



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 705 302** ⁽¹³⁾ **A1**

(51) **իէ**

ԱՐՄՈՒԿԱՆՈՒՄՈՒՅԵՆ ԷՊԻԾՈՒՄ
ՆԱԾԱՆԵՐԻ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ ԵՆԴՈՒՄ

(12) ԻՆՎԵՆՏԱՐԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ ԵՐ ԳՈՐԾՈՒՄԻՆ ԴՆՆԱԿԱՆԱԿՆԵՐՈՒՄՈՒՅԵՆ ԴՆՆՈՒՄ

(21), (22) Ընթացիկ: **4618624, 22.12.1988**

(46) Կարգավիճակ: **15.01.1992**

(56) Նկատի առնելով: **Իսահ Ա.Ի. - Ա.Է. Ծանրագործ է ծանրագործ. լավագույն. լավագույն. / Մաճահ. Ծանրագործ է ծանրագործ. -/լ.թ. 1987, հ.216. Pratt et al. - Nucl. Acid. Res., , v. 9, p. 4459.**

(98) Կարգավիճակի ծանուցում: **11 142292 ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԻՄ.**

(71) Ընթացիկ: **ԷՆՆՈՒՄՈՒՅԵՆ ՆԱԾԱՆԵՐԻ ԴՆՆՈՒՄ**

(72) Երևանում: **ԱՄՆԱԿԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ, ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ, ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ 11 142292 ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԻՄ., Լ/Պ "Ա" 1-4011 142292 ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԻՄ., ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ 11 142292 ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԻՄ., ԻՍՎԵՆՏԱՐԱՆ ԵՐԱՅՈՒՆՈՒՅԵՆ 43-1-10**

(54) Ներդրումը ծանրագործական գործընթացի մասին: **Գործընթացի մասին: Կարգավիճակի ծանուցում/Ծանրագործ է ծանրագործ**

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 705 302** ⁽¹³⁾ **A1**

(51) Int. Cl.

STATE COMMITTEE
FOR INVENTIONS AND DISCOVERIES

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(71) Applicant:
INSTITUT BELKA AN SSSR

(72) Inventor: **BARANOV VLADIMIR IVANOVICH,
MOROZOV IGOR YUREVICH, SPIRIN ALEKSANDR
SERGEEVICH**

(54) **METHOD OF PREPARATIVE GENES EXPRESSION IN THE CELL-FREE SYSTEM OF COUPLED
TRANSCRIPTION/TRANSLATION**

(57)
Èçíáðáðáíèá ìðííñèòñ è ìíèáéóè ðííé áéíèíáèè è áéíðáðííèíáèè è ìíæáð áúòú èñííèuçíááí áè ìðáíàðàðèáííé ýéñíðáñíèè ááííá èáè á íáó-íúð, òàè è á ìðèèèááíúð òàè ò. Õáèùþ èçíáðáðáíè áè áòñ ìáúðáíèá áúòíáà ìðíáóéòà ýéñíðáñíèè ááíá á áèáá ìáíðèáá èèè ááèèèà çà ñ-áð óááèè-áíè ñðíèà ðááíòú ááñèèáðí-ííé ñèñðáíú ñíð æáíííé òðáíñèðèíòèè/òðáíñè òèè. Ñíííá ñíòúáñðáè þò á ááñèèáðí-ííé ñèñðáíá íáíðáðúáííáí ááéñðáè , á éíðíðíé èñííèuçóþò áíáèèáðí-íóþ ñèñðáíó ñíð æáíííé òðáíñèðèíòèè/òðáíñè òèè; ááíáðè-áííèèè ìàðáðèáè ìíááþò á ñèñðáíó á áèáá ìíèáéóè ÁÍË; íáííáðáíáíí ñ íáíðáðúáíúí óááèáíèáí ìðíáóéòá òðáíñè òèè èç ñèñðáíú

