



(51) МПК  
*C07K 14/435* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*D01F 4/00* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2015139343, 16.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.09.2015Дата регистрации:  
15.09.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.09.2015

(43) Дата публикации заявки: 21.03.2017 Бюл. № 9

(45) Опубликовано: 15.09.2017 Бюл. № 26

Адрес для переписки:

107150, Москва, б-р Маршала Рокоссовского, 18,  
кв. 32, Гришину Д.В.

(72) Автор(ы):

Гришин Дмитрий Викторович (RU),  
 Соколов Николай Николаевич (RU),  
 Абакумова Ольга Юрьевна (RU),  
 Подобед Ольга Владимировна (RU),  
 Покровская Марина Владимировна (RU),  
 Александрова Светлана Серебеджановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение  
 "Научно-исследовательский институт  
 биомедицинской химии имени В.Н.  
 Ореховича" (ИБМХ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: ZHEN LI, INVESTIGATION OF  
 TRIBOLIUM CASTANEUM RESILIN, A  
 RUBBER-LIKE INSECT CUTICULAR  
 PROTEIN, 2013, A THESIS, KANSAS STATE  
 UNIVERSITY, Manhattan, Kansas, 73 p.,  
 найдено в Интернет [09.09.2016] по адресу:  
<http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/16287>,  
 весь документ, особенно с.16-19, 57-59,  
 фиг.3. RU 2012146368 A, 10.05.2014. US  
 9109047 B2, (см. прод.)

(54) Способ получения рекомбинантного эластомерного домена Trib-2mut, генно-инженерная конструкция pGDТrib2mut, определяющая биосинтез Trib-2mut в клетках E.coli, штамм-продуцент E.coli M15/pGDТrib2mut и способ получения полимерного материала на основе данного белка

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению каркасных материалов на основе белковых конструкций, и может быть использовано в медицине. На основе минимального рекомбинантного эластомерного мотива (триболин-1, Trib-1mut) белка резилина насекомых *Tribolium castaneum* (триболин-2, Trib-2mut)

рекомбинантным путем получена белковая конструкция, которую используют в способах агрегации с целью формирования основы сетки биоматрикса. Изобретение позволяет получить полимерный каркасный биоматериал для инжиниринга тканей. 5 н.п. ф-лы, 2 ил., 2 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):  
18.08.2015.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/435* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*C12N 15/12* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*D01F 4/00* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2015139343, 16.09.2015

(24) Effective date for property rights:  
16.09.2015Registration date:  
15.09.2017

Priority:

(22) Date of filing: 16.09.2015

(43) Application published: 21.03.2017 Bull. № 9

(45) Date of publication: 15.09.2017 Bull. № 26

Mail address:

107150, Moskva, b-r Marshala Rokossovskogo, 18,  
kv. 32, Grishinu D.V.

(72) Inventor(s):

Grishin Dmitrij Viktorovich (RU),  
Sokolov Nikolaj Nikolaevich (RU),  
Abakumova Olga Yurevna (RU),  
Podobed Olga Vladimirovna (RU),  
Pokrovskaya Marina Vladimirovna (RU),  
Aleksandrova Svetlana Serebedzhanovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
nauchnoe uchrezhdenie  
"Nauchno-issledovatel'skij institut  
biomeditsinskoj khimii imeni V.N. Orekhovicha"  
(IBMKH) (RU)

(54) **METHOD FOR Trib-2mut RECOMBINANT ELASTROMERIAL DOMAIN, PRODUCTION, GENE-ENGINEERING pGDTrib2mut CONSTRUCTION, DETERMINING Trib-2mut BIOSYNTHESIS IN E.coli CELLS, E.coli M15/pGDTrib2mut PRODUCING STRAIN AND METHOD FOR POLYMER MATERIAL OBTAINING BASED ON THIS PROTEIN**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: based on the minimal recombinant elastomeric motif (tribolin-1, Trib-1mut) insect resilinTribolium castaneum (tribolin-2, TRib-2mut), a protein structure is obtained recombinantly, which is

used in aggregation methods to form the basis of a biomatrix network.

EFFECT: invention allows to obtain polymeric frame biomaterial for tissue engineering.

5 cl, 2 dwg, 2 tbl, 4 ex

RU 2 631 004 C 2

RU 2 631 004 C 2

Создание новых рекомбинантных эластомерных белков является актуальной проблемой современной биомедицинской науки, так как находит свое приложение в разработках, связанных с расширением спектра универсальных биоматериалов для тканевой инженерии. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биоматериаловедении на сегодняшний день такие материалы все еще остро дефицитны [1].

В настоящее время в мировой практике тканевого инжиниринга используются несколько видов природных биокаркасных материалов, обладающих эластомерными свойствами, среди которых можно выделить коллаген, фибрин, фиброин (спидроин) [2].

Основными проблемами, стоящими на пути широкомасштабного производства и использования данных материалов являются: дороговизна их получения, необходимость проведения затратных процедур по обеззараживанию для предотвращения возможной передачи пациентам вирусных и прионных инфекций (в случае коллагена и фибрина), низкий уровень экспрессии подобных полипептидов в бактериальных продуцирующих системах, отсутствие выраженных элементарных эластомерных мотивов [3-5].

Науке, между тем, известен класс природных биополимеров называемых резилинами [6], выполняющих функцию прыжковых и маховых «пружин» у таких насекомых как: блоха, саранча, чернотелки и т.д. Вставки из резилина находятся в главных суставах прыгательных конечностей и крыльев данных насекомых, удерживаемые специальными хитиновыми «триггерами». Перед прыжком резилиновые элементы запасают энергию, а когда насекомое спускает «триггер», упругий белок за одну миллисекунду распрямляет лапки или крылья, придавая насекомому мощный импульс [7-9]. За жизнь насекомого эти сочленения срабатывают миллионы раз, и резилин, входящий в состав этих сочленений, не обновляясь, нисколько не срабатывается, не устает и не теряет своих свойств. Расправляясь, сжатый резилин отдает 92% запасенной энергии, в то время как белки эластины и коллагены, входящие в состав связок у млекопитающих, - до 90%, а лучшая резина – лишь 80%. Из сказанного следует, что подобные белки имеют ценность не только как материалы для биомедицины, но и обладают определенным потенциалом для технологических целей, где требуется высокая эластичность [7].

В базах данных аннотирован белок класса резилинов насекомых чернотелок (*Tribolium castaneum*, *T. castaneum*) (NCBI Reference Sequence: NP\_001182329.1). Между тем, из нашего опыта стало очевидно, что эффективность продукции подобного полноразмерного резилина в прокариотических экспрессирующих системах в рекомбинантном виде также не достаточно высока, поэтому была проанализирована аминокислотная последовательность данного белка, в ходе чего выявлен минимальный мотив, состоящий из 23 аминокислотных остатков QNGGXZSSTYGPFGQGGNGFGGG («X»=аминокислоты R, K; «Z»=аминокислоты P, L). Этот мотив, периодически и последовательно повторяется в центральной части молекулы резилина *T. castaneum*, образуя его центральный домен, ответственный, по всей видимости, за эластомерные свойства.

Данный минимальный мотив получил название минимального эластомерного мотива резилина чернотелок (триболин-1, *tribolinum-1*, *Trib-1*) (см. табл.1.).

Домен, состоящий, как минимум, из 4-х повторяющихся минимальных эластомерных мотивов, получил название эластомерного домена белка резилина (триболин-2, *tribolinum-2*, *Trib-2*) (см. приложения SEQ ID NO:4).

Нами разработан подход, который также явился предметом данного изобретения, направленный на повышение уровня экспрессии белка резилина в прокариотических

системах, за счет его усечения до четырех последовательно объединенных друг с другом минимальных эластомерных мотивов. Важно отметить, что в таком виде резилин сохраняет эластомерную составляющую, обладает меньшей молекулярной массой и оптимальным аминокислотным составом, позволяющим получать его с высокой степенью эффективности рекомбинантным путем в бактериальных продуцирующих системах, таких как *Escherichia coli*.

