РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11) 2 557 306 (13) C1

(51) МПК
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014114093/10, 09.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2014

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 09.04.2014

(45) Опубликовано: 20.07.2015 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KOVALCHUK SN CDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel Crenomytilus grayanus with a unique amino acid sequence and antibacterial activity, Fish Shellfish Immunol. 2013 Oct;35(4):1320-4. doi: 10.1016/j.fsi.2013.07.011. Epub 2013 Jul 22. RU 2447151 C1, 10.04.2012. GenBank: ABD92772.1, 12.02.2008, Найдено в Интернет по адресу http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABD92772, Найдено 01.12.2014.

Адрес для переписки:
690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет Владивостоку, 159, ФГБУ науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, зав. пат. отд. Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):
Балабанова Лариса Анатольевна (RU),
Голотин Василий Александрович (RU),
Ковальчук Светлана Николаевна (RU),
Черников Олег Викторович (RU),
Чикаловец Ирина Владимировна (RU),
Рассказов Валерий Александрович (RU)

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

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pET40CmAP/CGL, КОДИРУЮЩАЯ ГИБРИДНЫЙ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИПЕПТИД CmAP/CGL СО СВОЙСТВАМИ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ CmAP И ГАЛАКТОЗОСПЕЦИФИЧНОГО ЛЕКТИНА CGL, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL - ПРОДУЦЕНТ ГИБРИДНОГО

RU 2557306 C1

последовательности рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP и галактозоспецифичного лектина CGL. Предложен способ получения гибридного бифункционального белка CmAP/CGL. Изобретение позволяет получать высокоочищенный препарат гибридного белка CmAP/CGL со свойствами рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и галактозоспецифичного лектина CGL и может быть использован для выявления различий в гликозилировании онкофетальных антигенов. 3 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 пр.

RU 2557306 C1

RU 2557306 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 557 306 (13) C1

(51) Int. Cl.
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014114093/10, 09.04.2014

(24) Effective date for property rights:
09.04.2014

Priority:
(22) Date of filing: 09.04.2014

(45) Date of publication: 20.07.2015 Bull. № 20

Mail address:
690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku, 159, FGBU nauki Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova Dal'nevostochnogo otdelenija RAN, zav. pat. otd. Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):
Balabanova Larisa Anatol'evna (RU),
Golotin Vasilij Aleksandrovich (RU),
Koval'chuk Svetlana Nikolaevna (RU),
Chernikov Oleg Viktorovich (RU),
Chikalovets Irina Vladimirovna (RU),
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)

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

(54) RECOMBINANT PLASMID DNA pET40CmAP/CGL ENCODING HYBRID BIFUNCTIONAL POLYPEPTIDE CmAP/CGL WITH PROPERTIES OF HIGHLY ACTIVE ALKALINE PHOSPHATASE CmAP AND GALACTOSE SPECIFIC LECTIN CGL, RECOMBINANT STRAIN OF E coli Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL - PRODUCER OF HYBRID BIFUNCTIONAL POLYPEPTIDE CmAP/CGL AND METHOD OF ITS PREPARATION

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a recombinant plasmid pET40CmAP/CGL determining the synthesis of hybrid bifunctional polypeptide CmAP/CGL with the properties of highly active alkaline phosphatase of marine bacterium Cobetia marina (CmAP) and galactose specific lectin of mussels Crenomytilus grayanus (CGL). The plasmid comprises NcoI/SalI - fragment of plasmid pET-40b(+) (Novagen) and the DNA site D4K. Also a recombinant strain of E. coli Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL is provided, transformed by the indicated plasmid, - producer of the hybrid bifunctional protein CmAP/CGL, comprising the amino acid sequences of recombinant alkaline phosphatase CmAP and galactose specific lectin CGL. The method of obtaining the hybrid bifunctional protein CmAP/CGL is proposed.

EFFECT: invention enables to obtain highly purified

RU 2557306 C1

RU 2557306 C1

Изобретение относится к молекулярной биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и позволяет получать микробиологическим синтезом по оптимизированной технологии новый гибридный бифункциональный полипептид ComAP/CGL со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии и лектин-связывающей активностью галактозоспецифичного лектина мидии Crenomytilus grayanus, который может быть использован для выявления различий в гликозилировании онкофетальных антигенов.

К настоящему времени установлено, что структура углеводных цепей гликоконъюгатов, секретируемых клеткой организма, в значительной степени зависит от типа патологического процесса. Целый ряд гликопротеинов, названных онкофетальными антигенами (ОФА), используется в качестве маркеров различного типа патологий. Одним из современных методов выявления углеводного профиля клеточных гликоконъюгатов является использование углевод-связывающих белков-пектинов, способных обратимо и избирательно связываться с определенными углеводными структурами. В частности, такие гликопротеины, как трофобласт-специфический бета-1-гликопротеин (ТБГ), раково-эмбриональный антиген (РЭА), простата-специфичный антиген (ПСА), альфа-фетопротеин (АФП) являются маркерами опухолевых процессов. Однако высокий уровень этих ОФА не всегда однозначно связан с онкопатологией. Так, повышенный уровень ТБГ наблюдается как при нормально протекающей беременности, так и при онкопатологии трофобласта - пузырном заносе и хорионэпителиоме [1]. Поскольку высокий уровень ТБГ наблюдается в обоих случаях, не представляется возможным провести четкие различия между злокачественным заболеванием и беременностью, что затрудняет своевременную диагностику. РЭА секретируется как нормальными эпителиальными клетками кишечника, так и при аденокарциномах кишечника и полипах [2-3], ПСА как при раке простаты, так и при доброкачественной гиперплазии [4], АФП - при раке печени, циррозе или гепатите [5], что зачастую не позволяет поставить точный диагноз.

