority:

(22) Date of filing: 11.09.2013

(45) Date of publication: 10.01.2015 Bull. № 1

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,
159, FGBU nauki TIBOKh im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk, zav. patentnym otdelom Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):

Balabanova Larisa Anatol'evna (RU),
Koval'chuk Svetlana Nikolaevna (RU),
Golotin Vasilij Aleksandrovich (RU),
Bulgakov Aleksandr Aleksandrovich (RU),
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj
akademii nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)

(54) **RECOMBINANT PLASMID DNA pET40CmAP/MBL-T CODING HYBRID BIFUNCTIONAL POLYPEPTIDE CmAP/MBL-T WITH PROPERTIES OF HIGH-ACTIVITY ALKALINE PHOSPHATASE CmAP AND MANNAN-BINDING LECTIN OF C-TYPE MBL-T, RECOMBINANT STRAIN E coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T - PRODUCER OF HYBRID BIFUNCTIONAL POLYPEPTIDE CmAP/MBL-T, AND METHOD FOR ITS OBTAINING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention represents plasmid pET40CmAP/MBL-T determining a synthesis of hybrid bifunctional polypeptide CmAP/MBL-T with properties of high-activity alkaline phosphatase of sea bacterium *Cobetia marina* (CmAP) and mannan-binding lectin of C-type of far-eastern trepang *Apostichopus japonicus* (MBL-T). The plasmid includes NcoI/SalI - a fragment of plasmid pET-40b(+) (Novagen) and a DNA fragment with size of 2034 pairs of bases, which is a chimeric gene coding structural genes of alkaline phosphatase CmAP and mannan-binding lectin of C-type MBL-T, which are connected to each other with a polynucleotide coding the amino acid sequence of linker (G)₄S(G)₄S (G)₄SEL. The invention describes recombinant strain

E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T transformed by the above plasmid - a producer of hybrid bifunctional protein CmAP/MBL-T. The invention also proposes a method for obtaining hybrid bifunctional protein CmAP/MBL-T using the proposed strain.

EFFECT: invention allows obtaining the specified highly purified preparation of a hybrid protein with properties of recombinant high-activity alkaline phosphatase CmAP and highly specific mannan-binding lectin of C-type MBL-T with regard to carbohydrate components of glycoproteins of cancer cells of uterine cervix and can be used for a high-sensitivity lectin-immunoferment method of early differential diagnostics of cervical cancer.

3 cl, 2 dwg, 3 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и позволяет получать микробиологическим синтезом по оптимизированной технологии новый гибридный бифункциональный полипептид SmAP/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии и высокоспецифичного к цервикальным онкомаркерам маннан-связывающего лектина С-типа дальневосточного трепанга, который может быть использован для ранней дифференциальной диагностики рака шейки матки, а также для исследования механизмов канцерогенеза в практической онкологии.

Данные об углеводной специфичности пектинов и их способности выявлять углеводные детерминанты в составе гликоконъюгатов опухолевых клеток, особенно метастазирующих, нашли широкое применение в онкологии. Лектины используются как инструмент исследования перерождения нормальных клеток в злокачественные [1-3]. Полученная информация, в свою очередь, является составной частью изучения механизма канцерогенеза. Наиболее интересными с этой точки зрения являются пектины с высоконаправленной углеводной специфичностью. Нами было показано, что к числу таких пектинов относится маннан-связывающий лектин С-типа дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* (MBL-T) [4]. Лектин MBL-T не взаимодействует с компонентами сыворотки крови здорового человека, что является крайне важным при использовании в различных диагностических исследованиях, в частности, с применением методов иммуноцитохимии, что позволяет избежать ложно-положительных результатов и получать достоверную информацию о структурных изменениях углеводных цепей гликоконъюгатов, сопровождающих патологические изменения. Результаты исследований углеводного профиля гликоконъюгатов пектинами находят практическое применение при разработке методов диагностики рака [5-7].

Использование пектинов для диагностики рака реализуется по двум основным направлениям. Первое направление осуществляется при выявлении пектинами углеводных детерминант исследуемых маркеров в сыворотке крови на твердой фазе или в геле (лектин-ферментные, лектин-иммуноферментные, лектин-иммунные методы), и второе направление заключается во взаимодействии лектинов с соответствующими лигандами, экспрессированными на поверхности клеток, получаемых путем смывов, выделением из крови, а также на срезах биопсийного материала.

Классическим примером перспективности использования лектинов в диагностике служит коммерческий набор японской фирмы WAKO, позволяющий проводить раннюю и дифференциальную диагностику рака печени, цирроза печени и беременности. В основе метода заложена способность лектинов LCA-A (*Lens culinaris agglutinin A* - лектин, выделенный из бобов чечевицы) и PHA-E4 (*phaseolus vulgaris isolectin E-4* - лектин, выделенный из бобов фасоли обыкновенной) выявлять углеводные изоформы альфа-фетопротеинов (АФП) в сыворотке крови. Метод обладает высокой чувствительностью и информативен даже при концентрации АФП 5 нг/мл. Объем исследуемого образца - 3 мкл, срок проведения анализа - 3 часа, количество одновременно анализируемых проб - 10. Метод позволяет за 2-3 месяца до появления первых клинических симптомов выявлять рецидивы роста опухоли вследствие его высокой чувствительности.

Уникальность углеводной специфичности лектина дальневосточного трепанга MBL-T и перспективность его использования как диагностического маркера подтверждается результатами экспериментов по взаимодействию с раковоэмбриональными антигенами. Лектин трепанга показал способность взаимодействовать с такими маркерами опухолевого роста, как альфа-фетопроtein, раковоэмбриональный антиген, эмбриональный альфа-1-кислый гликопротеин, эмбриональный альфа-2-глобулин.

