



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 233 879** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/12, 1/21, C 07 K**
14/61/(C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2002133932/13, 17.12.2002
(24) Дата начала действия патента: 17.12.2002
(46) Дата публикации: 10.08.2004
(56) Ссылки: US 5795745, 18.08.1998. RU 1387414 A1, 30.12.1994. RU 1248280 C, 09.02.1995. RU 2075509 C1, 20.03.1997.
(98) Адрес для переписки:
117871, ГСП-7, Москва В-437, ул.
Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, патентный
отдел

(72) Изобретатель: Габибов А.Г. (RU),
Пономаренко Н.А. (RU), Воробьев И.И.
(RU), Демин А.В. (RU), Мартыанов В.А.
(RU), Шустер А.М. (RU), Баирамашвили Д.И.
(RU), Мирошников А.И. (RU)
(73) Патентообладатель:
Институт биоорганической химии им.
академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова
РАН (RU),
Закрытое акционерное общество "Мастерклон"
(RU)

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК PES1-6, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД СОМАТОТРОПИНА, И ШТАММ ESCHERICHIA COLI BL 21(DE3)/PES1-6-ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО СОМАТОТРОПИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генной инженерии, и может быть использовано для получения рекомбинантного гормона роста человека. Рекомбинантная плазмидная ДНК pES1-6, кодирующая полипептид с последовательностью соматотропина, имеющей молекулярную массу 3,66 Мда (5949 п.о.); состоит из: NdeI/XhoI-фрагмента ДНК плазмиды pET22b(+), содержащего промотор и терминатор транскрипции T7-РНК-полимеразы, усилитель трансляции гена 10 фага T7, ген β -лактамазы, и NdeI/XhoI-фрагмента ДНК, содержащего последовательность искусственного гена рекомбинантного соматотропина;

содержащую: в качестве генетического маркера ген β -лактамазы, детерминирующей устойчивость трансформированных плазмидой pESI-6 клеток E. coli к ампициллину; уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, расположенные на следующем расстоянии вправо от сайта NdeI: XbaI - 38 п.о., HpaI - 1332 п.о., PstI - 4065 п.о., PvuI - 4190 п.о., XhoI - 5363 п.о. Получают штамм Escherichia coli BL21(DE3)/pESI-6, содержащий рекомбинантную плазмидную ДНК pESI-6 - продуцент рекомбинантного соматотропина. Изобретение позволяет получить рекомбинантный соматотропин с высоким выходом и по упрощенной технологии, 2 н.з.п. ф-лы, 2 ил.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 233 879** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/12, 1/21, C 07 K**
14/61/(C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002133932/13, 17.12.2002
(24) Effective date for property rights: 17.12.2002
(46) Date of publication: 10.08.2004
(98) Mail address:
117871, GSP-7, Moskva V-437, ul.
Miklukho-Maklaja, 16/10, IBKh RAN, patentnyj
otdel

(72) Inventor: Gabibov A.G. (RU),
Ponomarenko N.A. (RU), Vorob'ev I.I.
(RU), Demin A.V. (RU), Mart'janov V.A.
(RU), Shuster A.M. (RU), Bairamashvili D.I.
(RU), Miroshnikov A.I. (RU)
(73) Proprietor:
Institut bioorganicheskoy khimii im.
akademikov M.M.Shemjakina i
Ju.A.Ovchinnikova RAN (RU),
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Masterklon" (RU)

(54) RECOMBINANT PLASMID DNA PES1-6 ENCODING POLYPEPTIDE SOMATOTROPIN AND STRAIN
ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)/PES1-6 AS PRODUCER OF RECOMBINANT SOMATOTROPIN

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic
engineering, molecular biology.