Ранее из морского беспозвоночного был выделен и охарактеризован галактозоспецифичный (Gal/GalNAc-специфичный) лектин из мидии Crenomytilus grayanus (CGL), а также для выявления различий в гликозилировании ОФА, были разработаны методы твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА) с использованием CGL [6-8]. Было показано, что лектины проявляют специфичность к углеводным цепям, характерным для злокачественного роста, таким как Т-антиген (Galβ1→3GalNAc-O-Ser/Thr), Tn-антиген (GalNAc-O-Ser/Thr) и биссектный GlcNAc. Для разработки на их основе методов ТЛФА были получены конъюгаты пектинов с ферментной меткой - пероксидазой хрена. С помощью одной из сконструированных тест-систем с использованием CGL были протестированы сыворотки беременных женщин (в том

онкологических больных с различной этиологией и сыворотки здоровых доноров. Результаты эксперимента показали существенную разницу в связывании CGL с РЭА/РЭА-подобными антигенами из сывороток онкологических больных и здоровых доноров. Средний уровень лектин-реактивных гликоформ РЭА в образцах со всеми видами онкопатологий был в 2-3 раза выше по сравнению со средним уровнем, определенным для здоровых людей [6].

Кроме того, установлено, что CGL является высокочувствительным гистохимическим маркером. Так, показано, что он является маркером различных субпопуляций нейроцитов симпатической нервной системы. Меченный ферментной меткой CGL позволяет определять не только тела нейронов Б-типа, но и их немиелиновые аксоны [7]. Изучена также специфика локализации рецепторов муцинового типа в клетках низкодифференцированной аденокарциномы толстой кишки человека. Выявлены основные типы локализации этих рецепторов. Показано, что лектин CGL, меченный ферментной меткой, наиболее интенсивно связывается с внутриклеточными мембранами, цитоплазмой и секретом опухолевых клеток, синтезирующих муцины [8].

Определение концентрации лектин-связанных структур в эпителиальном секрете является принципиально новым подходом при выявлении злокачественных новообразований. Однако и такой анализ требует повышения эффективности наряду с простотой выполнения метода. Это возможно при использовании методов генной инженерии. Методами молекулярного клонирования была впервые установлена структура нового галактозоспецифичного пектина CGL из мидии Crenomytilus grayanus [GenBank, код доступа JQ314213], открывающего новое семейство пектинов [9]. Известен способ получения высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP [GenBank, код доступа ABD92772] [10].

Задача изобретения - конструирование рекомбинантного штамма-продуцента Escherichia coli, несущего такую экспрессирующую конструкцию (плазмиду), которая позволит нарабатывать целевой высокоочищенный недеградированный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/CGL в препаративных количествах, при сохранении как иммуногенных свойств галактозоспецифичного лектина мидии CGL, так и ферментативных свойств высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP, используемой для цветной визуализации лектин-связанных комплексов в лектин-ферментных методах ИФА и ТЛФА.

Поставленная задача решена путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pET40CmAP/CGL, кодирующей химерный полипептид CmAP/CGL, и рекомбинантного штамма E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL, обеспечивающие индуцируемый синтез с высоким и стабильным выходом активного растворимого бифункционального белка CmAP/CGL, обладающего свойствами высокоактивной

энтерокиназы.

На фигуре 1 представлена физическая карта плазмиды pET40CmAP/CGL и область плазмиды, ответственная за экспрессию гибридного белка CmAP/CGL. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pET40CmAP/CGL, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержит последовательность структурного гена CmAP, соответствующую открытой рамке считывания для белка CmAP, последовательности соединяющего линкера $(G_4S)_3EL$ и сайта энтерокиназы D4K, последовательность структурного гена CGL, соответствующую открытой рамке считывания для белка CGL (SEQ ID N 1).

Рекомбинантный штамм E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL получен трансформацией клеток E. coli Rosetta(DE3) (Novagen) плазмидой pET40CmAP/CGL с использованием традиционной генно-инженерной технологии [11].

Рекомбинантный штамм E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки.

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

Физико-биологические признаки.

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

Устойчивость к антибиотикам.

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

Патогенность и токсичность.

Рекомбинантный штамм E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL не патогенен и не токсичен для теплокровных животных.