Между тем, при разработке каркасных 3D-биоматериалов для инжиниринга тканей, возникает необходимость обеспечения возможности планирования шага поперечной химической «сшивки» цепей пептида, лежащего в основе графта, что используется при создании материалов с разной степенью пористости. С учетом всего этого, последовательность минимального эластомерного мотива Trib-1 была оптимизирована на генно-инженерном уровне. При этом, комплекс мер, направленных на оптимизацию, также явился предметом настоящего изобретения. Для этой цели последовательность Trib-1 подвергалась сайт-направленному мутагенезу, при котором производились следующие аминокислотные замены: Q1E, N2D, Q15K (см. табл.1.). Необходимость данных замен продиктована тем, что для последующей химической сшивки карбодимидным способом, более удобно, когда в положениях «1» и «2» молекулы Trib-1 находятся не амиды аспарагиновой и глутаминовой кислот, а сами кислоты. В случае же использования глутарового альдегида в качестве сшивающего агента, удобно, когда в положении «15» будет располагаться аминокислота лизин.

Таблица 1

№	Название	Аминокислотная последовательность
1	нативный Trib-1	QNGGKPSSTYGPPQGNGFGGG
2	мутантный Trib-1 (Trib-1mut)	EDGGKPSSTYGPPGKGGNGFGGG

Технический результат настоящего изобретения заключается в создании синтетического гена, кодирующего мутантный эластомерный домен белка резилина *T. castaneum* (tribolinum-2mut, Trib-2mut), состоящий из четырех повторяющихся минимальных эластомерных мотивов резилина (Trib-1mut), создании экспрессионной плазмиды pGDTrib2mut с геном trib-2mut (см. SEQ ID NO:3), получении собственно мутантного эластомерного домена резилина *T. castaneum* (Trib-2mut), а также создании полимерного материала на основе данного белка посредством обработки очищенного рекомбинантного белка Trib-2mut специфическими реагентами для химической перекрестной сшивки входящих в его состав аминокислот.

Позиционируемый технический результат достигается созданием рекомбинантного белка Trib-2mut с молекулярным весом около 15 кДа.

Технический результат настоящего изобретения достигается за счет использования минимального эластомерного мотива резилина *T. castaneum* (Trib-1mut) в качестве элементарного эластомерного звена рекомбинантного домена Trib-2mut.

Указанный технический результат достигается созданием рекомбинантной плазмидной ДНК pGDTrib2mut 3889 п.н. (см. SEQ ID NO:3) содержащей синтетический оперон с геном эластомерного домена trib-2mut (115 - 595 п.н.), включающий ранний промотор бактериофага T5, нуклеотидную последовательность, кодирующую собственно белок Trib-2mut и терминатор транскрипции; ген бета-лактамазы, детерминирующий устойчивость к антибиотику ампициллину и сайт инициации репликации типа ColE1. Таким образом, рекомбинантная плазмидная ДНК pGDTrib2mut призвана обеспечить эффективную экспрессию белка Trib-2mut в клетках *E.coli*.

Технический результат достигается также тем, что штамм *E.coli* M15 (Qiagen),

трансформированный экспрессионным плазмидным вектором pGDtrib2mut является продуцентом целевого белка Trib-2mut.

Технический результат также достигается посредством специфической обработки очищенного рекомбинантного белка Trib-2mut химическим реагентом для сшивки аминокислот (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид, глутаровый альдегид) посредством формирования ковалентных связей между такими аминокислотами как лизин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота.

## ОПИСАНИЕ ПРОЦЕССА ДОСТИЖЕНИЯ ТЕХНИЧЕСКОГО РЕЗУЛЬТАТА

### 1. Создание плазмидного экспрессионного вектора pGDtrib2mut

#### 1.1. Химический синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды были синтезированы твердофазным амидофосфитным методом и очищены с помощью электрофореза в ПААГ (ЗАО «Евроген»).

#### 1.2. Получение и клонирование гена trib-2mut

В соответствии с замыслом настоящего изобретения предложен ступенчатый способ получения, клонирования и экспрессии синтетического гена, кодирующего мутантный триболин-2 (Trib-2mut).

1 стадия: получение и клонирование гена trib-1mut в составе промежуточного вектора pGDtrib1mut (см. SEQ ID NO:1 приложения);

2-я стадия: получение и клонирование гена trib-2mut в составе конечного вектора pGDtrib2mut (см. SEQ ID NO:3 приложения).

##### 1.2.1. Получение и клонирование гена trib-1mut

Сборка гена trib-1mut производилась безлигазным методом PIPE (Polymerase Incomplete Primer Extension) [10]. Данный метод заключается в том, что встраивание целевого гена в необходимый вектор сводится к последовательному конечному наращиванию ферментативно линейаризованного плазмидного вектора (в нашем случае pQE16-BamHI/BglII) с помощью ПЦР при участии синтетических корректирующих праймеров.

Как рекомендовано в методических пособиях [11], последовательности прямого и обратного корректирующих праймеров (см. табл.2.) были спланированы таким образом, чтобы один из их концов был комплементарен конечным участкам линейаризованного вектора, в то время как некомплементарные концы служили для наращивания гена trib-1mut (в табл.2. комплементарные области к вектору подчеркнуты).

Размер данных олигонуклеотидов был лимитирован, т.к. рекомендуемая область перекрытия корректирующего праймера и вектора должна быть более 20 п.н. [11]. По этой причине, процесс синтеза гена методом PIPE был разбит на два этапа, на каждом из которых использовалась новая пара корректирующих праймеров спланированных внахлест с вектором.

При реализации методики PIPE, последовательность действий, на каждом из двух этапов, подтверждается следующими примерами:

а) в 0,5 мл пробирке для ПЦР были смешаны следующие реагенты:

- 1 мкл (приблизит.5 нг) предварительно линейаризованного по сайтам BamHI и BglII (Fermentas, Литва) плазмидного вектора pQE16((QIAGEN)), полученного из штамма E.coli (dam+), с целью метилирования сайтов узнавания для селективной рестриктазы DpnI. Исходный вектор pQE-16 обладал следующими характеристиками: размер вектора (п.н.) - 3996 п.н., T5-промотор/лас-оператор элемент - 7-87 п.н., T5 сайт инициации транскрипции - 61 п.н., последовательность гена дегидрофолатредуктазы - 133-690 п.н. (в дальнейшем удаляется из вектора), 6xHis-tag - 703-720 п.н., регион терминации транскрипции Lambda t0 - 743-837 п.н., сайт инициации репликации ColE1 - 2173 п.н., ген β-лактамазы - 3791-2931 п.н.

- 0,5 мкл прямого корректирующего праймера FT (50 пмоль/мкл) (табл.2)
- 0,5 мкл обратного корректирующего праймера RT (50 пмоль/мкл) (табл.2)
- 2 мкл смеси dNTP mix (2,5 mM каждого)
- 2,5 мкл 10x буфера для ДНК-полимеразы
- стерильная вода до 24,5 мкл
- 0,5 мкл Pfu Ultra ДНК-полимеразы(2,5 Ед/мкл, Agilent)

б) Параметры амплификации: 95°C – 2 мин; (95°C – 30 с, 55 °C - 45 с, 68°C – 10 мин) x25циклов; 10°C – хранение. Режим амплификации – точный.

в) продукты ПЦР инкубировались в течение 2 часов при 37 °C с 1 мкл (10U) эндонуклеазы рестрикции DpnI (Fermentas, Литва) в соответствующем буфере. Данная стадия необходима для разрушения исходной плазмидной ДНК pQE16 BamHI/BglII, полученной из штамма E.coli (dam+), т.к. она может осложнить реализацию последующих этапов.