На основе наличия у лектина MBL-T уникального углевод-распознающего домена, определяющего его способность распознавать микрогетерогенность гликоконъюгатов раковых и нормальных клеток, заявителем разработан новый метод диагностики рака шейки матки [8].

5 Определение концентрации пектин-связанных структур в эпителиальном секрете является принципиально новым подходом при выявлении злокачественных новообразований. Однако и такой анализ требует повышения эффективности наряду с простотой выполнения метода. Это возможно при использовании методов генной инженерии. Методами молекулярного клонирования установлена структура лектина
10 дальневосточного трепанга MBL-T [GenBank, код доступа AAT42221] и щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP [GenBank, код доступа ABD92772]. Известен 3 способ получения высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP [9].

Задача изобретения - конструирование рекомбинантного штамма-продуцента
15 *Escherichia coli*, несущего такую экспрессирующую конструкцию (плазмиду), которая позволит нарабатывать целевой высокоочищенный недеградированный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/MBL-T в препаративных количествах, при сохранении как иммуногенных свойств высокоспецифичного лектина дальневосточного трепанга MBL-T, так и ферментативных свойств высокоактивной щелочной фосфатазы
20 морской бактерии CmAP, используемой для цветной визуализации лектин-связанных комплексов в лектин-иммуоферментном методе ранней диагностики рака шейки матки.

Поставленная задача решена путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pET40CmAP/MBL-T, кодирующей химерный полипептид CmAP/MBL-T, и рекомбинантного штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T, обеспечивающие
25 индуцируемый синтез с высоким и стабильным выходом активного растворимого бифункционального белка CmAP/MBL-T, обладающего свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и высокочувствительного маннан-связывающего лектина С-типа дальневосточного трепанга MBL-T.

Технический результат заявленного изобретения - получение активного гибридного
30 бифункционального полипептида CmAP/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и высокочувствительного маннан-связывающего лектина С-типа дальневосточного трепанга MBL-T с высоким выходом и уровнем очистки.

Плазида pET40CmAP/MBL-T имеет 8194 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и последовательности
35 фрагмента ДНК размером 2034 п.о., содержащего химерный ген, начинающий трансляцию со щелочной фосфатазы CmAP (N-конец) и заканчивающийся маннан-связывающим лектином С-типа MBL-T с С-концевой части молекулы рекомбинантного белка, соединенным со щелочной фосфатазой гибким линкером (G)4S(G)4S(G)4SEL.

На фигуре 1 представлена физическая карта плазмиды pET40CmAP/MBL-T и область
40 плазмиды, ответственная за экспрессию гибридного белка CmAP/MBL-T. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pET40CmAP/MBL-T, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержит последовательность структурного гена CwAP, соответствующую открытой рамке считывания для белка СтАР, последовательность соединяющего линкера (G)4S(G)4S(G)4SEL и последовательность структурного гена MBL-T,
45 соответствующую открытой рамке считывания для белка MBL-T (SEQ ID N1).

Рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T получен трансформацией клеток *E.coli* Rosetta(DE3) (Novagen) плазмидой pET40CwAP/MBL-T с использованием традиционной генно-инженерной технологии [10].

Рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки.

Клетки штамма образуют крупные круглые с ровными краями, выпуклые колонии до 5 мм в диаметре, поверхность колоний гладкая, консистенция слизистая. Пигмент не накапливается. Грамотрицательны, спор не образуют, капсулы не имеют. Колонии хорошо растут на простых питательных средах (LB). При росте в жидких средах образуют интенсивную ровную муть.

Физико-биологические признаки.

Рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T видотипичен по своим биохимическим свойствам. Штамм не обладает желатиназной активностью, не ферментирует лизин; расщепляет глюкозу, лактозу, маннит, сахарозу до кислоты и газа. Имеет мутацию в гене *lac*, обеспечивающую контроль уровня экспрессии, а также трансляцию редких кодонов. Оптимальной для роста является температура 37°C, а для продукции белка CmAP/MBL-T - 16°C.

Устойчивость к антибиотикам.

Клетки штамма характеризуются устойчивостью к хлорамфениколу (34 мкг/мл) и канамицину (25 мкг/мл).

Патогенность и токсичность.

Рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/pET400CmAP/MBL-T не патогенен и не токсичен для теплокровных животных.

Штамм хранится обычным способом в суспензии с глицерином (30%) при -20°C.

Заявляемый способ получения гибридного бифункционального белка CmAP/MBL-T заключается в культивировании клеток штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T в жидкой питательной среде LB в течение 12 ч при 16°C, затем бактериальные клетки осаждают центрифугированием, суспензию клеток дезинтегрируют в буфере, далее экстракт центрифугируют, затем надосадочную жидкость помещают на колонку с ионообменной смолой, далее элюируют белок, затем белковый элюат помещают на колонку с металлоаффинной смолой, далее активные фракции концентрируют на ионообменной смоле и выделяют целевой продукт гель-фильтрацией.

Выход рекомбинантного гибридного бифункционального белка CmAP/MBL-T в результате применения описанного способа составляет не менее 10 мг рекомбинантного белка с 1 л культуры с удельной активностью щелочной фосфатазы не менее 10000 ед/мг белка и иммуногенными свойствами маннан-связывающего лектина С-типа, характерными для природного аналога MBL-T [4, 8].