SUBSTANCE: invention can be used for
preparing recombinant human growth hormone.
Recombinant plasmid DNA pES1-6 encoding
polypeptide with somatotropin amino acid
sequence with molecular mass 3.66 MDa (5949
pair bases) consists of: Nde I/Xho I DNA
fragment of plasmid pET22b(+) comprising
transcription promoter and terminator of T7
RNA-polymerase, translation enhancer of
phage T7 gene 10, β -lactamase gene and Nde
I/Xho I DNA fragment comprising the sequence
of artificial gene for recombinant
somatotropin comprising: as genetic
marker β -lactamase gene determining

resistance of E. coli cells transformed with
plasmid pSE1-6 to ampicillin; unique
recognition sites for site-specific
endonuclease restriction enzymes located at
the following distance to the right of site
Nde I : Xba I - 38 pair bases, Hpa I - 1332
pair bases, Pst I - 4065 pair bases, Pvu I -
4190 pair bases, Xho I - 5363 pair bases.
Invention provides preparing the strain
Escherichia coli BL21(DE3)/pES1-6 comprising
recombinant plasmid DNA pES1-6 as a producer
of recombinant somatotropin. Invention
provides preparing recombinant somatotropin
with high yield by the simplified technology.

EFFECT: improved preparing method,
valuable biological properties of plasmid DNA.

3 cl, 2 dwg, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генной и белковой инженерии, и может быть использовано для получения рекомбинантного соматотропина.

Соматотропин (синонимы: соматропин, гормон роста человека, соматотропный гормон, соматотропный гормон роста) относится к наиболее изученным гормонам гипофиза и принадлежит к белковому семейству, включающему гормон роста, пролактин, ХС. Соматотропин синтезируется в передней доле гипофиза в соматотрофах, которые составляют подкласс ацидофильных клеток гипофиза и являются наиболее многочисленной группой в этой железе. Соматотропин у всех видов млекопитающих представляет собой одиночный пептид с молекулярной массой около 22000. Несмотря на высокую степень гомологии последовательностей гормонов роста различных млекопитающих, в клетках человека активен только собственный гормон роста человека или гормон роста высших приматов. Молекула соматотропина состоит из 191 аминокислотного остатка и содержит два внутримолекулярных дисульфидных мостика. Соматотропин - анаболический гормон, который необходим для постнатального роста, нормализации углеводного, липидного, азотного и минерального обмена, регенерации тканей и выживанию клеток. Ростовые эффекты соматотропина опосредуются главным образом инсулиноподобным фактором роста 1 (ИФР-1), ген которого относится к семейству инсулиноподобных генов. Таким образом, соматотропин стимулирует секрецию ИФР-1, дифференцировку и пролиферацию миобластов, усвоение аминокислот и синтез белка в мышцах и других тканях [Roskam W.G., Rougeon F.// Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. Nucl.Acids Res., 1979, v. 7, p. 305-320.; Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D., Goodman H.M.// Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. Science, 1979, v. 205, No 4406, p. 602-607].

Соматотропин, как и другие гормоны, осуществляет свое действие через связывание со специфическим рецептором [Herington A.C.// Identification and characterization of growth hormone receptors on isolated rat adipocytes. J Recept Res 1981-82; 2(4):299-316].

Лекарственные формы соматотропина (синонимы - нутропин или протропин (Genentech), нордитропин (Novo Nordisk), генотропин (Pharmacia Upjohn), гуматроп (Eli Lilly), саизен или серостим (Serono)) широко используются в медицине для терапии дефицитности гормона роста и синдрома Тернера.

Известен способ получения соматотропина, состоящий в его выделении из тканей гипофиза человека [Simionescu L., Dimitriu V., Zamfir-Grigorescu D., Aman E., Terbancea M.// The simultaneous isolation of human pituitary hormones. I. Human growth hormone. Endocrinologie 1982 Oct.-Dec.; 20(4):273-83]. Недостатками способа являются сложность с получением исходного материала и риск заражения инфекцией [Rappaport E.B.// Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology, 1987,

Sep.; 37(9):1520-2].

В настоящее время известно два основных способа получения рекомбинантного соматотропина.

5 Способ, основанный на получении рекомбинантного соматотропина в трансформированных клетках мыши линии C 127 [Carter M.J., Facklam T.J., Long P.C., Scotland R.A.// Are continuous cell lines safe as substrates for human drugs and biologies? A case study with human growth hormone. Dev Biol Stand 1989; 70:101-7]. При 10 таком подходе удается получить гормон роста человека в правильной конформации с хорошей физиологической активностью. Недостатками этого способа являются 15 чрезвычайно низкий выход и длительное время культивации продуцирующих клеток.