Таблица 2

Название	Последовательности олигонуклеотидов (ЗАО «Евроген») (5'-3')
1-й этап сборки trib-1mut и 1-я пара праймеров	FT1: AAAGAGGAGAAATTAAGTATGAGAGGATCCGGTACCGGACCAGGTCTGGACCAGAAGATGGTGGTA RT1: AGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAGATCTAGGACCTGGTCTGGTCCACCACCACCAAAGCCATTG
2-й этап сборки trib-1mut и 2-я пара праймеров	FT2: GACCAGGTCCTGGACCAGAAGATGGTGGTAAACCGTCTCCACCTATGGCCCGCCGGGCAAAGGCGG RT2: GGTCTGGTCCACCACCACCAAAGCCATTGCCGCTTTGCCCGCGGGCCATAGGTGGAGGACGGTT

г) 5 – 10 мкл данной смеси использовались в дальнейшем для трансформации химически или электрокомпетентных клеток E.coli (M15, DH5a) в соответствии со стандартными протоколами трансформации [12]. После проведения процедуры трансформации и стадии предварительной инкубации, 20-100 мкл трансформированных клеток переносились на агар LB с антибиотиком ампицилином для последующей селекции трансформантов.

д) Плазмидная ДНК выделялась методом SDS щелочного лизиса [13], проверялась методом рестрикционного анализа и секвенирования на автоматическом секвенаторе.

Таким образом, была получена промежуточная векторная конструкция pGDTrib1mut (см. SEQ ID NO:1) содержащая мутантную нуклеотидную последовательность trib-1mut, гомологичную минимальному эластомерному мотиву известной последовательности гена резилина T. castaneum.

#### 1.2.2. Получение и клонирование гена trib-2mut.

Ген trib-2mut (SEQ ID NO:4; схема0001) был собран посредством 2-х-этапного лигирования основанного на использовании комплекса генно-инженерных приемов, получившего название fusion-технологии.

На 1-ом этапе производилась обработка молекул первого промежуточного вектора pGDTrib1mut системами эндонуклеаз рестрикции BamHI/PvuI и BglII/PvuI (двум системам соответствовали две микропробирки: №1 и №2). После 1,5 часовой экспозиции в термостате при 37°C, содержимое пробирок №1 и №2 наносили на треки №1 и №2 заранее подготовленного 1% агарозного геля, при этом, в качестве маркера молекулярных весов, на трек №3, наносили ДНК фага лябда, гидролизованную по рестрикционным сайтам EcoRI/HindIII. После завершения процедуры электрофореза, из агарозного геля вырезались необходимые для дальнейшего лигирования фрагменты плазмиды pGDTrib1mut. Из соответствующей области трека №1 вырезался BamHI/PvuI-фрагмент размером 2795 п.о., в то время как из трека №2 экстрагировался BglII/PvuI-фрагмент размером 860 п.о.

После стандартной процедуры очистки выделенных фрагментов при помощи набора реагентов для извлечения ДНК из агарозного геля GeneJET™ (Fermentas, Литва), объединение гомологичных «липких» концов фрагментов проводилось посредством ДНК-лигазы фага T4 (Сибэнзим, Россия) при 4°C в соответствующем буфере. По истечении 24 часов, лигазной смесью трансформировали клетки E.coli DH5a (Qiagen) [fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Ф80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17], которые затем отбирали на агаризованной среде LB с антибиотиками (ампициллин, налидиксовая кислота). Отобранные клоны наращивали в препаративных количествах, после чего целевая плазмидная ДНК выделялась методом SDS щелочного лизиса [13], валидировалась методами рестрикционного анализа и секвенирования на автоматическом секвенаторе. Полученная плаزمида pGDTrib1mut-2 (SEQ ID NO:2) размером 3655 п.н. была первичным производным от промежуточного вектора pGDTrib1mut и содержала две объединенные последовательности trib1mut.

На 2-ом этапе, манипуляции по рестрикции и лигированию фрагментов, полностью совпадали с действиями, осуществляемыми на 1-ом этапе, только с тем отличием, что проводились они уже с двумя молекулами вектора pGDTrib1mut-2.

Итоговой лигазной смесью также трансформировали клетки E.coli DH5a (Qiagen), которые затем селекционировали на агаризованной среде LB с необходимыми антибиотиками. После стандартной процедуры выделения [13], первичная структура полученной плазмидной ДНК идентифицировалась методом рестрикционного анализа и секвенирования. Таким образом, в результате оптимизации генноинженерных конструкций, была получена конечная экспрессионная плазмида pGDTrib2mut (SEQ ID NO:3; схема0002), имеющая 3889 пар оснований (п.о.) и характеризующаяся наличием BglII/BamHI-фрагмента плазмиды pQE16 (QIAGEN) и синтетического фрагмента ДНК размером 480 п.о., содержащего химерный ген trib-2mut (SEQ ID NO:4; схема0001), представленный четырьмя последовательно (голова к хвосту) объединенными последовательностями минимального эластомерного мотива trib-1mut с шестью остатками гистидинов (His-tag) на С-конце, что призвано повысить эффективность выделения рекомбинантного белка на аффинном металлосодержащем сорбенте.

1.3. Получение штамма E.coli M15/pGDTrib2mut и экспрессия гена trib-2mut в клетках E.coli

Культуру клеток E.coli M15 (Qiagen) [F-, Ф80ΔlacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR] трансформировали созданными на предыдущей стадии плазмидными конструкциями pGDTrib2mut. Выросшие на агаризованной питательной среде, после процедуры химической трансформации, отдельные колонии изолировали и инокулировали в 100 мл среды ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дрожжевой экстракт, 4% глицерин, 17 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 72 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>), содержащей антибиотиками ампициллин (50 мкг/мл) и канамицин (25 мкг/мл), после чего растили при температуре 37°C и постоянном встряхивании до достижения культурой оптической плотности OD<sub>600</sub>=1 - 1,2. Экспрессию гена целевого белка индуцировали добавлением изопропил-b-D-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,2 мМ. Культуры инкубировали до 17 часов при 32-35°C и постоянном встряхивании, центрифугировали при 6000g 30 мин, осадки замораживали при -75°C. Наличие целевого белка подтверждали с помощью электрофореза на оборудовании для вертикального электрофореза VE-20 («Хеликон», Россия), в 12-17% полиакриламидном геле согласно стандартной методике Laemmli [14].

Уровень синтеза белков в E. coli определяли, сравнивая интенсивность окрашивания полосы рекомбинантного белка с полосой соответствующего белка-стандарта Unstained

Protein Molecular Weight Marker (BioRad, США). При сравнении спектра белков в материнском штамме *E. coli* M15 [pREP4] и рекомбинантном штамме *E. coli* M15 [pREP4, pGDTrib2mut] (или *E. coli* M15/pGDTrib2mut) обнаруживалось появление дополнительной белковой полосы, молекулярная масса которой 14,5 – 15,0 кДа соответствовала расчетной для белка Trib-2mut.

