



(51) МПК  
*C12N 15/52* (2006.01)  
*C12N 15/55* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 15/72* (2006.01)  
*C12N 9/14* (2006.01)  
*C07K 14/24* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2016132052, 03.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.08.2016Дата регистрации:  
07.11.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.08.2016

(45) Опубликовано: 07.11.2017 Бюл. № 31

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет  
 Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский  
 институт биорганической химии им. Г.Б.  
 Елякова Дальневосточного отделения  
 Российской академии наук, зав. патентным  
 отделом Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Балабанова Лариса Анатольевна (RU),  
 Голотин Василий Александрович (RU),  
 Буйновская Нина Сергеевна (RU),  
 Портнягина Ольга Юрьевна (RU),  
 Новикова Ольга Данииловна (RU),  
 Рассказов Валерий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

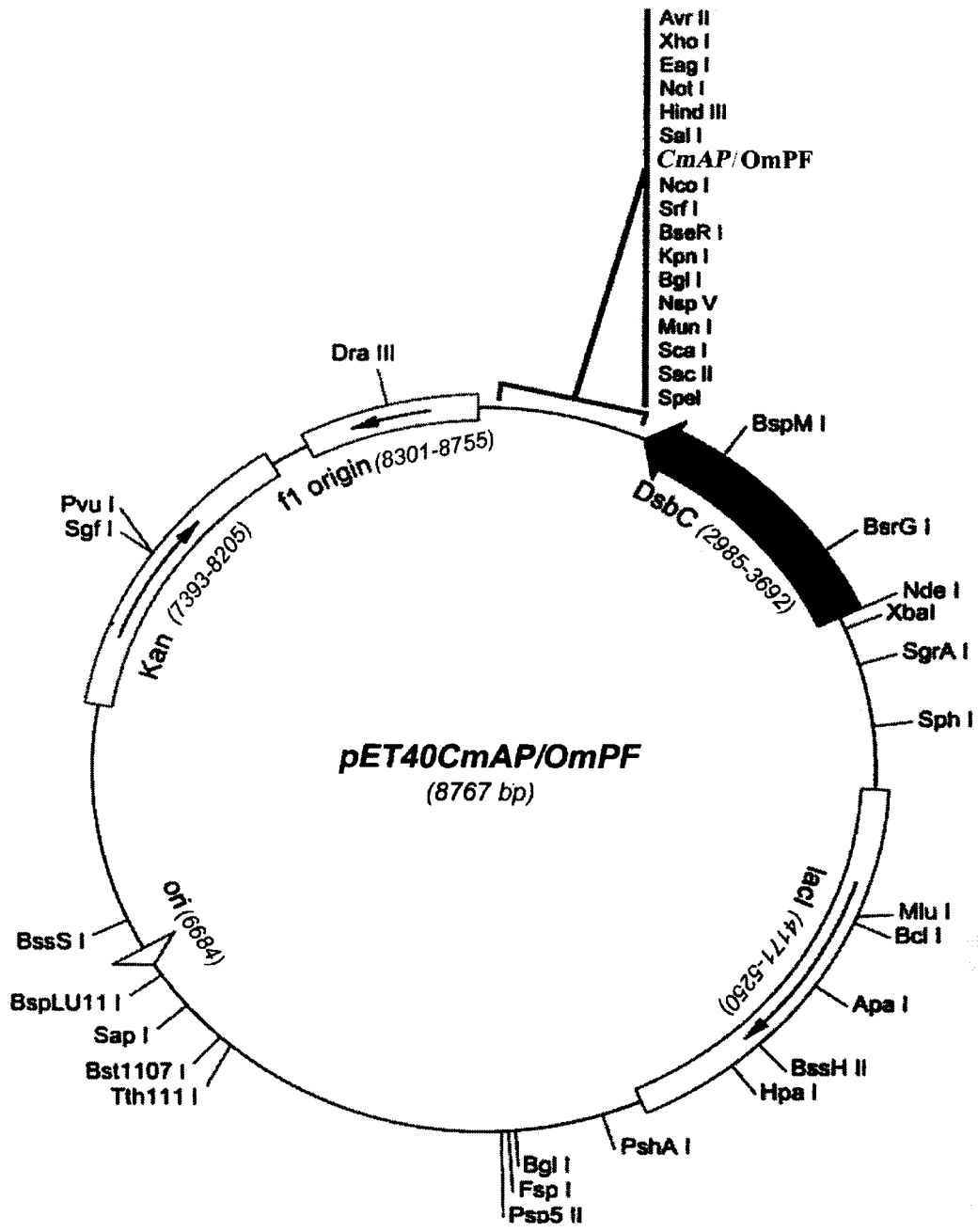
(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2538169 C1, 10.01.2015. RU  
 2447151 C1, 10.04.2012. GenBank: ABD92772.1,  
 12.02.2008, Найдено онлайн:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABD92772>. GenBank: AY855840.1, 15.02.2005,  
 Найдено онлайн: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/58918045?sat=4&satkey=8481008>;  
 TOMMASSEN J. ET AL. Gene encoding a  
 hybrid OmpF-PhoE pore protein in the outer  
 (см. прод.)