А также способ получения соматотропина, включающий экспрессию в клетках Escherichia coli, заключающийся в достаточно быстром биосинтезе клетками бактерий 20 рекомбинантного соматотропина в виде нерастворимых "телец включения" [Olson K.C., Fenno J., Lin N., Harkins R.N., Snider C., Kohr W.H., Ross M.J., Fodge D., Prender G., Stebbing N.// Purified human growth hormone from E. coli is biologically active. Nature 1981 Oct. 1; 293(5831):408-11]. При 25 использовании данного общего способа получения соматотропина уровень биосинтеза целевого белка может колебаться в широких пределах.

Наиболее близким по технической 30 сущности к предлагаемому изобретению является продуцент соматотропина на основе плазмиды pHGH 107 (патент США №5795745, МКИ С 12 В 21/02), несущей под контролем двух последовательных Lac-промоторов ген соматотропина, состоящий из синтетической 35 части (соответствующей аминокислотам 1-24) и фрагмента природного гена (соответствующего аминокислотам 25-191). Использование Lac-промоторов, а также почти полностью (на 88%) природной кДНК, 40 включающей редко встречающиеся в генах Escherichia coli (минорные) кодоны, приводит к существенному снижению уровня биосинтеза белка относительно теоретически 45 возможного.

Изобретение решает задачу 45 конструирования плазмиды, детерминирующей синтез рекомбинантного белка, и создания высокопродуктивного бактериального штамма-продуцента, позволяющего получать рекомбинантный 50 соматотропин с высоким выходом и по упрощенной технологии.

Поставленная задача решается за счет конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pES1-6, кодирующей полипептид с 55 последовательностью соматотропина, имеющей молекулярную массу 3,66 Мда (5949 п.о.); состоящей из: NdeI/XhoI-фрагмента ДНК плазмиды pET 22b(+), содержащего промотор и терминатор транскрипции T7-РНК-полимеразы, усилитель трансляции гена 10 фага T7, ген β-лактамазы, 60 и NdeI/XhoI-фрагмента ДНК, содержащего последовательность искусственного гена рекомбинантного соматотропина; содержащую: в качестве генетического маркера ген β-лактамазы, детерминирующей 65 устойчивость трансформированных плазмидой pES1-6 клеток E.coli к

ампициллину; уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, расположенные на следующем расстоянии вправо от сайта NdeI: XbaI - 38 п.о., HpaI - 1332 п.о., PstI - 4065 п.о., PvuI - 4190 п.о., XhoI - 5363 п.о., а также штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/pES1-6, содержащего рекомбинантную плазмидную ДНК pES1-6 - продуцент рекомбинантного соматотропина, обеспечивающего синтез рекомбинантного соматотропина в количестве 60-70% от суммарного содержания белка клеток.

Преимущества предлагаемого изобретения заключаются, во-первых, в использовании при химико-ферментативном синтезе гена соматотропина максимально широкого набора кодонов, являющихся оптимальными для продукции белка в *Escherichia coli*, расположение которых в синтетическом гене устраняет возможность образования на синтезируемой мРНК протяженных "шпилек", потенциально ингибирующих трансляцию. На фиг. 1 приведена аминокислотная последовательность соматотропина и соответствующая ей нуклеотидная последовательность гена: верхняя строка - природная кДНК соматотропина, нижняя строка - синтезированный искусственный ген. Во-вторых, - применение для биосинтеза рекомбинантного белка оптимальных регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию: T7-lac промотора для предотвращения базальной экспрессии гена до момента начала индукции и высокого уровня транскрипции соответствующей мРНК при индукции, высокоэффективного терминатора транскрипции T7 и блока различных стоп-кодонов, исключающих биосинтез удлиненных вариантов рекомбинантного соматотропина.

Преимущество предлагаемого штамма *E.coli* заключается в использовании бактерий с фенотипом Lon OmpT, что исключает возможность протеолитического расщепления синтезируемого de novo рекомбинантного соматотропина и загрязнения выделяемого белка наиболее активными протеазами *E.coli*.

Конструирование нового гена, кодирующего соматотропин человека, осуществляют на основе плазмиды pET22b(+). Искусственный ген, кодирующий соматотропин, фланкированный сайтами рестриктаз NdeI и XhoI, получают химико-ферментативным синтезом набора олигонуклеотидных фрагментов с последующей их сборкой и амплификации при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Перед лигированием для генерации липких концов амплификат и векторную плазмиду обрабатывают рестриктазами NdeI и XhoI. Лигазную смесь используют для трансформации компетентных клеток *E.coli* DH5 α . Отбор положительных клонов проводят при помощи ПЦР с использованием специфических праймеров, с последующим рестриктным анализом выделенной плазмидной ДНК рестриктазами NaeI и XhoI. Структуру гена, кодирующего рекомбинантный соматотропин, определяют секвенированием по методу Сенгера.