## 2. Выделение рекомбинантного белка Trib-2mut

Присутствие His-tag на С-конце рекомбинантного белка Trib-2mut упрощает процедуру очистки рекомбинантного белка благодаря тому, что полигистидиновый спейсер специфически связывается с Ni-NTA-агарозой. Осадок индуцированной биомассы бактерий *E. coli* ресуспендируют в 30 мл буфера для нанесения на колонку (15 мМ Трис-НСl, рН 7,8, 10 мМ имидазола) и разрушают ультразвуком при 0 – +4 °С. Лизат осветляли центрифугированием при 14000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант содержал растворимый рекомбинантный белок. Надосадочную жидкость дополнительно фильтровали через 0,45 мкм фильтр (Corning, США), после чего переносили на колонку (BioRad, США) объемом 10 мл с Ni-NTA-агарозой (Invitrogen, США), которая предварительно уравновешена буфером для нанесения. Осветленный и фильтрованный бактериальный лизат инкубируют с Ni-NTA-агарозой в течение 40 мин при +4 °С. Затем, колонку промывают 100 мл раствора следующего состава: 12 мМ Трис-НСl рН 7,8, 20 мМ имидазола. Элюцию белка проводят 10 мл буфера: 12 мМ Трис-НСl, рН 7,8, 250 мМ имидазола. Белок диализуют против 1×PBS (1,7 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 5,2 мМ Na<sub>2</sub>НРO<sub>4</sub>, 150 мМ NaCl, рН 7,4) и концентрируют до 5-10 мг/мл. Молекулярный вес и чистота целевого белка, оцениваемые по электрофорезу в 12-17% полиакриламидном геле (ПААГ), составляли около 15 кДа и более 95%, соответственно. Электрофорез белков проводился в денатурирующих условиях (в присутствии SDS) по стандартной методике Laemmli [14]. В работе использовали 5% концентрирующий и 17% разрешающий ПААГ на трис-буфере (130 мМ Трис-НСl, рН 6,8, для концентрирующего и 375 мМ Трис-НСl, рН 8,8, для разрешающего), содержащие 0,1% SDS, 0,1% PSA и 0,08% TEMED. Электродным буфером служил раствор: 25 мМ Триса, 250 мМ глицина и 0,1% SDS. Электрофорез в концентрирующем геле проводился при силе тока 15 мА (10-15 мин), затем в разрешающем геле при 25 мА (45-50 мин). Окрасивание геля проводилось с помощью красителя Comassie Brilliant Blue R-250 («Fluka», США).

## 3. Полимеризация белка Trib-2mut, посредством глутарового альдегида

Выделенные рекомбинантные полипептиды представляют собой периодически повторяющиеся мотивы, содержащие в своем составе, в строго определенной позиции, остатки аминокислоты лизин (К), между которыми возможно создавать химическую «сшивку», посредством образования оснований Шиффа, используя глутаровый альдегид [15, 16]. Созданные «мостики» способны объединить разрозненные полипептидные цепочки в упорядоченную мелкопористую структуру. Обработку глутаровым альдегидом проводили в буферных системах свободных от аминов. При этом наиболее применимыми буферами являлись HEPES и фосфатный буфер при рН=7,5 - 8,0. Для проведения реакции по пептидной сшивке на 100 мкг целевого белка добавляли 5 мкг 2,3% альдегида в тотальном реакционном объеме 100 мкл. Смесь выдерживали 5 минут при 37°С. Реакция прерывалась посредством добавления в реакционную смесь 10 мкл 1М Tris-НСl, рН 8,0. По мере завершения химической реакции в растворе, в пробирке образуются светлые агломерирующие тяжи полимеризованного белка триболина-2 (Trib-2mut).

4. Полимеризация белка Trib-2mut, посредством 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида

Другая стратегия полимеризации сводилась к активации радикальной карбоксильной группы аспарагиновой и глутаминовой аминокислот 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом (EDC) (Fluka, Germany) для последующего связывания с радикальным амином аминокислоты лизин с образованием амидной связи. Для повышения эффективности связывания, EDC использовался в комбинации с N-гидроксисукцинимидом (NHS) (Fluka, Germany)[16]. Данная стратегия потенциально способна привести к созданию крупнопористого биоматрикса.

Процедура состояла из следующих этапов: на 1 мл образца исследуемого белка с концентрацией 5 - 10 мг/мл, растворенного в 0,1 М активирующем буфере MES при pH=5,5, добавлялся 1 мл реагента содержащего 20 мг/мл EDC и 5 мг/мл NHS. Продолжительность реакции составила не менее 2 часов при комнатной температуре.

На исходе двух часов реакция останавливалась посредством добавления к реакционной смеси глицина в конечной концентрации 50 мМ. Конец химической реакции ознаменовывался появлением в растворе белых опалесцирующих хлопьев полимеризованного белка Trib-2mut.

Таким образом, генно-инженерным путем, были получены образцы белка Trib-2mut – рекомбинантного гомолога эластомерного домена резилина *Tribolium castaneum* - в основе которого лежит периодически повторяющийся минимальный эластомерный мотив Trib-1mut, а также созданы лабораторные образцы нового полимерного биоматериала на его основе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009.

2. Burdick J.A., Mauck R.L. Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends Editors: Burdick J.A., Mauck R.L. (Eds.), Published: Wien; New York: Springer, 2011, P. 564.

3. Faraj K.A., Brouwer K.M., Geutjes P.J., Versteeg E.M., Wismans R.G., Deprest J.A., Chajra H., Tiemessen D.M., Feitz W.F.J., Oosterwijk E., Daamen W.F., and van Kuppevelt T.H. The Effect of Ethylene Oxide Sterilisation, Beta Irradiation and Gamma Irradiation on Collagen Fibril-Based Scaffolds. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2011, 8(5):460-70,

4. Eylich D., Göpferich A., Blunk T.. Fibrin in Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007, 585:379-92,

5. Gosline J.M., Guerette P.A., Ortlepp C.S., Savage K.N. The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol.*, 1999, 202(23):3295-303.

6. Wong D.C., Pearson R.D., Elvin C.M., Merritt D.J. Expression of the rubber-like protein, resilin, in developing and functional insect cuticle determined using a *Drosophila* anti-Rec 1 resilin antibody. *Dev Dyn.*, 2012, 241(2):333-9.

7. Gosline J., Lillie M., Carrington E., Guerette P., Ortlepp C., Savage K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2002, 357(1418):121-32.

8. Burrows M., Sutton G.P. Locusts use a composite of resilin and hard cuticle as an energy store for jumping and kicking. *J. Exp.Biol.*, 2012, vol. 215, pp.3501-3512.

9. Burrows M. Energy storage and synchronisation of hind leg movements during jumping in planthopper insects (Hemiptera, Issidae). *J. Exp.Biol.*, 2010, vol. 213, pp.469-478.

10. Stevenson J, Krycer J.R., Phan L, Brown A.J. A practical comparison of ligation-independent cloning techniques. *PLoS*. 2013;8(12):e83888. doi: 10.1371/journal.pone.0083888.

11. Zhu B., Cai G, Hall E., Freeman G.J. In-fusion assembly: seamless engineering of

multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *Biotechniques*. 2007 Sep;43(3):354-9.

12. Janjua S., Younis S., Deeba F. and Naqvi S.M.S., High efficiency DNA transformation protocol for *Escherichia Coli* using combination of physico-chemical methods. *Int. J. Agric. Biol.*, 2014; 16: 132-138.

13. Маниатис Т., Молекулярное клонирование: учебник/ Т. Маниатис и др. - М.: Мир, 1984. – С.450.

14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, 227(5259):680-5.

15. David B. McIntosh. Glutaraldehyde Cross-links Lys-492 and Arg-678 at the Active Site of Sarcoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J Biol Chem, JBC*, 1992, 267(31):22328-35.

16. Englert C, Blunk T, Müller R, von Glasser S.S, Baumer J, Fierlbeck J, Heid I.M., Nerlich M, Hammer J. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Res Ther.*, 2007, 9(3):R47.

#### (57) Формула изобретения

1. Белковая конструкция Trib-2mut для получения каркасного материала для инжиниринга тканей, с аминокислотной последовательностью, приведенной в виде SEQ ID NO: 4, представляющая собой рекомбинантный гомолог эластомерного домена резилина *Tribolium castaneum*, в основе которого лежит периодически повторяющийся минимальный эластомерный мотив Trib-1mut резилина *T. continuum* с аминокислотной последовательностью, приведенной в виде SEQ ID NO: 5.

2. Синтетический ген Trib-2mut, кодирующий гомолог нативного эластомерного домена резилина *T. castaneum* по п. 1, с установленной нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

3. Плазмидная ДНК pGDTrib2mut, определяющая биосинтез белка Trib-2mut по п. 1 в клетках *Escherichia coli* и характеризующаяся последовательностью нуклеотидов, приведенной в виде SEQ ID NO: 3.