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

Заявляемый способ получения гибридного бифункционального белка CmAP/CGL заключается в культивировании клеток штамма E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL в жидкой питательной среде LB в течение 12 ч при 16°C, затем бактериальные клетки осаждают центрифугированием, суспензию клеток дезинтегрируют в буфере, далее

молекулярной массой 32,5 кДа, широкий диапазон значений температуры (25-37°C) и pH (7,5-9,5) для проявления фосфатазной активности и аффинных свойств лектина. Плазмидный шаперон Dsb не влияет на функциональность обеих частей химеры CmAP/CGL. В молекуле CmAP/CGL предусмотрено наличие сайта энтерокиназы между функциональными модулями для удаления щелочной фосфатазы из реакции при необходимости.

Использование галактозоспецифичного лектина мидии в составе гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL с активностью щелочной фосфатазы позволяет сократить стадии и время лектин-ферментного анализа, которые раньше требовались для получения конъюгатов лектина и фермента.

На фигуре 2 представлены результаты гемагглютинации и лектин-ферментного анализа (ИФА), проведенные с гибридным бифункциональным полипептидом CmAP/CGL, полученным от разных рекомбинантных колоний трансгенного штамма E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL.

Для гемагглютинации брали несорбирующий 96-луночный планшет с U-образными лунками. Образец, содержащий целевой белок CmAP/CGL, разводили двукратно в 100 мкл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl, pH 8,2. После этого к разведениям приливали по 50 мкл 2% эритроцитов человека группы О (I). В течение часа наблюдали реакцию гемагглютинации. ИФА проводили на микропланшете, сенсибилизированном муцином, с применением гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL, полученного от колоний №3 и 6, отобранных по результатам геммаглютинации (фиг.2). Уровень аффинности рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL определяли по концентрации лектин-связанных комплексов с муцином (по оси X). Визуализацию пектин-связанных комплексов осуществляли методом измерения фосфатазной активности рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL (по оси Y).

Существенными преимуществами заявляемого способа получения гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL являются:

использование рекомбинантного штамма-продуцента E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL, что позволяет получать при биосинтезе большое количество высокоактивного бифункционального гибридного белка CmAP/CGL;

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

Способ получения функционально активного гибридного полипептида CmAP/CGL на основе использования химерного гена, кодирующего щелочную фосфатазу морской бактерии CmAP и галактозоспецифичный лектин мидии CGL, иллюстрируется

специфичный по отношению к N-концевой последовательности CmAP, включающий сайт для рестриктазы NcoI; Pho40X-SacI-R - обратный праймер, специфичный по отношению к С-концевой последовательности CmAP, включающий полинуклеотид, кодирующий линкер $(G_4S)_3$ и сайт рестрикции Sad:

X-PhoN_F: 5′-TATTCCATGGCAGAGATCAAGAATGTCATTCTGAT-3′

Pho40X-SacI-R: -5′-
TTAAGAGCTCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCCT
TCGCTACCACTGTCTTCAGATACTGTCCT-3′.

Данную реакцию проводят в следующих условиях: 10× Encycio буфер, 50× смесь полимераз Encyclo ("Encyclo PCR kit", Евроген, Москва), 50× смесь dNTP (10 μM каждого), смесь праймеров (5 μM каждого), 20 нг ДНК. Процесс амплификации состоит из следующих стадий: 30 циклов ПЦР (15 с - 95°С, 1 мин 30 с - 72°С) и инкубация 10 мин при 72°С. После амплификации ПЦР-продукт очищают электрофоретически в 1% агарозном геле. Фрагмент (1 мкг) обрабатывают рестриктазами NcoI и SacI в оптимальном буфере (Fermentas) в течение 3 часов, затем ферменты удаляют из реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1) [11]. В водную фракцию, содержащую фрагмент, добавляют 1/10 объема 0,3 М ацетата Na, pH 5,2, и 1/2 объема изопропанолового спирта и оставляют на -20°С в течение 30 мин. Затем центрифугируют при 14000 об/мин в течение 20 мин, осадок промывают 75% этанолом и высушивают при комнатной температуре. Осадок растворяют в 20 мкл.

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

Полученный фрагмент гена CmAP и векторную часть плазмиды pET-40b(+) сшивают при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции (Fermentas). 10 мкл реакционной смеси используют для трансформации компетентных клеток E. coli Rosetta(DE3). Трансформанты высевают на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 ч при 37°С клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают плазмидную ДНК pET40CmAP, содержащую последовательность CmAP с линкером (G4S)3 на С-концевой части.

На втором этапе проводят амплификацию гена CGL с использованием к-ДНК мидии Crenomytilus grayanus и пары праймеров CGL-exp40X_dir и CGL-exp40_rev, включающих сайты для рестриктаз Sad и SalI и сайт энтерокиназы с N-конца CGL:

CGL-exp40X_dir: 5′-
AGCTGAGCTCGATGACGATGACAAGATGACAACGTTTCTTATCAAACACAAGGCCAGTG-
3′

Отбирают ДНК, содержащую необходимые последовательности генов CmAP и CGL, представляющую собой плазмиду pET40CmAP/CGL размером 8192 п.о. (Фиг.1).