Она должна полностью соответствовать нуклеотидной последовательности исходного искусственного гена соматотропина (фиг.1).

Рекомбинантная плазмидная ДНК pES1-6,

кодирующая полипептид соматотропин, характеризуется следующими признаками:

- имеет молекулярную массу 3,66 МДа;
- кодирует полипептид соматотропин;
- состоит из: NdeI/XhoI-фрагмента ДНК плазмиды pET22b(+), содержащей промотор и терминатор транскрипции T7-РНК-полимеразы, усилитель трансляции гена 10 фага T7, ген β -лактамазы и NdeI/XhoI-фрагмента ДНК, включающего искусственный ген соматотропина;

- имеет уникальную совокупность признаков: промотор и терминатор транскрипции РНК-полимеразы бактериофага T7, усилитель трансляции гена 10 бактериофага T7; искусственный ген, кодирующий соматотропин; ген β -лактамазы, детерминирующей устойчивость трансформированных плазмидой pES1-6 клеток *E.coli* к ампициллину; уникальные сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз, расположенные на следующем расстоянии вправо от сайта NdeI:XhoI - 38 п.о., HpaI - 1332 п.о., PstI - 4065 п.о., PvuI - 4190 п.о., XhoI - 5363 п.о.

Для получения штамма-продуцента рекомбинантного соматотропина плазмидную ДНК pES1-6 используют для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) и проводят отбор клонов, сохраняющих уровень биосинтеза рекомбинантного полипептида не ниже 60-70% от суммарного клеточного белка в течение по крайней мере шести последовательных пассирований. Для этого клоны трансформированных плазмидой pES1-6 клеток *E.coli* BL21(DE3) выращивают в богатой среде (YT-, LB-бульон и др.) с добавлением ампициллина до 100 мкг/мл и раствора глюкозы до 1% в течение 12-14 часов, инокулируют новую порцию питательной среды в соотношении 1:100, растят культуру до достижения оптической плотности 1 О.Е., индуцируют изопропилтио- β -D-галактозидом и растят еще 3-6 часов. Получение из клеток продуцента рекомбинантного соматотропина включает следующие стадии: деление бактерий от культуральной среды, их разрушение одним из обычно применяемых способов; отмывку буферными растворами телец включения от водорастворимых компонентов клетки; солюбилизацию и восстановление целевого белка, его рефолдинг и окончательную очистку.

Полученный штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21(DE3)/pES1-6 характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки: клетки палочковидной формы, граммотрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки: при росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, мутные, блестящие серые, край ровный. При росте на жидких средах (на минимальной среде с глюкозой или YT-бульоне) образуют интенсивную ровную муть.

Физико-биологические признаки: клетки растут при температуре от 4°C до 40°C при оптimumе pH от 6,8 до 7,5. В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной форме, так и органические соединения в виде пептона, триптона, дрожжевого экстракта, аминокислот

и т.д. В качестве источника углерода используют аминокислоты, глицерин, углеводы.

Устойчивость к антибиотикам: клетки проявляют устойчивость к ампициллину (до 500 мкг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β -лактамазы (bla).

Преимущество предлагаемого штамма-продуцента заключается в использовании бактерий с фенотипом Lon OmpT, что исключает возможность протеолитического расщепления синтезируемого de novo рекомбинантного гормона роста и загрязнения выделяемого белка наиболее активными протеазами E.coli.

Клетки E.coli BL21(DE3)pES1-6 являются суперпродуцентами. При индукции изопропилтио- β -D-галактозидом происходит эффективный биосинтез рекомбинантного соматотропина, который накапливается в клетках в количестве более 60% суммарного белка бактерий.

На фиг.1 представлена нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность NdeI/XhoI-фрагмента плазмиды pES1-6; на фиг.2 - физическая карта плазмиды pES1-6.

Изобретение иллюстрируют примеры.

Пример 1.

Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК pES1-6.