4. Штамм *Escherichia coli* M15/pGDTrib2mut - продуцент рекомбинантной белковой конструкции Trib-2mut по п. 1, полученный путем трансформации клеток материнского штамма *E. coli* M15 плазмидной ДНК pGDTrib2mut по п. 3.

5. Полимерный каркасный биоматериал для инжиниринга тканей, полученный посредством специфической обработки очищенного рекомбинантного белка Trib-2mut по п. 1 глутаровым альдегидом для молекулярной сшивки по аминокислоте лизин или 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом для молекулярной сшивки по аспарагиновой/глутаминовой аминокислотам.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

SEQ ID NO:1 Нуклеотидная последовательность рекомбинантной плазмиды pGD*Trib1mut* размером 3538 п.о.:

10	20	30	40	50	60
СТСГАГААТ	САТАААААТ	ТТАТТТГСТТ	ТГТГАГСГГА	ТААСААТТАТ	ААТАГАТТСА
70	80	90	100	110	120
АТТГТГАГСГ	ГАТААСААТТ	ТСАСАСАГАА	ТТСАТТАААГ	АГГАГАААТТ	ААСТАТГАГА
130	140	150	160	170	180
ГГАТСССГГА	СССГАССАГГ	ТССТГГАССА	ГААГАТГГТГ	ГТАААСССГТ	СТССАССТАТ
190	200	210	220	230	240
ГГСССГСССГ	ГСАААГСССГ	СААТГГСТТТ	ГГТГГТГГТГ	ГАССАГГАСС	АГГТСССТАГА
250	260	270	280	290	300
ТСТСАТСАСС	АТССАТТАСА	СТААГСТТАА	ТТАГСТГАГС	ТТГГАСТССТ	ГТТГАТАГАТ
310	320	330	340	350	360
ССАГТААТГА	ССТСАГААСТ	ССАТСТГГАТ	ТТГТТСАГАА	СГСТСССГТТ	СССГСССГСГ
370	380	390	400	410	420
ТТТТТТАТТГ	ГТГАГААТСС	ААГСТАГСТТ	ГГСГАГАТТТ	ТСАГГАГСТА	АГГААГСТАА
430	440	450	460	470	480
ААТГГАГААА	ААААТСАСТГ	ГАТАТАССАС	СГТТГАТАТА	ТССААТГГС	АТСГТАААГА
490	500	510	520	530	540
АСАТТТТГАГ	ГСАТТТКАГТ	САГТТГСТСА	АТГАТССТАТ	АССАГАСССГ	ТТСАГСТГГА
550	560	570	580	590	600
ТАТТАСГСС	ТТТТТАААГА	ССГТАААГАА	ААТААГСАС	ААГТТТТАТ	СГСССТТТАТ
610	620	630	640	650	660
ТСАСАТТСТТ	ГСССГССТГА	ТГААТГСТСА	ТССГГААТТТ	СГАТАГГСАА	ТГАААГАССГ
670	680	690	700	710	720
ТГАГСТГГТГ	АТАТГГГАТА	ГТГТТКАСС	ТТГТТАКАСС	ГТТТТССАТГ	АГСАААСТГА
730	740	750	760	770	780
ААСГТТТТТА	ТСССГСТГГА	ГТГААТАССА	СГАСГАТТТ	СГГСАГТТТ	ТАСАСАТАТА
790	800	810	820	830	840
ТТССГААГАТ	ГТГСССГТГТ	АССГТГАААА	ССТГСССТТАТ	ТТСССТАААГ	ГГТТТАТТГА
850	860	870	880	890	900
ГААТАТГТТТ	ТТССГСТСАГ	ССААТСССТГ	ГГТГАТТТТ	АССАГТТТТ	АТТТАААСГТ
910	920	930	940	950	960
ГГССААТАТГ	ГАСААСТТСТ	ТСССССССГТ	ТТТКАССАТГ	ГГСАААТАТТ	АТАСГАААГГ
970	980	990	1000	1010	1020
СГАСААГГТГ	СТГАТГССС	ТГССГАТТТА	ГГТТКАТКАТ	СССГТСТГТ	АТГССТТССА
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ТГТСССГАГА	АТГСТТААТГ	ААТТАСААСА	ГТАСТГССГАТ	ГАГТГССАГГ	СГСССГССГА
1090	1100	1110	1120	1130	1140
АТТТТТТТАА	ГГСАГТТАТТ	ГГТГСССТТА	ААССССТГГ	ГТААТГАСТ	ТСТАГСТТГА
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ГГСАТСАААТ	ААААССАААГ	ССТСАСТТГА	ААГАСТГСС	СТТТССГТТТ	АТСТГТТГТТ
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ТГТСССГТГА	СГСТТСССТ	АГТАГГАСАА	АТССССССГТ	СТАГАСТТГ	СТССССГГТТ
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ТСССГТГАТГА	СГГТГААААС	СТСТГАСАСА	ТГСАСТТСС	ГГАГАСССГТ	АСАСТТГТ
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ТГТААГССГА	ТГСССГГАС	АГАСААССС	ГТСАССССГ	ГТСАСССГГТ	ГТТГСССГГТ
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ГТССССГСС	АГССАТГАСС	САСТСАСГТА	СГСАТАССС	АГТГАТАСТ	ГГСТТААСТА
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ТГССССАТСА	ГАСГААТТГ	ТАСТГАГАСТ	ГСАССАТАТ	СГГТГТГААА	ТАССССАСАГ
1510	1520	1530	1540	1550	1560
АТГССГАААГ	АГААААТАСС	ГСАТСАССС	СТСТТСССГТ	ТССТСССТСА	СТГАСТСГСТ
1570	1580	1590	1600	1610	1620
СГССТСССГТ	ТГТСССГТГ	ГССГАСССГТ	АТСАСТТСА	ТСАААСССС	ТААТАСССГТ
1630	1640	1650	1660	1670	1680
АТССАСАГАА	ТСАСССГАТА	АССГАССААА	ГАСАТАТТГА	ГСААААССС	АГСААААСС

```

1690      1700      1710      1720      1730      1740
CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA
1750      1760      1770      1780      1790      1800
GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA
1810      1820      1830      1840      1850      1860
CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC
1870      1880      1890      1900      1910      1920
CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCACGCTG
1930      1940      1950      1960      1970      1980
TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTGCTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC
1990      2000      2010      2020      2030      2040
CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG
2050      2060      2070      2080      2090      2100
ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT
2110      2120      2130      2140      2150      2160
AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT
2170      2180      2190      2200      2210      2220
ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG
2230      2240      2250      2260      2270      2280
ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC
2290      2300      2310      2320      2330      2340
GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA
2350      2360      2370      2380      2390      2400
GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCAAGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC
2410      2420      2430      2440      2450      2460
CTAGATCCTT TAAATTAATA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC
2470      2480      2490      2500      2510      2520
TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT
2530      2540      2550      2560      2570      2580
TCGTTCATCC ATAGCTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT
2590      2600      2610      2620      2630      2640
ACCATCTGGC CCCAGTGTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT
2650      2660      2670      2680      2690      2700
ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCCTG CAACTTTATC
2710      2720      2730      2740      2750      2760
CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA
2770      2780      2790      2800      2810      2820
TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG
2830      2840      2850      2860      2870      2880
TATGGCTTCA TTCAGTCCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT
2890      2900      2910      2920      2930      2940
GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC
2950      2960      2970      2980      2990      3000
AGTGTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT
3010      3020      3030      3040      3050      3060
AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG
3070      3080      3090      3100      3110      3120
GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC
3130      3140      3150      3160      3170      3180
TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AAACCTCAA GGATCTTACC
3190      3200      3210      3220      3230      3240
GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT
3250      3260      3270      3280      3290      3300
TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG
3310      3320      3330      3340      3350      3360
AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG
3370      3380      3390      3400      3410      3420
CATTTATCAG GGTATTGTGC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA
3430      3440      3450      3460      3470      3480
ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCT AAGAAACCAT
3490      3500      3510      3520      3530      3540
TATTATCATG ACATTAACCT ATAAAAATAG GCGTATCACG AGGCCCTTTC GTCTTCAC..