(54) Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ40СmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид СmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы СmAP и порообразующего мембранного белка OmpF, и рекомбинантный штамм E. coli Rosetta (DE3)/рЕТ40СmAP/OmpF - продуцент гибридного бифункционального полипептида СmAP/OmpF

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложена плазида рЕТ40СmAP/OmpF размером 8767 пар оснований (п.о.), определяющая синтез рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида СmAP/OmpF. Указанная плазида характеризуется наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды рЕТ-40b(+)(Novagen) и фрагмента ДНК размером 2577 п.о., содержащего химерный ген, кодирующий полноразмерную щелочную фосфатазу СmAP и полноразмерный порин Yersinia pseudotuberculosis OmpF, соединенные между собой

последовательностью, кодирующей гибкий линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1). Предложен рекомбинантный штамм E. coli Rosetta (DE3)/рЕТ40СmAP/OmpF, являющийся продуцентом гибридного бифункционального полипептида СmAP/OmpF и полученный путем модификации штамма E. coli Rosetta (DE3) указанной плазмидой рЕТ40СmAP/OmpF. Группа изобретений обеспечивает высокий выход гибридного белка СmAP/OmpF со свойствами рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы СmAP и порообразующего белка OmpF. 2 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 пр.



Фиг. 1

(56) (продолжение):  
 membrane of Escherichia coli K12 // Mol Gen Genet (1984) 197:503-508.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 15/52* (2006.01)  
*C12N 15/55* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 15/72* (2006.01)  
*C12N 9/14* (2006.01)  
*C07K 14/24* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2016132052, 03.08.2016**(24) Effective date for property rights:  
**03.08.2016**Registration date:  
**07.11.2017**

Priority:

(22) Date of filing: **03.08.2016**(45) Date of publication: **07.11.2017** Bull. № 31

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,  
159, FGBUN Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova  
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj akademii  
nauk, zav. patentnym otdelom Stadnichenko N.I.

(72) Inventor(s):

**Balabanova Larisa Anatolevna (RU),  
Golotin Vasilij Aleksandrovich (RU),  
Bujnovskaya Nina Sergeevna (RU),  
Portnyagina Olga Yurevna (RU),  
Novikova Olga Daniilovna (RU),  
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Elyakova  
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj  
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU)**

(54) **RECOMBINANT PLASMID pET40CmAP/ MPF DNA, ENCODING BIFUNCTIONAL HYBRID CmAP/ OmpF POLYPEPTIDE WITH PROPERTIES OF HIGHLY-ACTIVE ALKALINE PHOSPHATASE CmAP AND PORE-FORMING MEMBRANE OmpF PROTEIN, AND RECOMBINANT STRAIN OF E. COLI ROSETTA (DE3)/pET40CmAP/OmpF - PRODUCER OF BIFUNCTIONAL HYBRID CmAP/OmpF POLYPEPTIDE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