Нуклеотидную последовательность, соответствующую гену соматотропина, получают химико-ферментативным синтезом. Для этого теоретически рассчитанную последовательность ДНК разбивают на перекрывающиеся фрагменты размером около 50 п.о. Химический синтез олигонуклеотидов, соответствующих этим фрагментам, выполняют твердофазным фосфоамидитным методом при помощи, например, ДНК-синтезатора ASM-102U (БИОССЕТ, Новосибирск) с наращиванием олигонуклеотидной цепи в направлении от 3'-конца к 5'-концу с помощью защищенных фосфамидитов - 5'-диметокситрилитил-N-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-O-(β -

-цианэтил-диизопропиламино)-фосфитов, активированных тетразолом. Синтез проводят в масштабе 0,5-0,7 мкмоль, используя в качестве носителя пористое стекло (размер пор 500 А), к которому через 3'-сукцинатную связь присоединяют первое нуклеозидное звено (нагрузка 20-30 мкмоль/г). Полученные олигонуклеотиды подвергают 5'-концевому фосфорилированию с использованием T4 полинуклеотидкиназы (Fermentas, Литва). Для этого олигонуклеотиды в количестве 20 пмоль смешивают с ферментом в количестве 10 ед. в буферном растворе, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,6 при 25°C), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреита, 1 мМ спермидина, 0,1 мМ АТФ и 0,1 мМ ЭДТА. Реакцию ведут 30 минут, полинуклеотид киназу инактивируют нагреванием до 65°C в течение 10 мин.

Фосфорилированные олигонуклеотиды смешивают в эквимольном соотношении в 50 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl, pH 7,56, 10 мМ MgCl₂, 0,2 мМ rATP, 10 мМ дитиотреита, прогревают до 65°C, медленно охлаждают до 37°C в течение часа и добавляют 10 ед.ак. T4-ДНК-лигазы. Реакцию лигирования ДНК проводят 4 ч при 37°C. 0,1

мкл полученного раствора используют в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы Pfu и специфических праймеров

5'ATA CATATG

TTCCCGACCATCCCACTGTC3' и

5'CCG CTCGAG

TCATTAGAAGCCACAGCTGCCC3'.

Проводят 25 циклов амплификации (95°C, 20 с; 62°C, 40 с; 72°C, 60 с) для синтеза полноразмерного фрагмента ДНК, содержащего последовательность гена соматотропина, фланкированного сайтами узнавания рестриктаз NdeI и XhoI. Продукт амплификации гидролизуют рестриктазами NdeI и XhoI, очищают электрофорезом в 5% акриламидном геле, полосу ДНК величиной около 600 п.о. выделяют из геля методом электроэлюции и осаждают ДНК из раствора этанолом.

Для приготовления вектора ДНК плазмиды pET-22b(+) (3 мкг, 1 пмоль) обрабатывают в 40 мкл буфера Y (33 мМ трис-ацетат, pH 7,9, 10 мМ Mg-ацетат, 66 мМ K-ацетат 1, 0,5 мМ DTT, 0,1 мг/мл BSA) рестриктазой NdeI (10 ед. акт.), осаждают ДНК этанолом, растворяют в 40 мкл буфера R (10 мМ трис-HCl, pH 8,5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 0,1 мг/мл BSA) и обрабатывают рестриктазой XhoI (10 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Полученный фрагмент ДНК величиной 5,4 т.п.о. после электрофоретического разделения в 1% агарозном геле выделяют из геля методом электроэлюции и осаждают ДНК из раствора этанолом.

1 мкг полученного векторного фрагмента лигируют с 2 пмоль NdeI/XhoI-фрагмента размером 600 п.о., содержащего синтетический ген рекомбинантного соматотропина, в 10 мкл буфера (20 мМ трис-HCl, pH 7,56, 10 мМ MgCl₂, 0,2 мМ rATP, 10 мМ дитиотреита) с помощью 10 ед. акт. T4-ДНК-лигазы в течение 12 ч при 10°C.

1 мкл полученной лигазной смеси используют для электротрансформации компетентных клеток E.coli BL21(DE3), которую проводят, например, при помощи аппарата для электротрансформации ВТХ 600 при зазоре между пластинами электропорационной кюветы 1 мм и напряжении разряда 1,4 кВ. После трансформации суспензию бактерий смешивают с питательной средой SOC, растят 1 час на +37°C и высевают на чашки Петри с LB-агаром, содержащим 50 мкг/мл ампициллина.