```

**SEQ ID NO:2 Нуклеотидная последовательность рекомбинантной плазмиды pGDTriblmut-2 размером 3655 п.о.:**

10	20	30	40	50	60
СТСГАГАААТ	САТААААААТ	ТТАТТТГСТТ	ТГТГАГСГГА	ТААСААТТАТ	ААТАГАТТСА
70	80	90	100	110	120
АТТГТГАГСГ	ГАТААСААТТ	ТСАСАСАГАА	ТТКАТТАААГ	АГГАГААААТ	ААСТАТГАГА
130	140	150	160	170	180
ГГАТССГГА	ССГАССАГГ	ТССТГГАССА	ГААГАТГГТГ	ГТАААССГТС	СТССАССТАТ
190	200	210	220	230	240
ГГСССГСССГ	ГСАААГССГ	СААТГГСТТТ	ГГТГГТГГТГ	ГАССАГГАСС	АГГТССТАГА
250	260	270	280	290	300
ТСССГТАСС	ГАССАГГТСС	ТГГАССАГАА	ГАТГГТГГТА	ААССГТССТС	САССТАТГГС
310	320	330	340	350	360
ССССССГСА	ААГСССГСА	ТГГСТТТГТТ	ГГТГГТГГСА	САГГАССАГГ	ТССТАГАТСТ
370	380	390	400	410	420
САТСАССАТС	АССАТСАСТА	АГСТТААТТА	ГСТГАГСТТГ	ГАСТССТГТТ	ГАТАГАТССА
430	440	450	460	470	480
ГТААТГАССТ	САГААСТССА	ТСТГГАТТТГ	ТТСАГААССГ	ТССГТТГССС	СССГСССГТТ
490	500	510	520	530	540
ТТТТАТГГТГ	АГААТССААГ	СТАГСТТГГС	ГАГАТТТТСА	ГГАГСТАААГ	ААГСТААААТ
550	560	570	580	590	600
ГГАГАААААА	АТСАСТГГАТ	АТАССАССГТ	ТГАТАТАТСС	СААТГГСАТС	ГТАААГААСА
610	620	630	640	650	660
ТТТТГАГГСА	ТТТСАГТСАГ	ТТГСТСААТГ	ТАССТАТААС	САГАСССГТТ	АГСТГГАТАТ
670	680	690	700	710	720
ТАССССТТТ	ТТАААГАССС	ТАААГААААА	ТААГСАСААГ	ТТТТАТСССГ	ССТТТАТТСА
730	740	750	760	770	780
САТТСТТГСС	СГССТГАТГА	АТГСТСАТСС	ГГААТТТССГ	АТГГСААТГА	ААГАССГТГА
790	800	810	820	830	840
ГСТГГТГАТА	ТГГГАТАГТГ	ТТСАСССТТГ	ТТАСАСССГТ	ТТССАТГАС	АААСТГАААС
850	860	870	880	890	900
ГТТТТСАТСГ	СТСТГГАТГ	ААТАССАССА	СГАТТТСССГ	САГТТТСТАС	АСАТАТАТТС
910	920	930	940	950	960
ГСААГАТГТГ	ССТГТТАСГ	ГТГААААССТ	ГСССТАТТТС	ССТАААГГГТ	ТТАТТГАГАА
970	980	990	1000	1010	1020
ТАТГТТТТТС	ГТСТСАГССА	АТСССТГГГТ	ГАГТТТСАСС	АГТТТТГАТТ	ТАААССТГГС
1030	1040	1050	1060	1070	1080
СААТАТГГАС	ААСТТСТТСГ	СССССГТТТТ	САССАТГГГС	АААТАТТАТА	СГАААГССГА
1090	1100	1110	1120	1130	1140
СААГТГСТГ	АТСССГСТГ	СГАТТСАГГТ	ТСАТСАТГСС	ГТСТГТГАТГ	ГСТТССАТГТ
1150	1160	1170	1180	1190	1200
СГГСАГААТГ	СТТААТГААТ	ТАСААСАГТА	СТГССАТГАГ	ТГГСАГГССС	ГГГССГАААТ
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ТТТТТААГС	АГТТАТТГГТ	ГСССТТАААС	ГССТГГГГТА	АТГАСТСТСТ	АГСТТГАГГС
1270	1280	1290	1300	1310	1320
АТСАААТААА	АССАААГГСТ	САГТССАААГ	АСТГГСССТТ	ТССГТТТТАТ	ТГТГТТТТГТ
1330	1340	1350	1360	1370	1380
СГГТГААСС	ТСТССТГАТ	АГГАСАААТС	СГССССТСТА	ГАСТГСССТС	СГССССТТТС
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ГТГАТГАСС	ТГААААСТС	ТГАСАСАТГС	АГСТССССГА	ГАССГТСАСА	ГСТТГСТГТ
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ААСССГАТС	СГГГАССАГА	СААССССТС	АГГССССТС	АСССГГТГТТ	ГСССГГТГТС
1510	1520	1530	1540	1550	1560
ГГГССССАСС	САТГАСССА	ТСАССТАСС	АТАСССГАГТ	ГТАТАСТГСС	ТТААСТАТГС
1570	1580	1590	1600	1610	1620
ГССАТСАГА	САГАТТГТАС	ТГАГАТГСА	ССАТАТССС	ТГТГАААТАС	СГСАСАГАТГ
1630	1640	1650	1660	1670	1680
СГАААГГА	АААТАСССА	ТСАССССТС	ТТССССТТС	ТСССТСАСТ	АСТССТТСС
1690	1700	1710	1720	1730	1740
СТСССТСТ	СГГСТССС	ГАСССГТАТ	АГСТСАСТСА	ААСССГТАА	ТАСССГТАТ

1750	1760	1770	1780	1790	1800
CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG
1810	1820	1830	1840	1850	1860
GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA
1870	1880	1890	1900	1910	1920
TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG
1990	2000	2010	2020	2030	2040
ATACCTGTCC	GCCTTTCTCC	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCAATGCT	CACGCTGTAG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GTATCTCAGT	TCGGTGTAGG	TCGTTTCGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT
2110	2120	2130	2140	2150	2160
TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	AGTGGTGGCC	TAACACGGCC	TACACTAGAA	GGACAGTATT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CGGCAAAACA	ACCACCGCTG	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	AGATTACCGG
2410	2420	2430	2440	2450	2460
CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG
2470	2480	2490	2500	2510	2520
GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA
2530	2540	2550	2560	2570	2580
GATCCTTTTA	AATTAATAAT	GAAGTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTCC
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TTCATCCATA	GCTGCCTGAC	TCCCGTCGTT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC
2710	2720	2730	2740	2750	2760
ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CTCCATCCAG	TCTATTAATT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTTCG	CAGTTAATAG
2890	2900	2910	2920	2930	2940
TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	TCGGTCTCCT	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCAGT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
GTTATCACTC	ATGGTTATGG	CAGCACTGCA	TAATCTCTTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG
3130	3140	3150	3160	3170	3180
ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGGGC
3190	3200	3210	3220	3230	3240
ACCGAGTTGC	TCTTGCCCGG	CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT
3310	3320	3330	3340	3350	3360
GTTGAGATCC	AGTTCGATGT	AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC
3370	3380	3390	3400	3410	3420
TTTACCAGC	GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	ACTCTTCTTT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
TTATCAGGGT	TATGTCTCA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA
3550	3560	3570	3580	3590	3600
AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	TTCCCCGAAA	AGTGCCACCT	GACGTCTAAG	AAACCATTAT
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TATCATGACA	TTAACCTATA	AAAATAGGCG	TATCACGAGG	CCCTTTCGTC	TTCAC.....