óáá- è þò ìðíáóéòú òðáíñèðèíòèè; á ðááèèèíííé ñíáñè íáíðáðúáíí áíñíðáíááèèááþò èñðíáíúá éííðáíððáðèè ìèçéííèá- éóè ðíúð ááúáñòá èáè áííáðàðà òðáíñè òèè, òàè è áííáðàðà òðáíñèðèíòèè. Áíçííæíá ìðáíýðàðèáíá ýéñíðáñíè ìðáéòè-áñèè èþáúð ááííá á áèáá ìíèáéóè ÁÍË. Ñíííá ìíæáð ñèóæèòú ááæíúí áíííèíáíèáí, á á íáéíðíðúð ñèó-à ò è áèúðáðíáðèáíé ááíííèíæáíðíúí ìáðíááí. Ñíííá ìá òðááóáð ñíáðèáèúííé ìáðáíðèè ìàððè-íúð ÐÍË. +ðí çíá-èòáèúíí óíðíúááò è óááðááè áò ááí á ñðááíáíèè ñ èçááñðíúí ñíííáíí ìðáíàðàðèáííáí ñèíðáçà ìáíðèáíá è ááèèá á ááñ èèáðí-íúð ñèñðáíáð òðáíñè òèè íáíðáðúáííáí ááéñðáè . 1 èè. "

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1

A 1 1 7 0 5 3 0 2 A 1



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

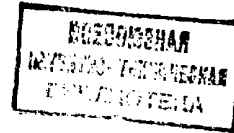
(19) SU (11) 1705302 A1

(51)5 C 07 K 1/02, C 12 P 21/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

- (21) 4618624/13
(22) 22.12.88
(46) 15.01.92. Бюл. № 2
(71) Институт белка АН СССР
(72) В.И.Баранов, И.Ю.Морозов и А.С.Спирин
(53) 575.224.2 (088.8)
(56) Прэтт Д.М. - В кн.: Транскрипция и трансляция. Методы. Пер. с англ. / под ред. Хеймса и Хиггинса. - М.:Мир, 1987, с.216. Pratt et al. - Nucl. Acid. Res., 1981, v. 9, p. 4459.
(54) СПОСОБ ПРЕПАРАТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ СОПРЯЖЕННОЙ ТРАНСКРИПЦИИ/ТРАНСЛЯЦИИ
(57) Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии и может быть использовано для препаративной экспрессии генов как в научных, так и в прикладных целях. Целью изобретения является повышение выхода продукта экспрессии гена в виде пептида или белка за счет увеличения срока работы бесклеточной системы сопря-

2

женной транскрипции/трансляции. Способ осуществляют в бесклеточной системе непрерывного действия, в которой используют бесклеточную систему сопряженной транскрипции/трансляции; генетический материал подают в систему в виде молекул ДНК; одновременно с непрерывным удалением продуктов трансляции из системы удаляют продукты транскрипции; в реакционной смеси непрерывно восстанавливают исходные концентрации низкомолекулярных веществ как аппарата трансляции, так и аппарата транскрипции. Возможна препаративная экспрессия практически любых генов в виде молекул ДНК. Способ может служить важным дополнением, а в некоторых случаях и альтернативой генноинженерным методам. Способ не требует специальной наработки матричных РНК, что значительно упрощает и удешевляет его в сравнении с известным способом препаративного синтеза пептидов и белков в бесклеточных системах трансляции непрерывного действия. 1 ил.

Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии, а именно к способам препаративной экспрессии генов *in vitro* с использованием бесклеточных систем сопряженной транскрипции/трансляции. Преимущественной областью использования является препаративный синтез биологически активных пептидов и белков для научных и прикладных целей.

Целью изобретения является повышение выхода продукта экспрессии гена в виде пептида или белка за счет увеличения срока

работы бесклеточной системы сопряженной транскрипции/трансляции.

