



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 071 503** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК⁶ **C 12 N 15/70, 15/09**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5027679/13, 18.02.1992

(46) Дата публикации: 10.01.1997

(56) Ссылки: The EMBO Journal, v.3, pp.
1429-1434, 1984.

(71) Заявитель:

Биотехнологическая компания "Биосервис"

(72) Изобретатель: Алаторцев В.Е.,

Алаторцева Г.И.

(73) Патентообладатель:

Биотехнологическая компания "Биосервис"

(54) ВЕКТОР pEL5c, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, и в частности к генетической инженерии, и может быть использовано при создании плазмид и соответствующих штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, а также для очистки белковых продуктов. Преимущество заявленного вектора pEL5c заключается в том, что в

результате использования оперона, состоящего из гена, кодирующего рекомбинантный белок, и гена лизоцима, одновременно с синтезом рекомбинантного белка идет синтез лизоцима, разрушающего полисахаридную оболочку E. coli, что существенно упрощает очистку водонерастворимого агломерата рекомбинантного белка.

RU 2 0 7 1 5 0 3 C 1

RU 2 0 7 1 5 0 3 C 1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 071 503** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 15/70, 15/09**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5027679/13, 18.02.1992

(46) Date of publication: 10.01.1997

(71) Applicant:
Biotekhnologicheskaja kompanija "Bioservis"

(72) Inventor: Alatorsev V.E.,
Alatorseva G.I.

(73) Proprietor:
Biotekhnologicheskaja kompanija "Bioservis"

(54) **VECTOR PEL5C DESIGNATED FOR THE FOREIGN DNA EXPRESSION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic engineering. SUBSTANCE: operon consists of gene encoding recombinant protein and gene encoding lysozyme. Simultaneously with synthesis of recombinant protein lysozyme is synthesized that decomposes polysaccharide

envelope of E. coli cells. Vector can be used for plasmid and the corresponding strain-producers of recombinant proteins construction and for proteins purification. EFFECT: simplified method of water-insoluble recombinant protein agglomerate purification.

RU 2 0 7 1 5 0 3 C 1

RU 2 0 7 1 5 0 3 C 1

Изобретение относится к области биотехнологии, генетической инженерии и может быть использовано для получения плазмид, синтезирующих рекомбинантные белки.

Большие количества рекомбинантных белков можно синтезировать в клетках *Escherichia coli*, несущих системы экспрессии рекомбинантных генов на основе промоторов фага лямбда (см. например, H. Bernard and D. R. Helinski. *Methods Enzymol.* vol. 68, pp. 482-492, 1979). Транскрипция в таких системах регулируется связыванием температурочувствительного репрессора фага лямбда, кодируемого мутантным геном с *lts857*, с операторным участком. Когда клетки растут при температуре 30-32°C, репрессор связывается с оператором и блокирует экспрессию. При повышении температуры роста до 42°C репрессор инактивируется, что позволяет РНК-полимеразе связаться с промотором и начать транскрипцию гена. В результате интенсивной транскрипции и последующей трансляции могут синтезироваться значительные количества белка.

Известны рекомбинантные плазмидные ДНК рEX1, рEX2 и рEX3, позволяющие экспрессировать рекомбинантные белки во всех трех рамках считывания (K. K. Stanley and J. P. Luzio. *The EMBO Journal*, vol.3, pp. 1429-1434, 1984). Последовательности ДНК для экспрессии можно вставить в полилинкер, расположенный в 3'-конце гена *lacZ*. В указанных плаزمидах P_R промотор бактериофага лямбда обеспечивает экспрессию последовательностей ДНК, и продукт составляет значительную часть суммарного бактериального белка. Экспрессируемый белок в клетке накапливается в виде водонерастворимых агломератов.

Однако у этих векторов есть недостаток: для выделения водонерастворимых агломератов рекомбинантного белка необходимо разрушать клеточную стенку бактерии.

Вектор рEX3 выбран в качестве прототипа для получения вектора рEL5с. Преимущество заявленного вектора рEL5с заключается в том, что в результате использования оперона, состоящего из гена, кодирующего рекомбинантный белок, и гена лизоцима, одновременно с синтезом рекомбинантного белка идет синтез лизоцима, разрушающего полисахаридную оболочку *E.coli*, что существенно упрощает очистку водонерастворимых агломератов рекомбинантного белка.

Сущность изобретения состоит в том, что сконструирован вектор рEL5с размером 6,4 тысячи пар оснований (т.п.о.), состоящий из следующих элементов:

-XbaI-XbaI-фрагмента плазмидной ДНК бактериального вектора рEX3 размером 5,8 т.п.о. который содержит слитный *cro-lacZ* ген, кодирующий слитный белок под контролем промотора P_R бактериофага лямбда, полилинкер в 3'-конце *lacZ*-гена;

-BamH1-BamH1-фрагмента ДНК плазмиды рLysS (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen *J. Bacteriol.* vol.134, pp.1141, 1978), содержащего ген лизоцима бактериофага T4 и имеющего размер 0,6 т.п.о.