**SEQ ID NO:3 Нуклеотидная последовательность рекомбинантной плазмиды pGD*Trib2mut* размером 3889 п.о.:**

10	20	30	40	50	60
СТCGAGAAAT	САТААААААТ	ТТАТТТГСТТ	ТГТГАГСГГА	ТААСААТТАТ	ААТАГАТТСА
70	80	90	100	110	120
АТТГТГАГСГ	ГАТААСААТТ	ТСАСАСАГАА	ТТКАТТАААГ	АГГАГААААТ	ААСТАТГАГА
130	140	150	160	170	180
ГГАТСССГТА	ССГАССААГ	ТССТГГАССА	ГААГАТГГТГ	ГТАААССГТ	СТССАССАТ
190	200	210	220	230	240
ГГСССГСССГ	ГСАААГСССГ	СААТГГСТТТ	ГГТГГТГГТГ	ГАССАГСАСС	АГГТССТАГА
250	260	270	280	290	300
ТСССГТАСС	ГАССАГСТС	ТГГАССАГАА	ГАТГГТГГТА	ААССГТССТ	САССАТГАСС
310	320	330	340	350	360
СССГСССГСА	ААГСССГСАА	ТГГСТТГГТ	ГГТГГТГГСА	САГГАССАГ	ТССТАГАТСС
370	380	390	400	410	420
ГГАТСССГТА	САГГТССТГ	АССАГААГАТ	ГГТГГТААА	СГТССТССА	СТАТГСССС
430	440	450	460	470	480
СССГСССАА	ГССССААТГ	СТТТГТГТ	ГГТГГАСС	ГАССАГСТ	ТАГАТСССГ
490	500	510	520	530	540
АСССГАСС	ГТССТГГА	АГААГАТГ	ГГТАААСС	ССТССАСС	ТГСССССС
550	560	570	580	590	600
ГГСАААГСС	ГСААТГСТ	ТГГТГТГТ	ГГАССАГ	САГГТСС	АТСТСАТ
610	620	630	640	650	660
САТСАССА	АСТААГСТ	АТТАГТГА	СТТГГАТ	ТГТГАТА	ТССАГААТ
670	680	690	700	710	720
АССТСАГА	ТССАТСТ	ТТГТТСА	АССТССГ	ГСССССС	ГТТТТТТ
730	740	750	760	770	780
ГГТГАГАА	СААГТАГ	ТГГСАГА	ТТСАГГА	ААГГААГ	АААТГГА
790	800	810	820	830	840
ААААТСА	ГГАТАТА	ССГТТА	АТССААТ	САТССАА	АААТТТТ
850	860	870	880	890	900
ГГАТТТТ	ТСАГТТГ	ААТГАТ	ТААССА	ГТТСАГ	АТАТТА
910	920	930	940	950	960
СТТТТАА	АССГААА	ААААТА	СААГТТТ	СССГСТТ	ТТСААТТ
970	980	990	1000	1010	1020
ТГССССС	АТГААТ	АТСССГА	ТССАТГ	АТГААА	ГТГАГТ
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ГАТАТГ	АГТГТ	СТТГТ	СГТТТ	ГАССАА	АААСГТ
1090	1100	1110	1120	1130	1140
АТССТ	АГТГАА	АССАГА	СССГА	СТАСА	АТТССА
1150	1160	1170	1180	1190	1200
ТГТГ	ТАСГ	АССТ	ТТСС	ГГТТ	АГАА
1210	1220	1230	1240	1250	1260
ТТТ	ГСАА	ТТТ	САА	ГАТТ	ТГ
1270	1280	1290	1300	1310	1320
ГГА	ТТ	ТТ	ТТ	ТА	Т
1330	1340	1350	1360	1370	1380
ГТ	ТГ	АГ	ТГ	ГА	АТ
1390	1400	1410	1420	1430	1440
ААТ	ГА	АГ	ТГ	ГГ	АА
1450	1460	1470	1480	1490	1500
АГ	ТГ	АА	ГТ	СТ	АГ
1510	1520	1530	1540	1550	1560
ТАА	ГГ	АА	СТ	ТА	ТТ
1570	1580	1590	1600	1610	1620
АСС	ГА	АА	ТТ	СТ	ТТ
1630	1640	1650	1660	1670	1680
АСС	ГТ	АТ	СГ	СА	СТ
1690	1700	1710	1720	1730	1740
АТ	СГ	СГ	СГ	ТГ	ТГ
1750	1760	1770	1780	1790	1800

CAGCCATGAC	CCAGTCACGT	AGCGATAGCG	GAGTGTATAC	TGGCTTAACT	ATGCGGCATC
1810	1820	1830	1840	1850	1860
AGAGCAGATT	GTAAGTACAG	TGCACCATAT	GCGGTGTGAA	ATACCGCACA	GATGCGTAAG
1870	1880	1890	1900	1910	1920
GAGAAAATAC	CGCATCAGGC	GCTCTTCCGC	TTCCTCGCTC	ACTGACTCGC	TGCGCTCGGT
1930	1940	1950	1960	1970	1980
CTGTCCGGCTG	CGGCGAGCGG	TATCAGCTCA	CTCAAAGCGG	GTAATACGGT	TATCCACAGA
1990	2000	2010	2020	2030	2040
ATCAGGGGAT	AACGCAGGAA	AGAACATGTG	AGCAAAAGGC	CAGCAAAAGG	CCAGGAACCG
2050	2060	2070	2080	2090	2100
TAAAAAGGCC	GCGTTGCTGG	CGTTTTTCCA	TAGGCTCCGC	CCCCCTGACG	AGCATCACAA
2110	2120	2130	2140	2150	2160
AAATCGACGC	TCAAGTCAGA	GGTGGCGAAA	CCCGACAGGA	CTATAAAGAT	ACCAGGCGTT
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TCCCCCTGGA	AGCTCCCTCG	TGCGCTCTCC	TGTTCCGACC	CTGCCGCTTA	CCGGATACCT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
GTCCGCCCTT	CTCCCTTCGG	GAAGCGTGGC	GCTTTCTCAA	TGCTCACGCT	GTAGGTATCT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
CAGTTCGGTG	TAGGTCGTTT	GCTCCAAGCT	GGGCTGTGTG	CACGAACCCC	CCGTTTCAGCC
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CGACCGCTGC	GCCTTATCCG	GTAACATATC	TCTTGAGTCC	AACCCGGTAA	GACACGACTT
2410	2420	2430	2440	2450	2460
ATCGCCACTG	GCAGCAGCCA	CTGGTAACAG	GATTAGCAGA	GCGAGGTATG	TAGGCGGTGC
2470	2480	2490	2500	2510	2520
TACAGAGTTC	TTGAAGTGGT	GGCCTAACTA	CGGCTACACT	AGAAGGACAG	TATTTGGTAT
2530	2540	2550	2560	2570	2580
CTGCGCTCTG	CTGAAGCCAG	TTACCTTCGG	AAAAAGAGTT	GGTAGCTCTT	GATCCGGCAA
2590	2600	2610	2620	2630	2640
ACAAACCACC	GCTGGTAGCG	GTGGTTTTTT	TGTTTGCAAG	CAGCAGATTA	CGCGCAGAAA
2650	2660	2670	2680	2690	2700
AAAAGGATCT	CAAGAAGATC	CTTTGATCTT	TTCTACGGGG	TCTGACGCTC	AGTGAACGA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AAACTCACGT	TAAGGGATTT	TGGTCATGAG	ATTATCAAAA	AGGATCTTCA	CCTAGATCCT
2770	2780	2790	2800	2810	2820
TTTAAATTAA	AAATGAAGTT	TTAAATCAAT	CTAAAGTATA	TATGAGTAAA	CTTGGTCTGA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
CAGTTACCAA	TGCTTAATCA	GTGAGGCACC	TATCTCAGCG	ATCTGTCTAT	TTCGTTTCATC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
CATAGCTGCC	TGACTCCCCG	TCGTGTAGAT	AACTACGATA	CGGGAGGGCT	TACCATCTGG
2950	2960	2970	2980	2990	3000
CCCCAGTGCT	GCAATGATAC	CGCGAGACCC	ACGCTCACCG	GCTCCAGATT	TATCAGCAAT
3010	3020	3030	3040	3050	3060
AAACCAGCCA	GCCGGAAGGG	CCGAGCGCAG	AAGTGGTCTT	GCAACTTTAT	CCGCCTCCAT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
CCAGTCTATT	AATTGTTGCC	GGGAAGCTAG	AGTAAGTAGT	TCGCCAGTTA	ATAGTTTGCG
3130	3140	3150	3160	3170	3180
CAACGTTGTT	GCCATTGCTA	CAGGCATCGT	GGTGTACGCG	TCGTCGTTTG	GTATGGCTTC
3190	3200	3210	3220	3230	3240
ATTACGCTCC	GGTTCCTAAC	GATCAAGGCG	AGTTACATGA	TCCCCCATGT	TGTGCAAAAA
3250	3260	3270	3280	3290	3300
AGCGGTTAGC	TCCTTCGGTC	CTCCGATCGT	TGTCAGAAGT	AAGTTGGCCG	CAGTGTATATC
3310	3320	3330	3340	3350	3360
ACTCATGGTT	ATGGCAGCAC	TGCATAATTC	TCTTACTGTC	ATGCCATCCG	TAAGATGCTT
3370	3380	3390	3400	3410	3420
TTCTGTGACT	GGTGAGTACT	CAACCAAGTC	ATTCTGAGAA	TAGTGTATGC	GGCGACCGAG
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TTGCTCTTGC	CCGGCGTCAA	TACGGGATAA	TACCGCGCCA	CATAGCAGAA	CTTTAAAAGT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GCTCATCAT	GGAAAACGTT	CTTCGGGGCG	AAAACTCTCA	AGGATCTTAC	CGCTGTTGAG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
ATCCAGTTCC	ATGTAACCCA	CTCGTGCACC	CAACTGATCT	TCAGCATCTT	TTACTTTCAC
3610	3620	3630	3640	3650	3660
CAGCGTTTCT	GGGTGAGCAA	AAACAGGAAG	GCAAAATGCC	GCAAAAAAGG	GAATAAGGGC
3670	3680	3690	3700	3710	3720

```
GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
    3730          3740          3750          3760          3770          3780
GGTTATTGTG CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG
    3790          3800          3810          3820          3830          3840
GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT
    3850          3860          3870          3880          3890          3900
GACATTAACC TATAAAAAATA GGCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAC. ....
```