Первичный отбор клонов, содержащих нужную плазмиду, проводят методом "ПЦР с клонов" с использованием специфических праймеров

5'ATA CATATG

TTCCCGACCATCCCACTGTC3' и

5'CCG CTCGAG

TCATTAGAAGCCACAGCTGCCC3'.

Проводят 25 циклов амплификации (95°C, 20 с; 62°C, 40 с; 72°C, 60 с), с последующим электрофоретическим анализом ПЦР продуктов в 1% агарозном геле на наличие ПЦР-продукта длиной около 600 п.н. Отобранные клоны используют для подраста в жидкой среде и выделения плазмидной ДНК плазмиды, которую анализируют на наличие

вставки с помощью эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI с последующим разделением продуктов гидролиза в 5% полиакриламидном геле. Окончательное строение плазмид, содержащих NdeI/XhoI-фрагмент около 600 п.о., подтверждают определением нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сенгеру. По данным секвенирования отбирают ту плазмиду, нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательности NdeI/XhoI-фрагмента которой полностью идентичны первоначально запланированной (фиг.1). Проводят трансформацию клеток E.coli BL21(DE3) выбранной плазмидой, как описано выше, петлей переносят 5-10 колоний в 5 мл жидкой среды 2xYT, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, в течение 2 ч на качалке со скоростью вращения 190 об/мин до мутности A_{550} 0,7-0,8, отбирают аликвоту культуры для последующего анализа, прибавляют индуктор - изопропилтио-β-D-галактозид до концентрации 0,2 мМ и продолжают рост еще 2 ч. Равные аликвоты суспензии клеток, отобранных до внесения индуктора и после завершения роста центрифугируют, отделяют супернатант и анализируют осадок клеток электрофорезом в ПААГ, как описано в примере 2. Появление отчетливо видимой полосы белка в районе 20 КДа в образце пробы, отобранной после индукции, свидетельствует о способности штамма синтезировать рекомбинантный соматотропин при индукции IPTG и полностью подтверждает корректность сборки плазмиды.

Пример 2.

Получение штамма-продуцента E.coli BL21(DE3)/pes1-6 с рекомбинантным гормоном роста и определение его продуктивности.

Штамм-продуцент E.coli BL21(DE3)/pES1-6 получают трансформацией компетентных клеток E.coli BL21(DE3) плазмидой pES1-6, как описано в примере 1.

Штамм продуцента E.coli BL21(DE3)/pES1-6 выращивают при 37°C в 100 мл YT-бульона (pH 7,0) с 50 мкг/мл ампициллина в течение 2 ч на качалке со

скоростью вращения 190 об/мин до мутности A_{550} 0,7-0,8, прибавляют изопропилтио-β-D-галактозид до концентрации 0,2 мМ и продолжают процесс еще 6 ч или продолжают выращивание в отсутствие индуктора в течение 6 ч. Каждый час отбирают пробу по 2 мл, определяют A_{550} и количество культуры, соответствующее 1 мл с A_{550} 1,0, центрифугируют 5 мин при 6000 об/мин. Осажденные клетки в 100 мкл лизирующего буфера с красителем бромфеноловым синим обрабатывают 20 с ультразвуком, нагревают 3 мин при 100°C и пробы по 1 мкл используют для электрофореза в 15% SDS-ПААГ. Гель прокрашивают кумасси R-250 по стандартной методике и сканируют для определения относительного количества белка в полосе целевого белка. По данным сканирования содержание рекомбинантного соматотропина составляет 60-70% от всех клеточных белков.

Формула изобретения:

1. Рекомбинантная плазмидная ДНК pES1-6, кодирующая полипептид с последовательностью гормона роста человека соматотропина, имеющая молекулярную массу 3,66 Мда (5949 п.о.); состоящая из NdeI/XhoI-фрагмента ДНК плазмиды pET22b(+), содержащего промотор и терминатор транскрипции T7-РНК-полимеразы, усилитель трансляции гена 10 фага T7, NdeI/XhoI-фрагмент ДНК, содержащий последовательность искусственного гена рекомбинантного соматотропина, содержащая в качестве генетического маркера ген β-лактамазы, детерминирующей устойчивость трансформированных плазмидой pES1-6 клеток E.coli к ампициллину, уникальные сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, расположенные на следующем расстоянии вправо от сайта NdeI:XbaI - 38 п.о., HpaI - 1332 п.о., PstI - 4065 п.о., PvuI - 4190 п.о., XhoI - 5363 п.о.