В бесклеточной системе сопряженной транскрипции/трансляции с использованием генов в виде молекул ДНК осуществляют непрерывное удаление из реакционной смеси синтезированного продукта и низкомолекулярных продуктов функционирования систем транскрипции и трансляции в виде AMP, ADP, GDP, CDP, UDP, фосфатов и пирофосфатов, непрерывное восстановление концентрации расходуемых низкомоле-

(19) SU (11) 1705302 A1

SU 1705302 A1

SU 1705302 A1

ἀεαᾶ ἀιέϊέεηέϊο, ἈΟΘ. GTP ὀαέ ἐ
 ἡέηὸαῖῦ ὀαῖηέδῆϊοέε ἁ ἀεαᾶ ἈΟΘ. GTP,
 CTP, UTP. δᾶᾶᾶῖᾶδᾶὀεῖ ἈΟΘ, GTP. CTP, UTP
 ἐç ἰᾶδᾶçὀῦεῖῖ ἈΜΡ, ΑDΡ. GDP, CDP, UDP, ἡ
 ἰῖἡᾶᾶὀῦεῖ ἁῖçᾶδᾶῖῖ δᾶᾶᾶῖᾶδῆδῆᾶᾶῖῖῖ ἈΟΘ,
 GTP, CTP, UTP ἁ ἡέηὸαῖῖ ἡῖῖ ᾶᾶῖῖῖ
 ὀδᾶῖἡέδῆϊοέε/ὀδᾶῖἡῖ ὀεε.

S
 X
 ἡ, ὀ ῖ
 80



№ SU (11) 1705302 A1

1915 5.07.81/02, 5.12.81/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
 ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И УПРОДОЖИ
 ПРИ КНД СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ
 К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-5-

(21) 4618624/13
 (22) 22.12.80
 (43) 15.01.82, Бюл. № 2
 (71) Институт Белка АН СССР
 (72) В.И.Бранов, И.Ю.Морозов и А.С.Спи-
 ден
 (53) 675.224.2 (888.8)
 (56) Пратт Д.М. — В кн.: Транскрипция и
 трансляция. Методы. Пер. с англ. / под ред.
 Хеймса и Хиггинса. — М.: Мир, 1987. с. 216.
 Пратт ет. ал. — Уош. Акад. Яез., 1981, и. 9,
 р. 4459.
 (54) СПОСОБ ПРЕПАРИРОВОЙ ЭКСПРЕС-
 СИИ ГЕНОВ В БЕСКЕЛЕТНОЙ СИСТЕМЕ
 СОПРЯЖЕННОЙ ТРАНСКРИП-
 ЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ
 (57) Изобретение относится к молекулярной
 биологии и биотехнологии и может быть ис-
 пользовано для препазированной экспрессии
 генов как в научных, так и в прикладных
 целях. Целью изобретения является повыше-
 ние выхода продукта экспрессии гена в виде
 пептида или белка за счет увеличения срока

работы бесклеточной системы сопряженной
 транскрипции/трансляции. Способ
 осуществляется в бесклеточной системе не-
 прерывного действия, в которой исползу-
 ют бесклеточную систему сопряженной
 транскрипции/трансляции: генетический
 материал подает в систему в виде молекулы
 ДНК, одновременно с непрерывным удале-
 нием продуктов трансляции из системы уда-
 лают продукты транскрипции; в
 реакционной смеси непрерывно восстано-
 вляют исходные концентрации нуклеоти-
 цидов, аминокислот, энергии, как в аппарате
 трансляции, так и аппарата транскрипции.
 Возможны пролонгированные экспрессии прак-
 тически любых генов в виде мРНК, ДНК.
 Способ может служить важным дополнени-
 ем, а в некоторых случаях и альтернативой
 генноинженерным методам. Способ не тре-
 бует специальной обработки матричных
 РНК, что значительно упрощает и удешев-
 ляет его в сравнении с известным способом
 пролонгированного синтеза пептидов и белков
 в бесклеточных системах трансляции непре-
 рывного действия [1].