**SEQ ID NO:4 Нуклеотидная и аминокислотная последовательности эластомерного домена Trib-2mut (с 481-го по 498-й нуклеотиды закодирован полигистидиновый спейсер):**

```
5' ATG AGA GGA TCC GGT ACC GGA CCA GGT CCT GGA CCA GAA GAT GGT GGT AAA CCG
    9          18          27          36          45          54
    M R G S G T G P G P G P E D G G K P
    TCC TCC ACC TAT GGC CCG CCG GGC AAA GGC GGC AAT GGC TTT GGT GGT GGT GGA
    63          72          81          90          99          108
    S S T Y G P P G K G G N G F G G G G
    CCA GGA CCA GGT CCT AGA TCC GGT ACC GGA CCA GGT CCT GGA CCA GAA GAT GGT
    117          126          135          144          153          162
    P G P G P R S G T G P G P G P E D G
    GGT AAA CCG TCC TCC ACC TAT GGC CCG CCG GGC AAA GGC GGC AAT GGC TTT GGT
    171          180          189          198          207          216
    G K P S S T Y G P P G K G G N G F G
    GGT GGT GGA CCA GGA CCA GGT CCT AGA TCC GGT ACC GGA CCA GGT CCT GGA CCA
    225          234          243          252          261          270
    G G G P G P G P R S G T G P G P G P
    GAA GAT GGT GGT AAA CCG TCC TCC ACC TAT GGC CCG CCG GGC AAA GGC GGC AAT
    279          288          297          306          315          324
    E D G G K P S S T Y G P P G K G G N
    GGC TTT GGT GGT GGT GGA CCA GGA CCA GGT CCT AGA TCC GGT ACC GGA CCA GGT
    333          342          351          360          369          378
    G F G G G G P G P G P R S G T G P G
    CCT GGA CCA GAA GAT GGT GGT AAA CCG TCC TCC ACC TAT GGC CCG CCG GGC AAA
    387          396          405          414          423          432
    P G P E D G G K P S S T Y G P P G K
    GGC GGC AAT GGC TTT GGT GGT GGT GGA CCA GGA CCA GGT CCT AGA TCT CAT CAC
    441          450          459          468          477          486
    G G N G F G G G G P G P G P R S H H
    CAT CAC CAT CAC TAA 3'
```

-----  
 Н Н Н Н \*

SEQ ID NO:5 Нуклеотидная и аминокислотная последовательности  
 минимального эластомерного мотива Trib-1mut резилина *T. Castaneum*:

		9		18		27		36		45									
GAA	GAT	GGC	GGC	AAA	CCG	TCC	TCC	ACC	TAT	GGC	CCG	CCG	GGC	AAA	GGC	GGC			
-----																			
E	D	G	G	K	P	S	S	T	Y	G	P	P	G	K	G	G			
		54		63															
AAT	GGC	TTT	GGC	GGC	GGC	3'													
-----																			
N	G	F	G	G	G														

Способ получения рекомбинантного эластомерного домена Trib-2mut, генно-инженерная конструкция рGDТrib2mut, определяющая биосинтез Trib-2mut в клетках *E. coli*, штамм-продуцент *E. coli* M15/ рGDТrib2mut и способ получения полимерного материала на основе данного белка



Схема0001

Способ получения рекомбинантного эластомерного домена Trib-2mut, генно-инженерная конструкция pGD Trib2mut, определяющая биосинтез Trib-2mut в клетках *E. coli*, штамм-производитель *E. coli* M15/ pGD Trib2mut и способ получения полимерного материала на основе данного белка

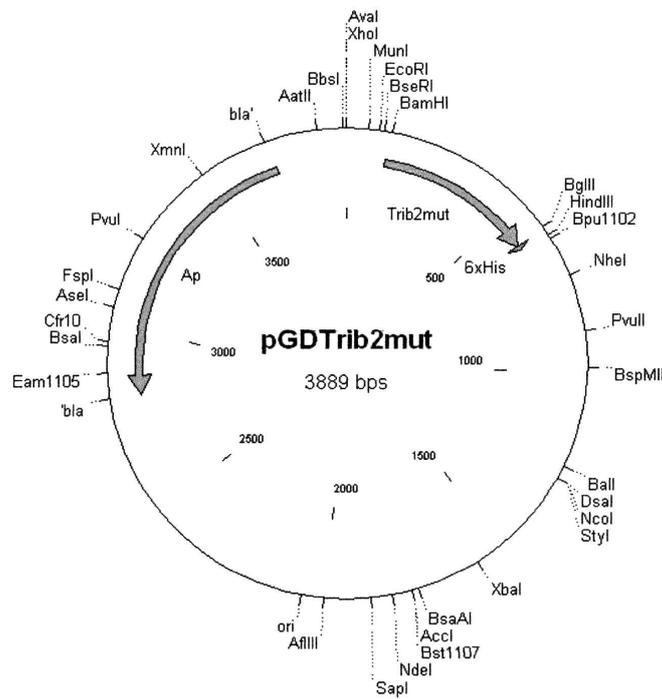


Схема0002