Для конструирования плазмиды рEL5с

ДНК плазмиды рEX3 гидролизуют рестриктазой XbaI и достраивают по три нуклеотида в липких концах с помощью ДНК-полимеразы PolIK. Параллельно получают BamH1 рестрикт размером 0,6 т.п.о. из плазмиды рLysS (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen. *J. Bacteriol.* vol.134, pp. 1141, 1978), содержащий ген лизоцима бактериофага T4 и имеющий три достроенных с помощью PolIK нуклеотида в липких концах. Фрагмент рEX2 лигируют с фрагментом ДНК, содержащим ген лизоцима бактериофага T4. Лигазной смесью трансформируют клетки *E. coli*, содержащие в хромосоме температурочувствительный ген бактериофага лямбда с *lts857*, например клетки штамма PLT90. Трансформанты высевают на среду с ампициллином при 30°C. Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с геном лизоцима в нужной ориентации, отбирают с помощью анализа на способность к лизису после индукции синтеза белка. Экспрессию рекомбинантных белков индуцируют повышением температуры до 42°C. В клонах, продуцирующих лизоцим, после индукции белкового синтеза и последующего добавления хлороформа происходит лизис клеток. Из отобранных клонов стандартными способами выделяют плазмиду рEL5с. Векторная ДНК стабильна при хранении в 10 мМ трис, pH 8,0 1 мМ ЭДТА при -20°C.

Пример 1. Получение векторной плазмиды рEL5с с оперонной системой экспрессии и лизиса.

Клетки бактерий *E. coli* PLT90, содержащие плазмиду рEX3 (K. K. Stanley and J. P. Luzio. *The EMBO Journal*, vol.3, pp. 1429-1434, 1984), выращивают в 50 мл бульона 2YT (16 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl на 1 л воды), содержащего 100 мкг/мл ампициллина до титра 10⁹ кл/мл.

Клетки осаждают центрифугированием, ресуспендируют в 2 мл раствора (50 мМ глюкозы, 25 мМ трис HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА, 5 мг/мл лизоцима) и инкубируют 5 мин при комнатной температуре. Далее добавляют 4 мл раствора 0,2 М NaOH, 1% додецилсульфата натрия, перемешивают, инкубируют 10 мин во льду, добавляют 3 мл охлажденного 5 М раствора ацетата калия, pH 4,8, перемешивают, оставляют на 10 мин во льду, образовавшийся осадок отделяют центрифугированием. К надосадочной жидкости добавляют 0,6 объема изопропилового спирта и выдерживают 15 мин при комнатной температуре. Осадок собирают центрифугированием, ресуспендируют в 0,5 мл TE8-буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и добавляют равный объем насыщенного раствора ацетата натрия. После инкубации в течение 30 мин при минус 20°C осадок удаляют центрифугированием, а к надосадочной жидкости добавляют 0,6 объема изопропанола и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Осадок собирают центрифугированием, промывают 70%-ным этанолом и ресуспендируют в 100 мкл TE8-буфера.

Плазмидную ДНК (1 мкг рEX3) обрабатывают эндонуклеазой рестрикции XbaI (10 ед.) в буфере А (50 мМ Трис-HCl, pH

7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM дитиотрейтол, 100 mM NaCl, 4 mM спермидина) в течение 2 часов. Анализ полноты гидролиза проводят с помощью электрофореза. Используя фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, достраивают три из четырех нуклеотидов в липких XbaI-концах. Белки удаляют фенольной экстракцией, ДНК осаждают этанолом и ресуспендируют в 5 мкл ТЕ8.

Для получения фрагмента ДНК с геном лизоцима проводят рестрикцию 10 мкг ДНК плазмиды pLysS (A.C.Y. Chang and S.N. Cohen. *J. Bacteriol.*, vol.134, pp. 1141, 1978) рестриктазой BamH1. С помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E.coli* достраивают три из четырех нуклеотидов в липких BamH1-концах. Фрагмент -BamH1-BamH1- с частично достроенными липкими концами размером 0,6 т.п.о. выделяют с помощью электрофореза сорбцией на бумагу DE81. Бумагу промывают, инкубируют 30 мин при 80°C в буфере 2 M ацетата натрия, 50 mM трис-HCl, pH 7,5, 10 mM ЭДТА. ДНК, перешедшую в раствор, удаляют с бумаги центрифугированием, к раствору добавляют 2 объема этанола. После инкубации при -20° C в течение часа осадок собирают центрифугированием и растворяют в 5 мкл буфера ТЕ8.