2. Штамм Escherichia coli BL21 (DE3)/pES1-6, содержащий рекомбинантную плазмидную ДНК pES1-6, - продуцент рекомбинантного соматотропина.

RU 2233879 C1

RU 2233879 C1

pГРЧ M
 ГРЧ
 pГРЧ atacatg
 NdeI
 F P T I P L S R L F D N A M
 L R A H R L
 ttc cca acc att ccc tta tcc agg ctt ttt gac aac gct
 atg ctc cgc gcc cat cgt ctg
 ttc ccg acc atc cca ctg tct cgt ctc ttc gac aac gct
 atg ctg cgt gct cac cgt ctg
 H Q L A F D T Y Q E F E E A
 Y I P K E Q
 cac cag ctg gcc ttt gac acc tac cag gag ttt gaa gaa
 gcc tat atc cca aag gaa cag
 cat cag ctg gca ttc gat acc tac cag gag ttc gaa gag
 gct tac atc ccg aaa gaa cag
 K Y S F L Q N P Q T S L C F
 S E S I P T
 aag tat tca ttc ctg cag aac ccc cag acc tcc ctc tgt
 ttc tca gag tct att ccg aca
 aag tac tcc ttc ctc cag aac ccg caa acc tct ctg tgt
 ttc tct gaa tcg atc ccg act
 P S N R E E T Q Q K S N L E
 L L R I S L
 ccc tcc aac agg gag gaa aca caa cag aaa tcc aac cta
 gag ctg ctc cgc atc tcc ctg
 cca tcc aac cgt gag gaa acc caa cag aaa tcc aac ctg
 gaa ctg ctc cgc atc tcc ctg
 L L I Q S W L E P V Q F L R
 S V F A N S
 ctg ctc atc cag tcg tgg ctg gag ccc gtg cag ttc ctc
 agg agt gtc ttc gcc aac agc
 ctc ctg atc cag tct tgg ctg gag ccg gta cag ttc ctc
 cgt tct gta ttc gct aac agc
 L V Y G A S D S N V Y D L L
 K D L E E G
 ctg gtg tac ggc gcc tct gac agc aac gtc tat gac ctc
 cta aag gac cta gag gaa ggc
 ctg gtg tac ggc gct tct gac tcc aac gtt tat gac ctc
 ctg aaa gat ctg gaa gag ggt
 I Q T L M G R L E D G S P R
 T G Q I F K
 atc caa acg ctg atg ggg agg ctg gaa gat ggc agc ccc
 cgg act ggg cag atc ttc aag

Аминокислотная и соответствующая ей нуклеотидная последовательности рекомбинантного соматотропина (pГРЧ) и соответствующий участок кДНК природного гормона роста человека (ГРЧ). Последовательность кДНК природного гормона роста человека взята из базы данных GenBank, номер записи - G1:13027812.

Фиг. 1

atc cag act ctg atg ggt cgt ctg gaa gat ggt tct ccg
cgc act ggt caa atc ttc aaa

Q T Y S K F D T N S H N D D
A L L K N Y

cag acc tac agc aag ttc gac aca aac tca cac aac gat
gac gca cta ctc aag aac tac

cag acc tac tct aag ttc gac acc aac tcc cac aac gat
gac gca ctg ctc aag aac tac

G L L Y C F R K D M D K V E
T F L R I V

ggg ctg ctc tac tgc ttc agg aag gac atg gac aag gtc
gag aca ttc ctg cgc atc gtg

ggt ctg ctc tac tgc ttc cgt aaa gac atg gat aag gtt
gaa acc ttc ctg cgc atc gtt

Q C R S V E G S C G F"