Рекомбинантный гибридный бифункциональный белок CmAP/MBL-T имеет молекулярную массу 105,5 кДа, включая плазмидный шаперон DsbC с молекулярной массой 32,5 кДа, широкий диапазон значений температуры (25-37°C) и pH (7,5-9,5) для проявления фосфатазной активности и аффинных свойств лектина в присутствии 2 мМ ионов Ca^{2+} . Плазмидный шаперон Dsb не дает существенного вклада в функциональную способность обеих частей химеры CmAP/MBL-T, поэтому этап его удаления из рекомбинантного белка с помощью энтерокиназы по предусмотренному генетической конструкцией сайту рестрикции не обязателен.

Рекомбинантный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/MBL-T успешно использован в доклинических испытаниях способности связывания лектинового компонента химеры с муцином, раковоэмбриональным антигеном (РЭА), а также другими онкомаркерами методом лектин-иммуноферментного анализа. Использование маннан-связывающего лектина в составе гибридного бифункционального полипептида

СmAP/MBL-Т с активностью щелочной фосфатазы позволяет сократить стадии и время иммуноферментного анализа, которые раньше требовались для получения конъюгатов лектина и фермента.

На фиг.2 представлены результаты иммуно-ферментного анализа (ИФА), проведенного на микропланшете, сенсibiliзировавшем муцином, с применением гибридного бифункционального полипептида СmAP/MBL-Т, полученного от разных колоний трансгенного штамма E.coli Rosetta(DE3)/pET40 СmAP/MBL-Т. Уровень аффинности рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида СmAP/MBL-Т определяли по концентрации пектин-связанных комплексов с муцином (по оси Х). Визуализацию лектин-связанных комплексов осуществляли методом измерения фосфатазной активности рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида СmAP/MBL-Т (по оси Y).

Существенными преимуществами заявляемого способа получения гибридного бифункционального полипептида СmAP/MBL-Т являются:

использование рекомбинантного штамма-продуцента E.coli Rosetta(DE3)/pET40СmAP/MBL-Т, что позволяет получать при биосинтезе большое количество высокоактивного бифункционального гибридного белка СmAP/MBL-Т;

использование несложной трехстадийной хроматографической очистки рекомбинантного белка, что позволяет получить чистый гибридный полипептид СmAP/MBL-Т за короткое время и с малыми потерями.

Способ получения функционально-активного гибридного полипептида СmAP/MBL-Т на основе использования химерного гена, кодирующего щелочную фосфатазу морской бактерии СmAP и маннан-связывающий лектин С-типа дальневосточного трепанга MBL-Т, иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование плазмиды pET40СmAP/MBL-Т.

Рекомбинантную плазмиду pET40СmAP/MBL-Т, содержащую химерный ген, кодирующий полноразмерную щелочную фосфатазу СmAP и полноразмерный маннан-связывающий лектин С-типа MBL-Т, соединяющиеся через гибкий линкер (G)4S(G)4S (G)4SEL, фланкированный сайтами рестрикции NcoI и SalI, конструируют на основе коммерческой плазмиды pET-40b(+) (Novagen).

Фрагмент ДНК, содержащий химерный ген гибридного полипептида СwAP/MBL-Т, получают в два этапа. На первом этапе проводят полимеразную цепную реакцию с использованием плазмиды 40Pho в качестве матрицы для получения гена щелочной фосфатазы СтАР и праймеров X-PhoN_F и Pho40X-SacI-R, где X-PhoN_F - праймер, специфичный по отношению к N-концевой последовательности СmAP, включающий сайт для рестриктазы NcoI; Pho40X-SacI-R - обратный праймер, специфичный по отношению к С-концевой последовательности СmAP, включающий полинуклеотид, кодирующий линкер (G)4S(G)4S(G)4SEL и сайт рестрикции SacI:

X-PhoN_F: 5'-TATTCCATGGCAGAGATCAAGAATGTCATTCTGAT-3'

Pho40X-SacI-R: -5'-

TTAAGAGCTCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACC
CTTCGCTACCACTGTCTTCAGATACTGTCCT-3'.

Данную реакцию проводят в следующих условиях: 10x Encyclo буфер, 50x смесь полимераз Encyclo («Encyclo PCR kit», Евроген, Москва), 50x смесь dNTP (10 mM каждого), смесь праймеров (5 μM каждого), 20 нг ДНК. Процесс амплификации состоит из следующих стадий: 30 циклов ПЦР (15 с - 95°C, 1 мин 30 с - 72°C) и инкубация 10 мин при 72°C. После амплификации ПЦР-продукт очищают электрофоретически в 1% агарозном геле. Фрагмент (1 мкг) обрабатывают рестриктазами NcoI и SacI в

оптимальном буфере (Fermentas) в течение 3 часов, затем ферменты удаляют из реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1) [10]. В водную фракцию, содержащую фрагмент, добавляют 1/10 объема 0,3 М ацетата Na, pH 5,2 и 1/2 объема изопропанолового спирта и оставляют на -20°C в течение 30 мин. Затем центрифугируют при 14000 об/мин в течение 20 мин, осадок промывают 75% этанолом и высушивают при комнатной температуре. Осадок растворяют в 20 мкл деионизованной воды.

2 мкг плазмидной ДНК pET-40b(+) обрабатывают рестриктазами NcoI и SacI в соответствии с методикой, описанной выше, и из полученного гидролизата выделяют векторную часть плазмиды в 1% геле легкоплавкой агарозы.