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

Рекомбинантный штамм-продуцент E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL получают путем трансформации клеток штамма E. coli Rosetta(DE3) рекомбинантной плазмидой pET40CmAP/CGL. Ночную культуру (0,5 мл LB) рекомбинантного штамма-продуцента гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL выращивают в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин при температуре 37°C в течение 2 часов до оптической плотности 0,6-0,8 (OD_{600}), затем добавляют индуктор экспрессии IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубируют далее при 16°C в течение 12 часов.

Для определения продуктивности штамма клеточные водные экстракты анализируют электрофорезом в 12,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Гель окрашивают Кумасси R-250 по стандартной методике и определяют относительное количество белка в полосе целевого продукта. Содержание рекомбинантного белка в растворимой клеточной фракции составляет не менее 30% от всех белков этой фракции.

Пример 3. Выделение и характеристика гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL.

Рекомбинантный штамм-продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL - E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL, инкубируют в литровой колбе в жидкой среде LB, содержащей на литр 10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта и 10 г NaCl, 0,5 мМ IPTG, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, на шейкере при 200 об/мин в течение 12 часов при 16°C. Бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток дезинтегрируют в 20 мл буфера А (0,05 М трис-HCl, pH 8,6, 0.01% NaN_3) в течение 5×30 с, охлаждая во льду. Затем центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку с ДЕАЕ-52-целлюлозой (Whatman). Элюцию белка проводят градиентом концентрации NaCl (0,05 М-0,380 М) в буфере А. Активные фракции собирают и помещают на колонку с металлоафинной смолой (Qiagen), предварительно уравновешенную буфером А. Элюцию белка проводят буфером В (50 мМ Tris-HCl, pH 8,6, 50 мМ EDTA, 0,01% NaN_3). Активные фракции собирают, обессоливают и концентрируют на колонке с ДЕАЕ-Toyopearl 65 OM (Toyo Soda), затем инкубируют с энтерокиназой (Invitrogen) при комнатной температуре в течение 12 часов. Затем раствор белка наносят на колонку для гель-фильтрации с Superdex 200 (Sigma).

CmAP/CGL, либо 2 мМ п-НФФ, 0,1 М трис-HCl, 0,2 М KCl, pH 9,5-10,0. После 30 мин инкубации при 37°С реакцию останавливают добавлением 2 мл 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции п-нитрофенола (п-НФ) определяют спектрофотометрически при 400 нм. За единицу активности щелочной фосфатазы принимают количество фермента, катализирующего освобождение 1 мкМ п-НФ ($\varepsilon_{400\ нм}$=18600) в течение 1 мин инкубации. Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Брэдфорда.

Лектинную функциональность гибридного полипептида CmAP/CGL проверяют по реакции гемагглютинации и/или уровню аффинности к муцину: CmAP/CGL разводят двукратно в 100 мкл буфера, содержащем 20 мМ Tris-HCl, pH 8,2. После этого к разведениям приливают по 50 мкл 2% эритроциты человека группы О (I). В течение часа наблюдают гемагглютинацию. Либо на сенсибилизированный муцином полистирольный микропланшет вносят раствор (0,0015-0,1 мг/мл) гибридного полипептида CmAP/CGL и инкубируют 1,5 часа при комнатной температуре. Лектин-связанные комплексы отмывают буфером 10 мм трис-HCl, pH 9,0, 0,15 М NaCl, 0,05% Тритон Х-100 по 200 мкл в каждую лунку не менее 10 раз. Затем в лунки микропланшета добавляют буфер для активности щелочной фосфатазы с субстратом, как описано выше, для визуализации связавшихся комплексов.

Полученные данные по характеристике и функциональной активности продукта экспрессии искусственного химерного гена гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL в клетках рекомбинантного штамма E. coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL свидетельствуют о соответствии исследуемого полипептида его природному аналогу - галактозоспецифическому лектину CGL, перспективному для использования в лектин-иммуноферментных и лектин-ферментных методах дифференциальной диагностики плацентарной недостаточности и онкопатологий трофобласта при беременности, аденокарциномы толстой кишки человека, гистопатологий нейроцитов симпатической нервной системы [6-7].

Как следует из приведенных примеров, заявляемая группа изобретений позволяет получать активный рекомбинантный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/CGL со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и галактозоспецифичного лектина мидии CGL с высоким выходом при относительно простой и надежной технологии.

Заявленное изобретение позволяет:

- с помощью использования рекомбинантного штамма-продуцента E. coli Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL получать путем биосинтеза большое количество активного

differences // Cancer Res. 1991. Vol.51. P.5679-5686.

3. Fukushima K., Ohkura T., Kanai M., Kuroki M., Matsuoka Y., Kobata A., Yamashita K. Carbohydrate structures of a normal counterpart of the carcinoembryonic antigen produced by colon epithelial cells of normal adults // Glycobiology. 1995. Vol.5. №1. P.105-115.

4. Tabares G., Radcliffe C.M., Barrabes S., Ramirez M., Aleixandre R.N, Hoesel W., Dwek R A., Rudd P.M., Peracaula R.,de Llorens R. Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA // Glycobiology. 2006. V.16. №2. P.132-145.