0,5 мкг фрагмента ДНК вектора pEX3 смешивают с 0,2 мкг ДНК, содержащей ген лизоцима бактериофага T4. Соединение фрагментов проводят с помощью 10 ед. ДНК-лигазы фага T4 в буфере: 30 mM трис-HCl, pH 7,2, 10 mM хлористого магния, 2 мг/мл желатины, 1 mM спермидина, 0,1%-меркаптоэтанола, 0,2 mM АТФ при 20°C в течение 2 часов.

Полученной смесью трансформируют клетки *E.coli* PLT90, содержащие clts857 репрессор. Для этого ночную культуру клеток разводят средой LB с 10 mM MgSO₄ в соотношении 1:100 и растят с аэрацией до плотности A550-0,3 ОЕ. После 15 мин охлаждения при 0 °C клетки собирают центрифугированием, суспендируют в 1/3 первоначального объема буфером 30 mM ацетата калия, pH 5,8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% глицерина, и оставляют на 30-60 мин на льду. Клетки собирают центрифугированием, ресуспендируют в 1/12,5 первоначального объема в буфере 10 mM MOPS, pH 6,8, содержащем 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% глицерина и инкубируют 15 мин на льду. К суспензии клеток добавляют лигированные фрагменты ДНК, инкубируют 40 мин при 0°C, затем 2 мин при 34°C, 2-3 мин при 0°C, разбавляют в 5 раз средой 2YT, растят 30 мин при 30°C и высевают на агаризованную среду 2YT с ампициллином (50 мг/мл).

Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды с геном лизоцима в нужной ориентации, отбирают с помощью анализа на способность к лизису после индукции синтеза белка. Экспрессию рекомбинантных белков

индуцируют повышением температуры до 42 °C. В клонах, продуцирующих лизоцим, после индукции белкового синтеза и последующего добавления хлороформа происходит лизис клеток. Из отобранных клонов стандартными способами выделяют плазмиду pEL5c. Векторная ДНК стабильна при хранении в 10 mM трис, pH 8,0, 1 mM ЭДТА при -20°C.

Пример 2. Использование вектора pEL5c для получения рекомбинантных белков в виде водонерастворимых агломератов.

Клетки PLT90, содержащие плазмиду pEL5c, инокулируют в 1 мл среды LB со 100 мкг/мл ампициллина и растят ночь при 30°C. Ночную культуру разводят в 2 мл этой же среды в соотношении 1:100 и растят с аэрацией до 0,2 ОЕ при 550 нм, затем повышают температуру до 42°C для индукции синтеза слитного белка и растят еще 2 часа. Затем добавляют хлороформ до 1% и инкубируют при 37°C еще час. Далее лизат центрифугируют, ресуспендируют осадок в 75 мкл буфера ТЕ8 и добавляют равный объем буфера для электрофореза (160 mM трис-HCl, pH 6,8, 20% глицерина, 4% додецилсульфата натрия, 4 mM ЭДТФ, 6%-меркаптоэтанола, 0,05% бромфенолового синего). Клеточные белки анализируются с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэмбли (U. K. Lamml. *Nature*, vol. 227, pp. 680-685, 1970). После окончания электрофореза белки в геле фиксируют и окрашивают кумасси ярко-голубым R-250.

Анализ полученных результатов показывает, что в результате действия лизоцима происходит разрушение оболочки бактерии и высвобождение водонерастворимых клеточных белков в среду, что проявляется в ослаблении минорных белковых полос. В контроле, в случае использования плазмиды pEX3, такого эффекта нет.

Таким образом, изобретение позволяет получать водонерастворимые агломераты рекомбинантных белков без использования дополнительных методов разрушения клеточных стенок.

Формула изобретения:

Вектор pEL5c, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК, размером 6,4 т.п.о. содержащий XbaI-XbaI фрагмент плазмидной ДНК бактериального вектора pEX3 размером 5,8 т.п.о. со слитным *cro-lacZ* геном, кодирующим белок под контролем промотора P_R бактериофага лямбда, полилинкер в 3'-конце *lacZ*-гена; BamH1-BamH1-фрагмент ДНК плазмиды pLysS с геном лизоцима бактериофага T4 размером 0,6 т. п. о. уникальные сайты рестрикции для клонирования ДНК на 3'-конце гена *LacZ*: Sma1, BamH1, Sal1, Pst1; оператор O_R и промотор P_R бактериофага лямбда; терминаторы транскрипции фага fd; генетический маркер устойчивость к ампициллину; спектр хозяев - бактерии *Escherichia coli*, с геном clts 857 бактериофага лямбда.