Полученный фрагмент гена CmAP и векторную часть плазмиды pET-40b(+) сшивают при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции (Fermentas). 10 мкл реакционной смеси используют для трансформации компетентных клеток E.coli Rosetta(DE3). Трансформанты высевают на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 ч при 37°C клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают плазмидную ДНК pET40CmAP, содержащую последовательность CmAP с линкером (G)4S(G)4S(G)4SEL на С-концевой части.

На втором этапе проводят амплификацию гена MBL-T с использованием к-ДНК дальневосточного трепанга и пары праймеров Lect-X-dir и Lect-X-rev, несущими сайты для рестриктаз SacI и SalI:

Lect-X-dir: 5'-AGCTGAGCTCTGTCTGACGGCTTGTCCGGAGTTTTTG-3'

Lect-X-rev: 5'-CAGTGTCTGACCTCCAAATGATACTCGATACAGGGAAG-3'

Для создания конструкции pET40CmAP/MBL-T полученный ген маннан-связывающего пектина С-типа MBL-T и 2 мкг плазмидной ДНК pET40CmAP обрабатывают рестриктазами SacI и SalI в соответствии с методикой, описанной выше, и очищают в 1% геле легкоплавкой агарозы. Очищенные ПЦР-фрагменты MBL-T и векторную часть плазмиды pET40CmAP сшивают при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции (Fermentas). 10 мкл реакционной смеси используют для трансформации компетентных клеток E.coli Rosetta(DE3). Трансформанты высевают на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 ч при 37°C клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают ДНК, содержащую необходимые последовательности генов CmAP и MBL-T, представляющую собой плазмиду pET40CmAP/MBL-T размером 8194 п.о. (фиг.1).

Пример 2. Получение рекомбинантного штамма E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T - продуцента гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T.

Рекомбинантный штамм-продуцент E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T получают путем трансформации клеток штамма E.coli Rosetta(DE3) рекомбинантной плазмидой pET40CmAP/MBL-T. Ночную культуру (0,5 мл LB) рекомбинантного штамма-продуцента гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T выращивают в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин при температуре 37°C в течение 2 часов до оптической плотности 0,6-0,8 (OD₆₀₀), затем добавляют индуктор экспрессии IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубируют далее при 16°C в течение 12 часов.

Для определения продуктивности штамма клеточные водные экстракты анализируют электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Гель

окрашивают Кумасси R-250 по стандартной методике и определяют относительное количество белка в полосе целевого продукта. Содержание рекомбинантного белка в растворимой клеточной фракции составляет не менее 30% от всех белков этой фракции.

Пример 3. Выделение и характеристика гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T.

Рекомбинантный штамм-продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T - *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T инкубируют в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 0,5 mM IPTG, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин в течение 12 часов при 16°C. Бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток дезинтегрируют в 20 мл буфера А (0,05 М трис-HCl, pH 8,6, 0,01% NaN₃) в течение 5×30 с, охлаждая во льду. Затем центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку с ДЕАЕ-52-целлюлозой (Whatman). Элюцию белка проводят градиентом концентрации NaCl (0,05 М-0,380 М) в буфере А. Активные фракции собирают и помещают на колонку с металлоаффинной смолой (Qiagen), предварительно уравновешенную буфером А. Элюцию белка проводят буфером В (50 mM Tris-HCl, pH 8,6, 50 mM EDTA, 0,01% NaN₃). Активные фракции собирают, обессоливают и концентрируют на колонке с ДЕАЕ-Toyopearl 650M (Toyo Soda), затем инкубируют с энтерокиназой (Invitrogen) при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем раствор белка наносят на колонку для гель-фильтрации с Superdex 200 (Sigma). Выход рекомбинантного белка составляет 10 мг с 1 литра культуры.

Полученный рекомбинантный полипептид определяют по первым 10 аминокислотам на автоматическом секвенаторе. Проведенное секвенирование препарата рекомбинантного белка, выделенного из клеток штамма *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T, выявило аминокислотную последовательность Ala-Glu-Ile-Lys-Asn-Val-Ile-Leu-Met-Ile, соответствующую первым 10 аминокислотам щелочной фосфатазы CmAP, являющейся N-концевой составляющей химерного белка CmAP/MBL-T.

Ферментативную функциональность гибридного полипептида CmAP/MBL-T проверяют по активности щелочной фосфатазы, которую определяют по расщеплению паранитрофенилфосфата (п-НФФ). Стандартная инкубационная смесь в объеме 500 мкл содержит 15 mM п-НФФ, 1 М диэтаноламина (ДЭА), pH 10,3 и фермент либо 2 mM п-НФФ, 0,1 М трис-HCl, 0,2 М KCl, pH 9,5-10,0. После 30 мин инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 2 мл 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции п-нитрофенола (п-НФ) определяют спектрофотометрически при 400 нм. За единицу активности щелочной фосфатазы принимают количество фермента, катализирующего освобождение 1 мкМ п-НФ ($\epsilon_{400 \text{ нм}} = 18600$) в течение 1 мин инкубации. Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Брэдфорда.

Лектинную функциональность гибридного полипептида CmAP/MBL-T проверяют по уровню аффинности к муцину. На сенсibilизированный муцином полистирольный микропланшет вносят раствор (0,0015-0,1 мг/мл) гибридного полипептида CmAP/MBL-T и инкубируют 1,5 часа при комнатной температуре. Лектин-связанные комплексы отмывают буфером 10 mM трис-HCl, pH 9,0, 0,15 М NaCl, 0,05% Тритон X-100, 20 mM CaCl₂ по 200 мкл в каждую лунку не менее 10 раз. Затем в лунки микроплшета добавляют буфер для активности щелочной фосфатазы с субстратом, как описано

выше, для визуализации связавшихся комплексов (фиг.2).