5. Wu J.T.(1990) Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver diseases: a review. Ann. Clin. Lab. Sci. 20, 98-105.

6. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Булгаков А.А., Черников О.В., Петрова И.Ю., Лукьянов П.А. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека // Вестник ДВО РАН. - 2010. - №5. - С.1-10.

7. Фуртак В.А., Тихонов Я.Н., Чикаловец И.В., Лукьянов П.А. Гистопатология рецепторов лектина CGL в спинномозговых ганглиях крыс // Тихоокеан. мед. журн. - 2000. - №4. - С.41-43.

8. Фуртак В.А., Курика А.В., Белогорцева Н.И., Чикаловец И.В., Клещенко Ю.Е. Клеточная локализация рецепторов муцинового типа, выявляемых новым GalNac/Gal - специфичным пектином из морской мидии Crenomytilus grayanus в опухолях толстой кишки человека // Бюл. эксп.биологии и медицины. - 1999. - Т.128, №10. - С.441-444.

9. Kovalchuk S.N., Chikalovets I.V., Chernikov O.V., Molchanova V.I., Li W., Rasskazov V.A., Lukyanov P.A. cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel Crenomytilus grayanus with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // Fish Shellfish Immunol. - 2013. - V.35. - №4. - P.1320-1324.

10. RU 2447151 C1, 10.04.2012.

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

Формула изобретения

1. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/CGL размером 8192 пар оснований (п.о.), определяющая синтез рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/CGL и характеризующаяся наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмента ДНК размером 2028 п.о., содержащего химерный ген, состоящий из структурной части гена щелочной фосфатазы CmAP, включая линкер $(G_4S)_3EL$, и структурной части гена галактозоспецифического лектина CGL (SEQ ID N 1).

2. Рекомбинантный штамм E.coli Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL, трансформированный

Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

<110> Балабанова Л.А., Голотин В.А., Ковальчук С.Н., Черников О.В., Чикаловец И.В., Рассказов В.А.

<120> Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40*Cm*AP/CGL, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид *Cm*AP/CGL со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии и галактозоспецифичного лектина мидии, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40*Cm*AP/CGL –продуцент гибридного полипептида *Cm*AP/CGL и способ его получения.

<160> 1

<210> 1

<211> 2028

<212> ДНК, кДНК

<213> *Cobetia marina ВКМ B-2021 Д; Crenomytilus grayanus*

<223> Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pET40*Cm*AP/MBL-T, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержащая последовательности гена щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina ВКМ B-2021 Д* (*Cm*AP), включая последовательность линкера $(G_4S)_3EL$, и гена галактозоспецифичного лектина мидии *Crenomytilus grayanus*, соответствующая открытой рамке считывания для гибридного бифункционального полипептида *Cm*AP/CGL.

<400> 1

```
     SalI
195 CAGCTGAATC CGTATTTGAT TTTGCGCGAA CAGAAATAAA AAACCGCTTT GTTTTTACTT
    GTCGACTTAG GCATAAACTA AAACGCGCTT GTCTTTATTT TTTGGCGAAA CAAAAATGAA

255 AAGGTACCGA CGTACAAATA GAGGTACATA TTGACAAAGC CATAATAAGC CACCTAAGCC
    TTCCATGGCT GCATGTTTAT CTCCATGTAT AACTGTTTCG GTATTATTCG GTGGATTCGG

315 CCTAGGCGGG AACCCCACCT ACATAAATGG CGGAAACACG TATTATAACA GCAACTTCTT
    GGATCCGCCC TTGGGGTGGA TGTATTTACC GCCTTTGTGC ATAATATTGT CGTTGAAGAA
```

675 TCTTGGTGGT GGTGGTCTTG GTGGTGGTGG TCTTGGTGGT GGTGGGAAGC GATGGTGACA
AGAACCACCA CCACCAGAAC CACCACCACC AGAACCACCA CCACCCTTCG CTACCACTGT

735 GAAGTCTATG ACAGGATAGA GCCTTACCAC GTCCTACCTT CTCTGGCCGT TCTACAGCAA
CTTCAGATAC TGTCCTATCT CGGAATGGTG CAGGATGGAA GAGACCGGCA AGATGTCGTT

795 CCGACCGGGG GTACGTTTCT GCAACTGACC GCATACCCAC ACGCATGGTC AGGGGGTCTG
GGCTGGCCCC CATGCAAAGA CGTTGACTGG CGTATGGGTG TGCGTACCAG TCCCCCAGAC

855 CCACAAAACG ACACAGCGGT TACGGGCGCG GTCGTCCAAC GGCGCTAGCA ATATCCCCTT
GGTGTTTTGC TGTGTCGCCA ATGCCCGCGC CAGCAGGTTG CCGCGATCGT TATAGGGGAA

915 CTTCCGCAGC TTCAGCACTT GACGGCCGTG GAGCGACTGG GGCTCCATTG ATACAGGTAG
GAAGGCGTCG AAGTCGTGAA CTGCCGGCAC CTCGCTGACC CCGAGGTAAC TATGTCCATC