Изобретение относится к молекулярной
 биологии и биотехнологии, а именно к спо-
 собам препазированной экспрессии генов in
 vitro с использованием бесклеточных сис-
 тем сопряженной транскрипции/трансля-
 ции. Прямые ответственные областями
 использования является препаративная
 синтез биологически активных пептидов и
 белков для научных и прикладных целей.
 Целью изобретения является повыше-
 ние выхода продукта экспрессии гена в виде
 пептида или белка за счет увеличения срока

работы бесклеточной системы сопряженной
 транскрипции/трансляции.
 В бесклеточной системе сопряженной
 транскрипции/трансляции с использованием
 непрерывного действия ДНК осуществляют
 непрерывное удаление из реакционной
 смеси синтезируемого продукта и микро-
 молекулярных продуктов функциониро-
 вания систем транскрипции и трансляции в
 виде АМР, АDР, CDP, CDP, фосфатов
 и тирозинфосфатов, непрерывное восстано-
 вление концентраций расходуемых нуклеоти-
 цидов, аминокислот, энергии.

№ SU (11) 1705302 A1

SU 1705302 A1

LA 1705302 A1

Öiöiöëà èçíáðáóáíè :

ã ð « î à s i « l í

X

î

40

î è 1111111111 + + i 1015

Âðai

|||||

2025

3

1705302

4

клеточных веществ как аппарата трансляции в виде аминокислот, АТР, ГТР, так и аппарата транскрипции в виде АТР, ГТР, СТР, УТР, регенерацию АТР, ГТР, СТР, УТР из образующихся АМР, АДР, ГДР, СДР, УДР с последующим возвратом регенерированных компонентов в систему сопряженной транскрипции/трансляции. Из прокариотических клеток готовят экстракт, содержащий все компоненты аппарата транскрипции и аппарата трансляции, но свободный от эндогенных мРНК и ДНК. К экстракту добавляют низкомолекулярные компоненты транскрипции и трансляции (аминокислоты, АТР, ГТР, УТР, СТР), а также ген в виде молекулы ДНК. Реакционную смесь вносят в резервуар, где и протекает процесс сопряженной транскрипции/трансляции. Для предотвращения остановки процесса из резервуара через полупроницаемую мембрану непрерывно отводят продукты транскрипции (фосфата, АДР, ГДР, СДР, УДР) и трансляции (синтезированный полипептид, АМР, ГДР, фосфаты и пирофосфаты). Одновременно в резервуар подают аминокислоты, АТР, ГТР, СТР, УТР для восстановления их исходной концентрации. Синтезированный полипептид собирают на колонке со специфическим сорбентом, а продукты транскрипции и трансляции собирают в специальном резервуаре для их последующей регенерации. Способ обеспечивает препаративную экспрессию генов в виде молекул ДНК в течение десятков часов с выходом синтезированного продукта (полипептида) 50-200 мкг с 1 мл реакционной смеси.

кулярных веществ как аппарата транскрипции в виде аминокислот, АТР, ГТР, так и аппарата транскрипции в виде АТР, ГТР, СТР, УТР, регенерацию АТР, ГТР, СТР, УТР из образующихся АМР, АДР, ГДР, СДР, УДР с последующим возвратом регенерированных компонентов в систему сопряженной транскрипции/трансляции.

Из прокариотических клеток готовят экстракт, содержащий все компоненты аппарата транскрипции и аппарата трансляции, но свободный от эндогенных мРНК и ДНК. К экстракту добавляют низкомолекулярные компоненты транскрипции и трансляции (аминокислоты, АТР, ГТР, УТР, СТР), а также ген в виде молекулы ДНК. Реакционную смесь вносят в резервуар, где и протекает процесс сопряженной транскрипции/трансляции. Для предотвращения остановки процесса из резервуара через полупроницаемую мембрану непрерывно отводят продукты транскрипции (фосфата, АДР, ГДР, СДР, УДР) и трансляции (синтезированный полипептид, АМР, ГДР, фосфаты и пирофосфаты). Одновременно в резервуар подают аминокислоты, АТР, ГТР, СТР, УТР для восстановления их исходной концентрации. Синтезированный полипептид собирают на колонке со специфическим сорбентом, а продукты транскрипции и трансляции собирают в специальном резервуаре для их последующей регенерации. Способ обеспечивает препаративную экспрессию генов в виде молекул ДНК в течение десятков часов с выходом синтезированного продукта (полипептида) 50-200 мкг с 1 мл реакционной смеси.