Полученные данные по характеристике и функциональной активности продукта экспрессии искусственного химерного гена гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T в клетках рекомбинантного штамма E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T свидетельствуют о соответствии исследуемого полипептида его природному аналогу - пектину MBL-T, применяемому в лектин-иммуноферментном методе ранней дифференциальной диагностики рака шейки матки [8].

Как следует из приведенных примеров, заявляемая группа изобретений позволяет получать активный рекомбинантный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и высокоспецифичного маннан-связывающего лектина дальневосточного трепанга C-типа MBL-T с высоким выходом при относительно простой и надежной технологии.

Заявленное изобретение позволяет:

- с помощью использования рекомбинантного штамма-продуцента E.coli Rosetta (DE3)/pET40CmAP/MBL-T получать путем биосинтеза большое количество активного гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T;

- использование ионообменной, металлоаффинной и гель-фильтрационной хроматографий при очистке рекомбинантного белка из водного экстракта клеток рекомбинантного штамма-продуцента позволяет получать гибридный бифункциональный полипептид CmAP/MBL-T с чистотой более 98% в качестве аналога маннан-связывающего лектина C-типа MBL-T, конъюгированного с ферментом, применяемого для проведения иммуноферментного анализа.

Литература

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Сотникова Е.Н. Ранняя диагностика онкологических заболеваний. М.: 1994. С.193.

2. Davina J.H.M., Stadhouders A.M., van Haelst U.J.G.M., Lamers G.E.M., Kenemans P. Concanavalin A Peroxidase labeling in cervical exfoliative cytopathology. Gynecologic Oncology, 1985. - Vol.22. - I.2. - P.212-223.

3. Reddi A. L., Sankaranarayanan K., Arulraj H. S., Devaraj N., Devaraj Enzyme-linked PNA lectin-binding assay of serum T-antigen in patient with SCC of the uterine cervix. Cancer letters - 2000. - Vol.149, - P.207-211.

4. A.A. Bulgakov, M.G. Eliseikina, I.Yu. Petrova, E.L. Nazarenko, S.N. Kovalchuk Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the holothurian Apostichopus japonicus. Glycobiology 2007, V.17, №12, P.1284-1298.

5. Aoyagi Y., Suzuki Y., Isemura M., Nomoto M., Sekini C., Igarashi K., Ichida F. The fucosylation of alfa-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. Cancer, 1988. - Vol.61. - N.4. P.769-774.

6. 24. Yuan C.C, Wang P.H., Ng H.T., Tsai L.C., Juang C.M., Chiu L.M. Both TPA and SCC-Ag levels are prognostic even in high-risk stage Ib-IIa cervical carcinoma as determined by a stratification analysis. Eur. J. Gynaecol Oncol. 2002; 23(1):17-20.

7. Chi-Mou Juang M.D., Peng-Hui Wang M.D., Ming-Shien Yen M.D., Chiung-Ru Lai M.D., Heung-Tat Ng M.D. and Chiou-Chung Yuan M.D. Application of Tumor Markers CEA, TPA, and SCC-Ag in Patients with Low-Risk FIGO Stage IB and IIA Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. Gynecologic Oncology. 2000; 76(1):103-106.

8. RU 2343485 C1, 10.01.2009.

9. RU 2447151 C1, 10.04.2012.

10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2bd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей приведен в конце описания.

Формула изобретения

5 1. Плазмида pET40CmAP/MBL-T размером 8194 пар оснований (п.о.), определяющая синтез рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T и характеризующаяся наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмента ДНК размером 2034 п.о., содержащего химерный
10 (G)₄S(G)₄S(G)₄SEL, и структурной части гена маннан-связывающего лектина C-типа MBL-T (SEQ ID N 1).

2. Рекомбинантный штамм E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/MBL-T, трансформированный плазмидой pET40CmAP/MBL-T по п.1, - продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T.

15 3. Способ получения рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/MBL-T, характеризующийся тем, что штамм-продуцент по п.2 инкубируют в жидкой питательной среде LB в течение 12 ч при 16°C, затем бактериальные клетки осаждают центрифугированием, суспензию клеток дезинтегрируют в буфере, далее экстракт центрифугируют, затем надосадочную жидкость помещают на колонку с
20 ионообменной смолой, далее элюируют белок, затем белковый элюат помещают на колонку с металлоаффинной смолой, далее активные фракции концентрируют на ионообменной смоле и выделяют целевой продукт гель-фильтрацией.

25

30

35

40

45

Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

<110> Балабанова Л.А., Ковальчук С.Н., Голотин В.А., Булгаков А.А., Рассказов В.А.

<120> Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40*CmAP*/MBL-T, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид *CmAP*/MBL-T со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы *CmAP* и маннан-связывающего лектина С-типа MBL-T, рекомбинантный штамм *E.coli* Rosetta(DE3)/pET40*CmAP*/MBL-T – продуцент гибридного бифункционального полипептида *CmAP*/MBL-T и способ его получения.

<160> 1

<210> 1

<211> 2034

<212> ДНК

<213> *Cobetia marina* BKM B-2021 Д; *Apostichopus japonicus*

<223> Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pET40*CmAP*/MBL-T, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержащая последовательности гена щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* BKM B-2021 Д (*CmAP*), включая последовательность линкера (G)₄S(G)₄S(G)₄SEL, и гена маннан-связывающего лектина С-типа дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus*, соответствующая открытой рамке считывания для гибридного бифункционального полипептида *CmAP*/MBL-T.