975 GTGTACTATC CCCAACCCGA ACAACCGGTC ATGAAGTCGA CGGACCCGAA GCCATTAGAC
CACATGATAG GGGTTGGGCT TGTTGGCCAG TACTTCAGCT GCCTGGGCTT CGGTAATCTG

1035 CTTCAGTGAT AACGGTAACT GTCGGCGGTA GTTCGCTCGG CCACACGCGA GTGGAACGCC
GAAGTCACTA TTGCCATTGA CAGCCGCCAT CAAGCGAGCC GGTGTGCGCT CACCTTGCGG

1095 ATCACGGAGC TTTAGTGACT CGTCGAGCAT TATCCAGACG AAGACGAGTA TCTCTGACAG
TAGTGCCTCG AAATCACTGA GCAGCTCGTA ATAGGTCTGC TTCTGCTCAT AGAGACTGTC

1155 GTCTTAGCTC TTCAGTGGTT TTAACTTTAA CCCTCGCATT AGGACTAGAC GCTTACGTCC
CAGAATCGAG AAGTCACCAA AATTGAAATT GGGAGCGTAA TCCTGATCTG CGAATGCAGG

1215 CGGACTAAAG AAGACGCGAC GGCCATTTAA CCGCGACCTT ATTGACTTCG GCTTACGAGG
GCCTGATTTC TTCTGCGCTG CCGGTAAATT GGCGCTGGAA TAACTGAAGC CGAATGCTCC

1275 GCAGAGTACC AGCCGGCAAT GGTCCTAATA ACATAGCAGA GCCAGAGCGC GGGTCAGTTT
CGTCTCATGG TCGGCCGTTA CCAGGATTAT TGTATCGTCT CGGTCTCGCG CCCAGTCAAA

1335 CTGTGGAACG TGCCGGAGTA GCTTGAACTA GTCAAGTAAC TCGTACCACG GGCGTAGTAA
GACACCTTGC ACGGCCTCAT CGAACTTGAT CAGTTCATTG AGCATGGTGC CCGCATCATT

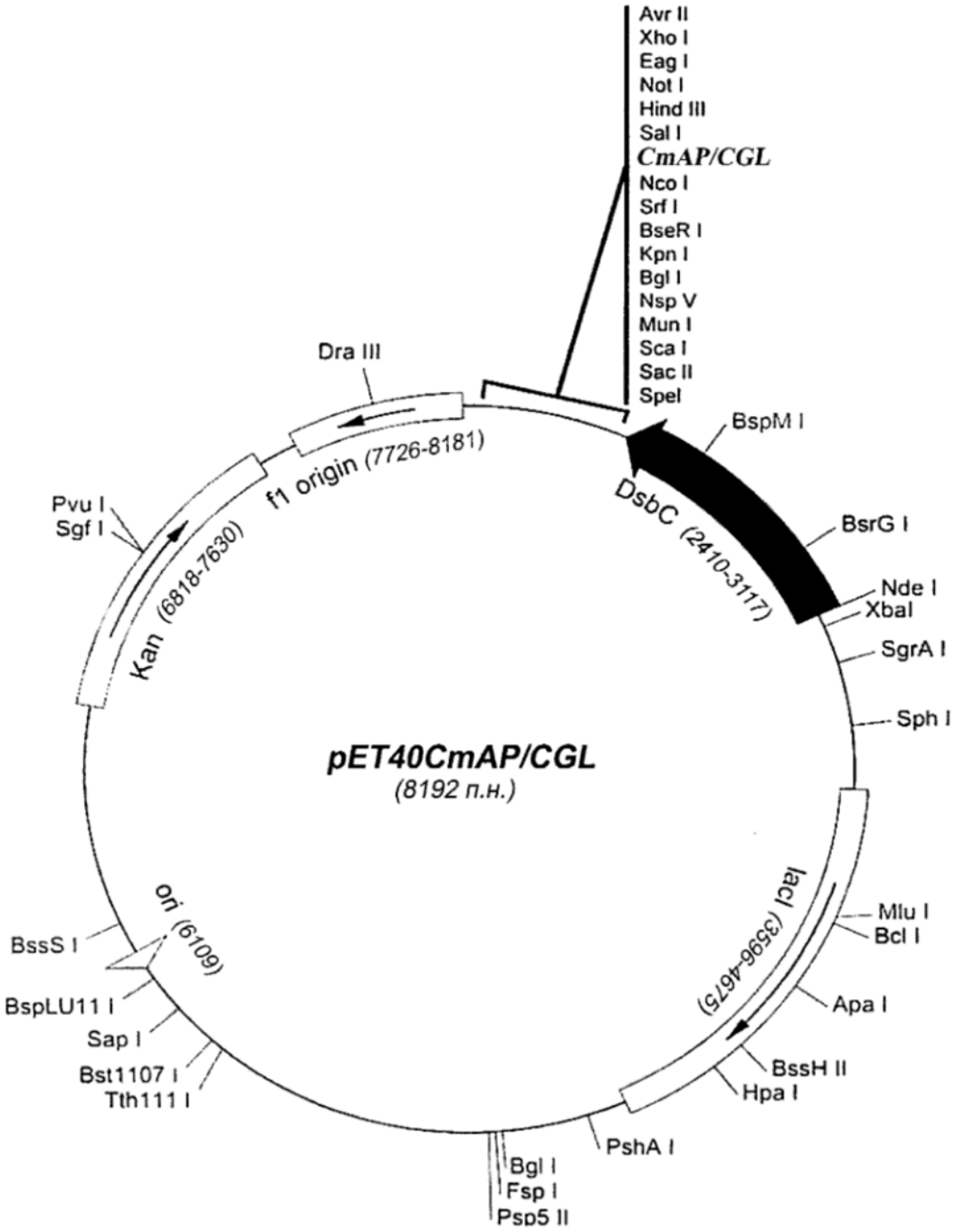
1395 CCTTACGCGC CGGGTCAGCT AGACCGGTGG GAGCTGGTAG TTTTTCTTTG GTAGTAGTAG
GGAATGCGCG GCCCAGTCGA TCTGGCCACC CTCGACCATC AAAAAGAAAC CATCATCATC