Пример 1. Препаративная экспрессия генов плазмиды рUD 18 в бесклеточной системе.

Готовят стандартную бесклеточную систему сопряженной транскрипции/трансляции. Плаزمида рUD18 содержит гены β-лактамазы и дигидрофолатредуктазы.

Раствор (А) содержит 55 мМ транс-ацетат, рН 8,2, 11 мМ MgAc, 9,5 мМ CaCl2, 76 мМ KAc, 1,5 мМ ДТТ, 1,6% полиэтиленгликоля 6000, 5 мМ фосфоенолпирувата, 1,2 мМ АТР, по 0,8 мМ ГТР, СТР и УТР, 5 мкг/мл фолиевой кислоты, 100 мкМ [3H] лейцина с удельной радиоактивностью 230 мКи/ммоль и 100 мкМ каждой из остальных аминокислот. 1 мл реакционной смеси, приготовленной на буфере (А) содержит 430 мкг

экстракта S30, 150 мкг плазмиды рUD 18, 200 мкг суммарной тРНК.

Стандартная система сопряженной транскрипции/трансляции за 40 мин инкубирует при 37°C (платовое значение) синтезирует по 6 пикомолей β-лактамазы и дигидрофолатредуктазы на 1 мл инкубационной смеси. В параллельном эксперименте в установке непрерывного действия к 1,0 мл реакционной смеси непрерывно подают раствор (А) со скоростью либо 3 мл/ч, либо 2 мл/ч, а продукты реакции отводят из реакционной смеси с той же скоростью через ультрафильтрационную мембрану ХМ-100. Кинетика экспрессии генов β-лактамазы и дигидрофолатредуктазы в такой системе представлена на рис.1. За 50 ч функционирования такой системы в 1 мл реакционной смеси синтезируют по 4,1 наномолей β-лактамазы и дигидрофолатредуктазы, что соответствует 212 мкг белков β-лактамазы и дигидрофолатредуктазы.

Таким образом, предлагаемый способ обеспечивает препаративную экспрессию генов в бесклеточной системе, синтезируя более чем в 500 раз больше продукта, чем это делает стандартная бесклеточная система сопряженной транскрипции/трансляции.

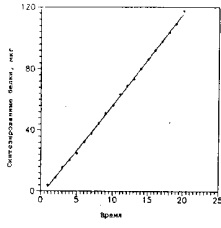
По предложенному техническому решению разработан лабораторный макет установки.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ препаративной экспрессии генов в бесклеточной системе сопряженной транскрипции/трансляции с использованием генов ДНК с последующей очисткой целевого продукта, о т л и ч а ю щ и с я т е м , что, с целью повышения выхода продукта экспрессии гена в виде пептида или белка за счет увеличения срока действия системы, в процессе экспрессии из системы осуществляют непрерывное удаление целевого продукта и одновременно синтезируемых соединений транскрипции и трансляции в виде АМР, АДР, ГДР, СДР, УДР, фосфатов и пирофосфатов, непрерывное восстановление концентрации расходуемых низкомолекулярных соединений как системы трансляции в виде аминокислот, АТР, ГТР так и системы транскрипции в виде АТР, ГТР, СТР, УТР, регенерацию АТР, ГТР, СТР, УТР из образующихся АМР, АДР, ГДР, СДР, УДР, с последующим возвратом регенерированных АТР, ГТР, СТР, УТР в систему сопряженной транскрипции/трансляции.

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1



Редактор В. Трубино Составитель Н. Кузнецова
Техред М. Морганта Корректор М. Максимович

Заказ 168 Тираж Подписное
ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
119035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1

S U 1 7 0 5 3 0 2 A 1