cag tgc cgc tct gtg gag ggc agc tgt ggc ttc tag

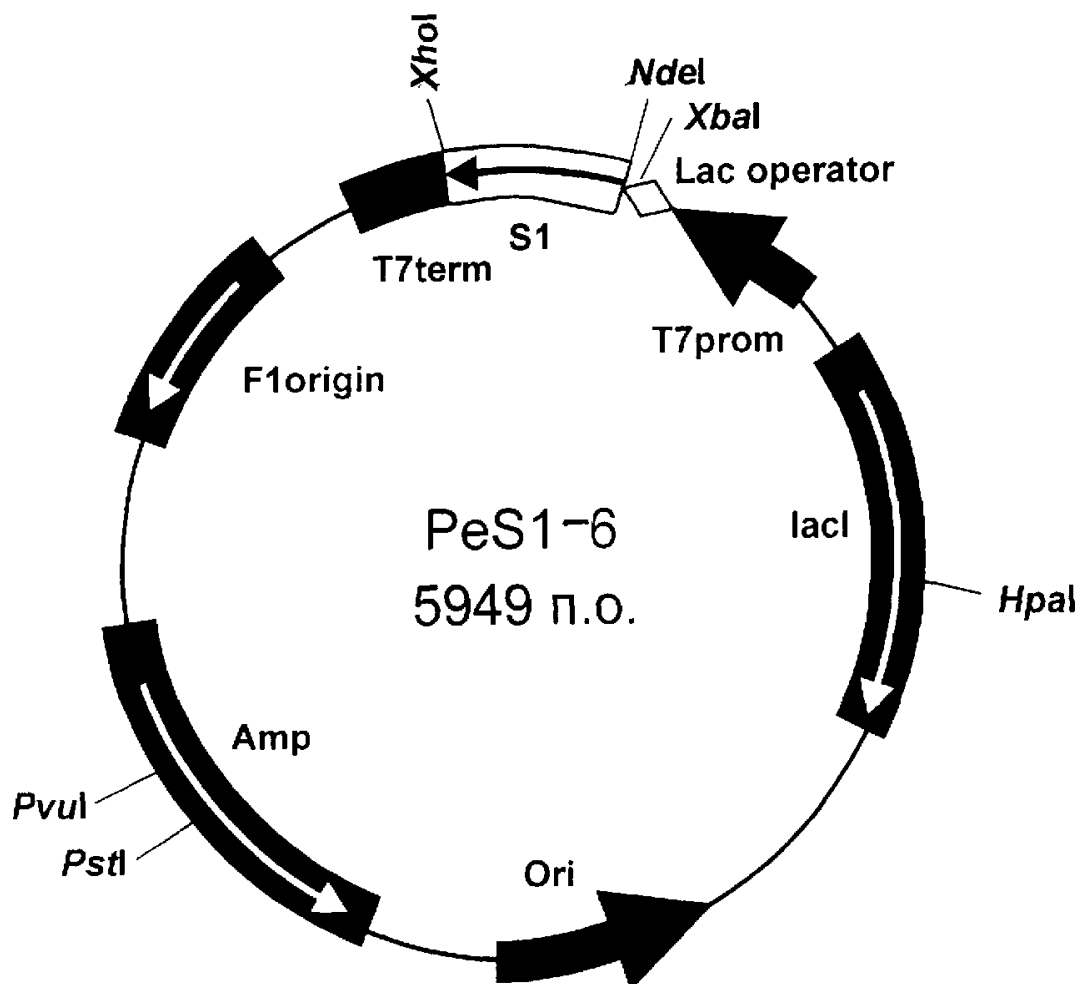
cag tgt cgt tct gtg gag ggc tcc tgt ggc ttc taa tga

ctcgagctatat

*Xho*I

Аминокислотная и соответствующая ей нуклеотидная последовательности рекомбинантного соматотропина (рГРЧ) и соответствующий участок кДНК природного гормона роста человека (ГРЧ). Последовательность кДНК природного гормона роста человека взята из базы данных GenBank, номер записи - GI:13027812.

Фиг. 1 (Продолжение)



Физическая карта рекомбинантной плазмиды pES1#6. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Ori - участок инициации репликации плазмиды; f1 origin - участок инициации репликации бактериофага f1; Amp - ген устойчивости к ампициллину; lac I - ген репрессора лактозного оперона; T7prom - промотор транскрипции, T7term - терминатор транскрипции, Lac operator - оператор лактозного оперона E. Coli; S1 - ген рекомбинантного соматотропина человека.

Фиг. 2