1455 GACAAGTTCG TAACTGTCAC GAAAAACCCA GTAGAGTACG TCCCAGCCGA CGACTGCGAC
CTGTTCAAGC ATTGACAGTG CTTTTTGGGT CATCTCATGC AGGGTCGGCT GCTGACGCTG

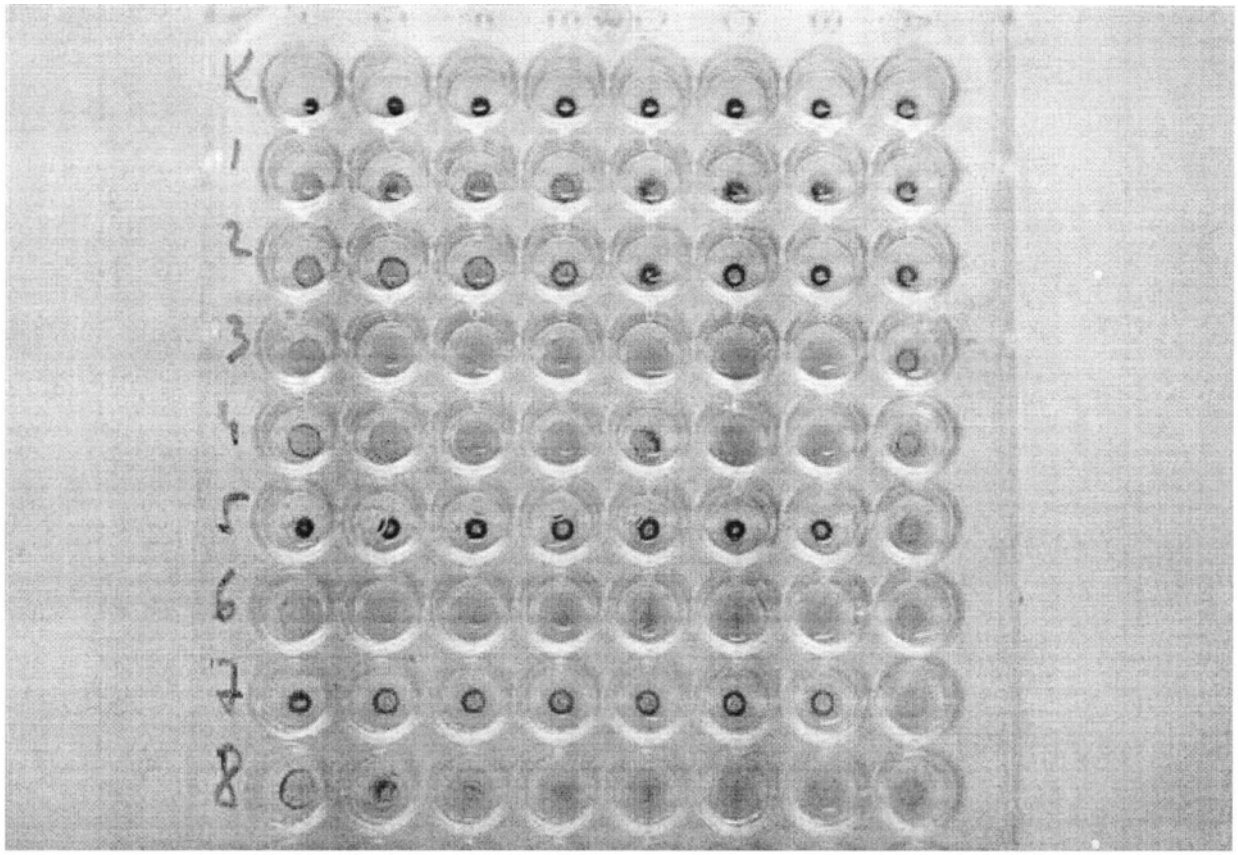
1515 ACCCAGTAGT ACCGATAGAG CTTTCGACTA TGGTAGGCGG TATGGGCTCA ACCGCTTATC
TGGGTCATCA TGGCTATCTC GAAAGCTGAT ACCATCCGCC ATACCCGAGT TGGCGAATAG