<400> 1

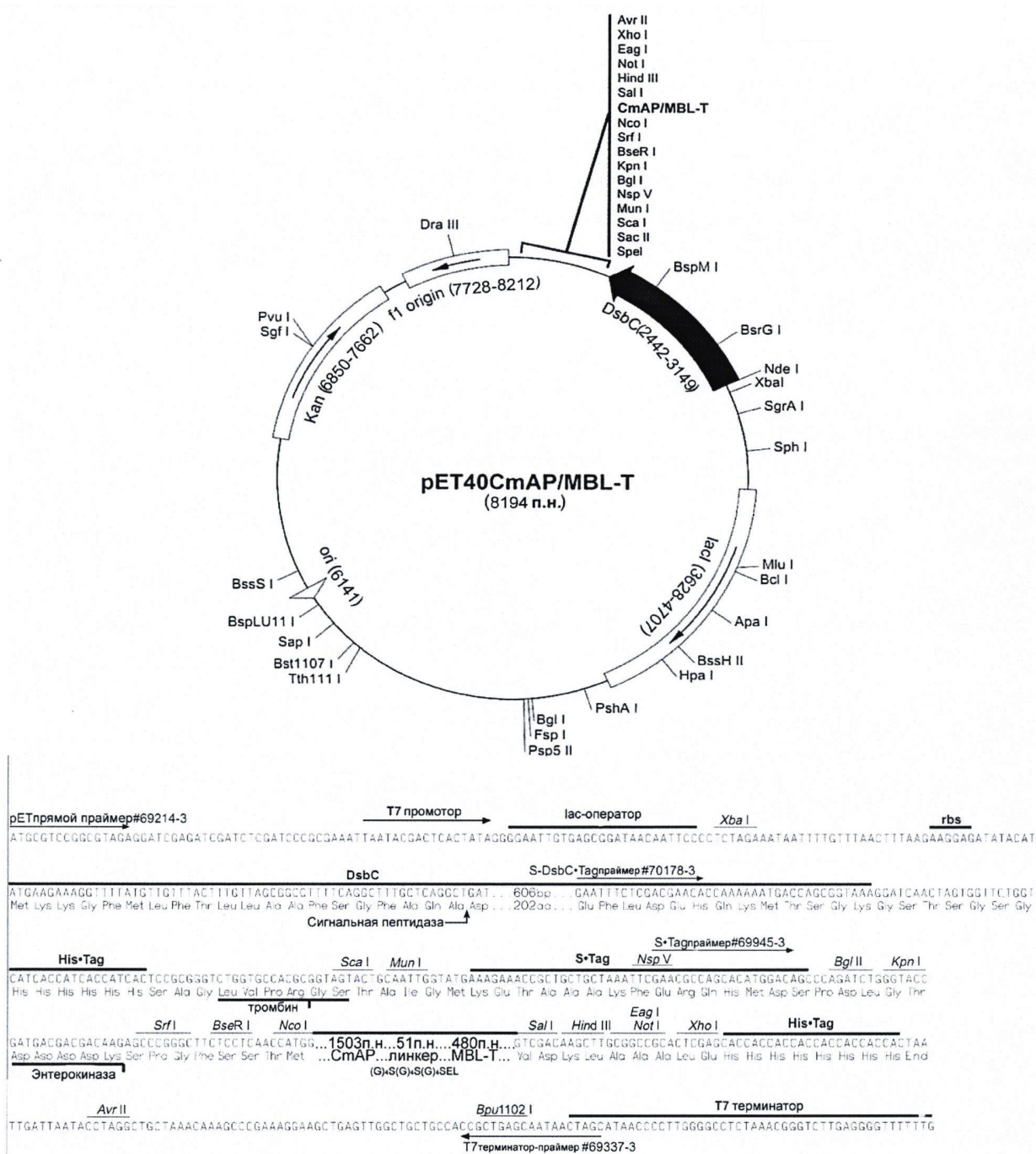
SalI

195	CAGCTGATGA	GGTTTACTAT	GAGCTATGTC	CCTTCGTATG	TGTTTATGAA	GTTTGATCTC
	GTCGACTACT	CCAAATGATA	CTCGATACAG	GGAAGCATAC	ACAAATACTT	CAAAC TAGAG
255	GACCGTTTTT	GTAGTCGGGT	CAATGGGACG	CTTACTGAAG	GTCGCCGTTA	TCGACGTGCC
	CTGGCAAAAA	CATCAGCCCA	GTTACCCTGC	GAATGACTTC	CAGCGGCAAT	AGCTGCACGG
315	GATAGTCCAT	TTAACAACCC	AAGTGGTCTT	TTGGTTCGTC	ATATCAGGTG	TAGTCTTGGT
	CTATCAGGTA	AATTGTTGGG	TTACCAGAA	AACCAAGCAG	TATAGTCCAC	ATCAGAACCA
375	AGGCAGGTTC	AAACTAGGCT	CAAGCACCAG	GGGTGAAAAT	TCGGATCGTC	CTGAACTCCT
	TCCGTCCAAG	TTTGATCCGA	GTTCGTGGTC	CCCACTTTTA	AGCCTAGCAG	GACTTGAGGA
435	AGGGTCAATC	TTCTTGACAA	ATAGTCACTA	CCGTACTGA	CAAAGTGTTT	GAAATAGTTT
	TCCAGTTAG	AAGGACTGTT	TATCAGTGAT	GGCAATGACT	GTTTCACAAG	CTTTATCAAA
495	TTAACAACGA	GAAGTCTTGA	CACATACCTT	CGGTTCACAG	GCCATCGATT	CAGCAAAGGT
	AATTGTTGCT	CTTCAGAACT	GTGTATGGAA	GCCAAGTGTC	CGGTAGCTAA	GTCTTTTCCA
555	AATGTCGACG	CGTTAAATTT	ACGAGCTGTT	CGCACAAGTC	GGAGACACTT	GCAGTCTACT
	TTACAGCTGC	GCAATTTAAA	TGCTCGACAA	GCGTGTTCAG	CCTCTGTGAA	CGTCAGATGA
615	AGTACCTTGT	TGGATATTGT	AAAAGGTAGC	TTTGGCCAGG	TTTTGAGGCC	TGTTCGGCAG
	TCATGGAACA	ACCTATAACA	TTTTCCATCG	AAACCGGTCC	AAAAC TCCGG	ACAAGCCGTC
675	TCTGTCTCGA	GTCTTGGTGG	TGGTGGTCTT	GGTGGTGGTG	GTCTTGGTGG	TGGTGGGAAG
	AGACAGAGCT	CAGAACCACC	ACCACCAGAA	CCACCACCAC	CAGAACCACC	ACCACCTTTC

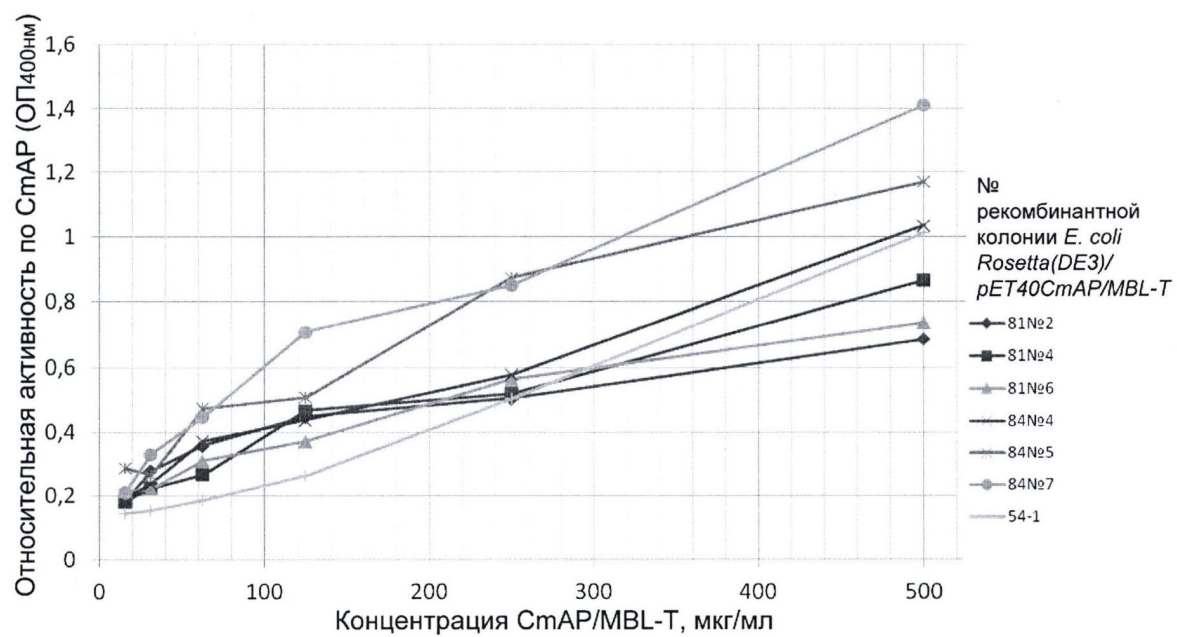
735 CGATGGTGAC AGAAGTCTAT GACAGGATAG AGCCTTACCA CGTCCTACCT TCTCTGGCCG
 GCTACCACTG TCTTCAGATA CTGTCCTATC TCGGAATGGT GCAGGATGGA AGAGACCGGC
 795 TTCTACAGCA ACCGACCGGG GGTACGTTTC TGCAACTGAC CGCATACCCA CACGCATGGT
 AAGATGTCGT TGGCTGGCCC CCATGCAAAG ACGTTGACTG GCGTATGGGT GTGCGTACCA
 855 CAGGGGGTCT GCCACAAAAC GACACAGCGG TTACGGGCGC GGTCGTCCAA CGGCGCTAGC
 GTCCCCCAGA CGGTGTTTTG CTGTGTCGCC AATGCCCCGCG CCAGCAGGTT GCCGCGATCG
 915 AATATCCCCT TCTTCCGCAG CTTCAGCACT TGACGGCCGT GGAGCGACTG GGGCTCCATT
 TTATAGGGGA AGAAGGCGTC GAAGTCGTGA ACTGCCGCA CCTCGCTGAC CCCGAGGTAA
 975 GATACAGGTA GGTGTACTAT CCCCACCCG AACCAACCGT CATGAAGTCG ACGGACCCGA
 CTATGTCCAT CCACATGATA GGGGTTGGGC TTGTTGGCCA GTACTTCAGC TGCCTGGGCT
 1035 AGCCATTAGA CCTTCAGTGA TAACGGTAAC TGTCGGCGGT AGTTCGCTCG GCCACACGCG
 TCGGTAATCT GGAAGTCACT ATTGCCATTG ACAGCCGCCA TCAAGCGAGC CGGTGTGCGC
 1095 AGTGGAACGC CATCACGGAG CTTTAGTGAC TCGTCGAGCA TTATCCAGAC GAAGACGAGT
 TCACCTTGCG GTAGTGCCTC GAAATCACTG AGCAGCTCGT AATAGGTCTG CTTCTGCTCA
 1155 ATCTCTGACA GGTCTTAGCT CTTCAGTGGT TTTAACTTTA ACCCTCGCAT TAGGACTAGA
 TAGAGACTGT CCAGAATCGA GAAGTCACCA AAATTGAAAT TGGGAGCGTA ATCCTGATCT
 1215 CGCTTACGTC CCGGACTAAA GAAGACGCGA CGGCCATTTA ACCGCGACCT TATTGACTTC
 GCGAATGCAG GGCCTGATTT CTTCTGCGCT GCCGGTAAAT TGGCGCTGGA ATAAGTGAAG
 1275 GGCTTACGAG GGCAGAGTAC CAGCCGGCAA TGGTCCTAAT AACATAGCAG AGCCAGAGCG
 CCGAATGCTC CCGTCTCATG GTCGGCCGTT ACCAGGATTA TTGTATCGTC TCGGTCTCGC
 1335 CGGGTCAGTT TCTGTGGAAC GTGCCGGAGT AGCTTGAAGT AGTCAAGTAA CTCGTACCAC
 GCCCAGTCAA AGACACCTTG CACGGCCTCA TCGAAGTTGA TCAGTTCATT GAGCATGGTG
 1395 GGGCGTAGTA ACCTTACGCG CCGGGTCAGC TAGACCGGTG GGAGCTGGTA GTTTTTCTTT
 CCCGCATCAT TGGAATGCGC GGCCAGTCG ATCTGGCCAC CCTCGACCAT CAAAAGAAA
 1455 GGTAGTAGTA GGACAAGTTC GTAAGTGTCA CGAAAAACCC AGTAGAGTAC GTCCCAGCCG
 CCATCATCAT CCTGTTCAAG CATTGACAGT GCTTTTTGGG TCATCTCATG CAGGGTCGGC
 1515 ACGACTGCGA CACCCAGTAG TACCGATAGA GCTTTCGACT ATGGTAGGCG GTATGGGCTC
 TGCTGACGCT GTGGGTCATC ATGGCTATCT CGAAAGCTGA TACCATCCGC CATAACCCGAG
 1575 AACCGCTTAT CGGGGTATG GAACCACGGT AACTCACGCC GGTAGACTAG TGCGCATTTT
 TTGGCGAATA GCCCCAATAC CTTGGTGCCA TTGAGTGCGG CCATCTGATC ACGCGTAAAG
 1635 CGATCGGGTA TCGGAAGTAG ACGTCGAAGG ACCTCGTCTA AAGCAAGTAG GAACGCGAAC
 GCTAGCCCAT AGCCTTGATC TGCAGCTTCC TGGAGCAGAT TTCGTTTCATC CTTGCGCTTG
 1695 CTCCAACCGC TGGTCCGTGG AACGTAGTCG CAGAGCTGTG ACGGGCGCGA AAGGGGGCCG
 GAGGTGGCG ACCAGGCACC TTGCATCAGC GTCTCGACAC TGCCCGCGCT TTCCCCCGGC
 1755 AGTGAAGTCC TCATACCGTG CTTCACTGCG TTGGGAGGGC TGTCGTACTG TAGGCCGGGT
 TCACTGACGG AGTATGGCAC GAAGTGACGC AACCCTCCCG ACAGCATGAC ATCCGGCCCCA
 1815 CAGTACTCGT ACAGAAGCCG TTACCGTAAA AGGTCACTTG CTACGCCGAC CACCCGCCGC
 GTCATGAGCA TGTCTTCGGC AATGGCATT TCCAGTGAAC GATGCGGCTG GTGGGCGGCG
 1875 TTCCGGCGGC CTCAGCGCAC CCAGTCCGCG CATAGCCTGT GGTTAGGCCA CCGGAACGGC
 AAGGCCGCCG GAGTCGCGTG GGTGAGGCG GTATCGGACA CCAATCCGGT GGCCTTGCCG
 1935 TGAGCAAACC GTTCGAGCTC CTGCCAAAGG TGGGCTAATG GGAGACTTAG ATACGGCTAG