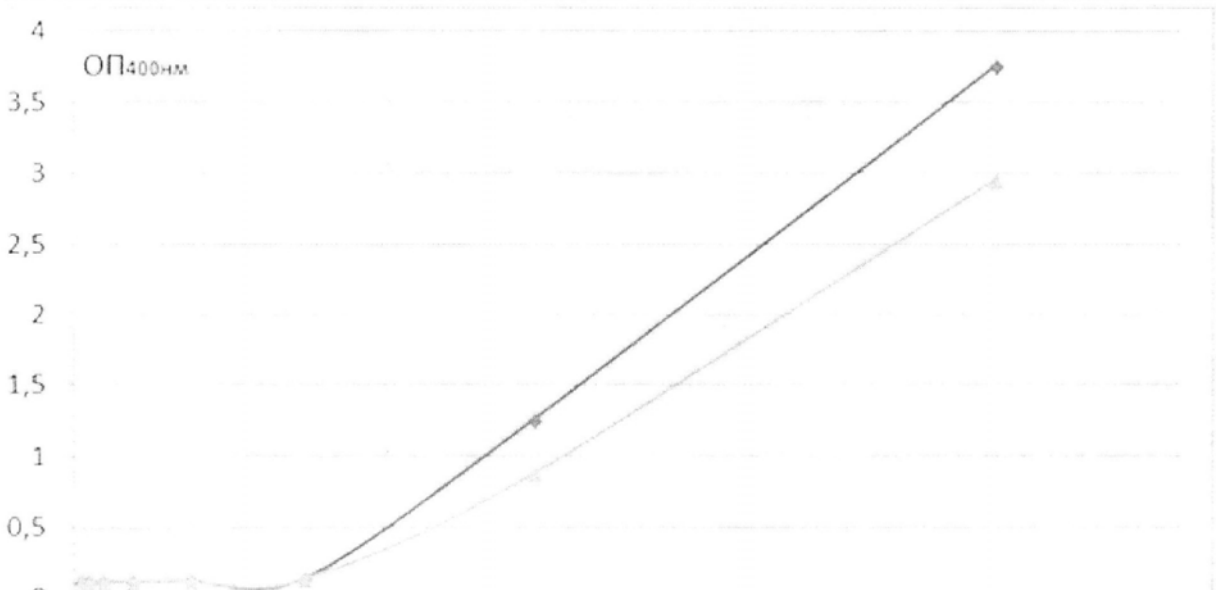
1575 GGGGTTATGG AACCACGGTA ACTCACGCCG GTAGACTAGT GCGCATTTCC GATCGGGTAT
CCCCAATACC TTGGTGCCAT TGAGTGCGGC CATCTGATCA CGCGTAAAGG CTAGCCCATA

```
1935 TTCGAGCTCC TGCCAAAGGT GGGCTAATGG GAGACTTAGA TACGGCTAGT GGAGCGGGGG
     AAGCTCGAGG ACGGTTTCCA CCCGATTACC CTCTGAATCT ATGCCGATCA CCTCGCCCCC

1995 CCACTTCTAT GGGCAGCTCT CGACTCAGCG ACTTGTCCGG CTTAGGTGAT GGTGCCGTAG
     GGTGAAGATA CCCGTCGAGA GCTGAGTCGC TGAACAGGCC GAATCCACTA CCACGGCATC

2055 AAGTCCCACT CAGTTACTTC GCGGGTGGTG CGGAAGGAAG CGGTCGACCA TCTCACGGCA
     TTCAGGGTGA GTCAATGAAG CGCCCACCAC GCCTTCCTTC GCCAGCTGGT AGAGTGCCGT

2115 GCTTGCGGGA ACTATATAGC TTAGGCCGCG TGCTAACCGC ATACAGAGGT CGTACGGTTG
     CGAACGCCCT TGATATATCG AATCCGGCGC ACGATTGGCG TATGTCTCCA GCATGCCAAC

2175 GACGACCCCG GGGTACGGTA GCGGTTAGTA GTCTTACTGT AAGAACTAGA GACGGTACC
     CTGCTGGGGC CCCATGCCAT CGCCAATCAT CAGAATGACA TTCTTGATCT CTGCCATGG
                                                              NcoI
```


Avr II
Xho I
Eag I
Not I
Hind III
Sal I
CmAP/CGL
Nco I
Srf I
BseR I
Kpn I
Bgl I
Nsp V
Mun I
Sca I
Sac II
SpeI
BspM I
BsrG I
Nde I
XbaI
SgrA I
Sph I
Mlu I
Bcl I
Apa I
BssH II
Hpa I
PshA I
Bgl I
Fsp I
Psp5 II
BssS I
BspLU11 I
Sap I
Bst1107 I
Tth111 I
Pvu I
Sgf I
Dra III
f1 origin (7726-8181)
DsbC (2410-3117)
Kan (6818-7630)
ori (6109)
lacI (3596-4675)
pET40CmAP/CGL
(8192 п.н.)

Фиг. 1


K
1
2
3
4
5
6
7
8


ОП400нм
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5