RU 2 538 169 C1

ACTCGTTTGG CAAGCTCGAG GACGGTTTCC ACCCGATTAC CCTCTGAATC TATGCCGATC
 1995 TGGAGCGGGG GCCACTTCTA TGGGCAGCTC TCGACTCAGC GACTTGTCCG GCTTAGGTGA
 ACCTCGCCCC CGGTGAAGAT ACCCGTCGAG AGCTGAGTCG CTGAACAGGC CGAATCCACT
 2055 TGGTGCCGTA GAAGTCCCAC TCAGTTACTT CGCGGGTGGT GCGGAAGGAA GCGGTCGACC
 ACCACGGCAT CTTCAGGGTG AGTCAATGAA GCGCCACCA CGCCTTCCTT CGCCAGCTGG
 2115 ATCTCACGGC AGCTTGCGGG AACTATATAG CTTAGGCCGC GTGCTAACCG CATAAGAGG
 TAGAGTGCCG TCGAACGCCC TTGATATATC GAATCCGGCG CACGATTGGC GTATGTCTCC
 2175 TCGTACGGTT GGACGACCCC GGGGTACGGT AGCGGTTAGT AGTCTTACTG TAAGAAGTAG
 AGCATGCCAA CCTGCTGGGG CCCCATGCCA TCGCCAATCA TCAGAATGAC ATTCTTGATC
 2235 AGACGGTACC
 TCTGCCATGG
NcoI



Фиг.1



Фиг. 2