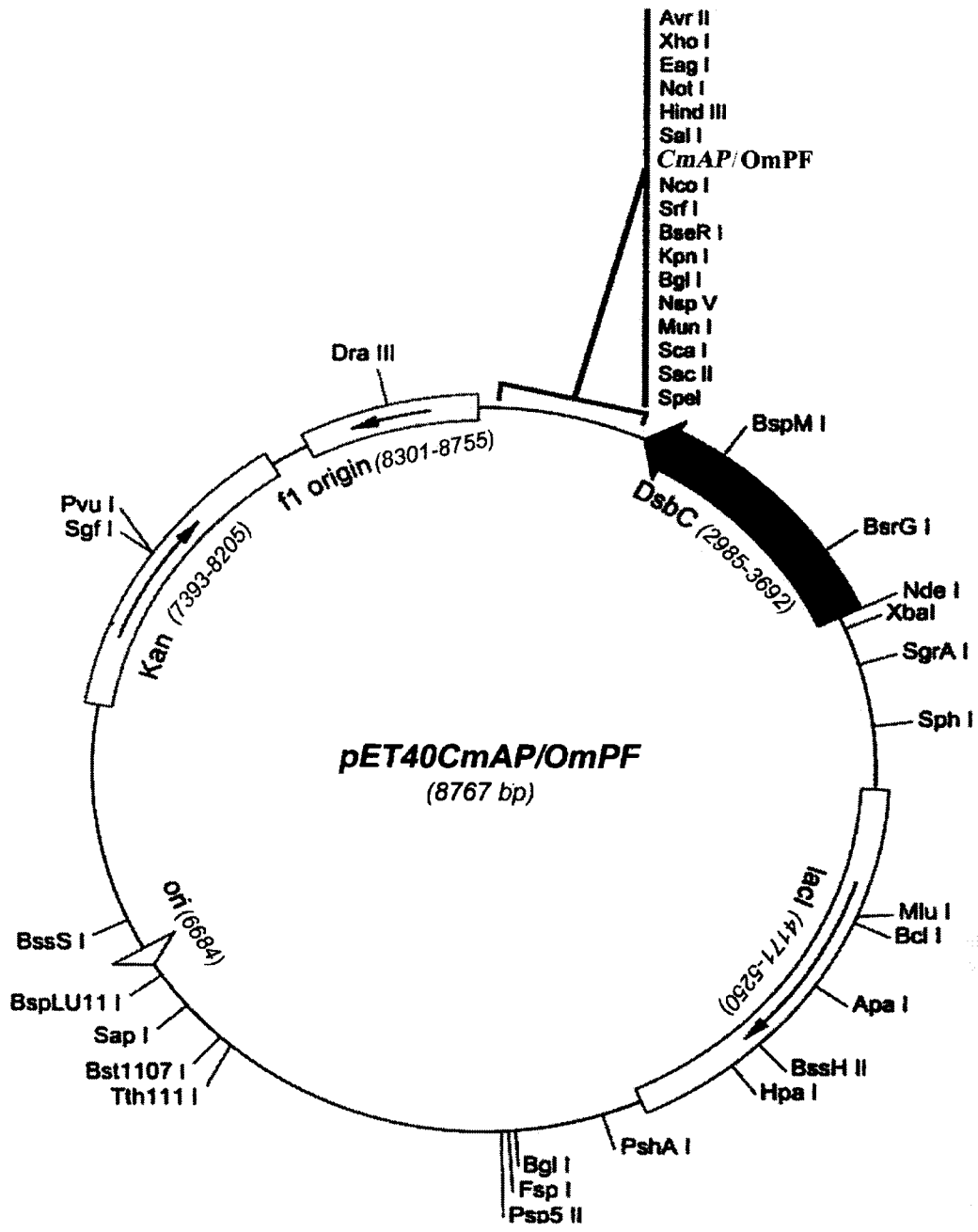
SUBSTANCE: said plasmid is characterized by presence of the following fragments: a NcoI/SalI fragment of pET-40b(+) plasmid (Novagen) and a 2577 bp DNA fragment containing a chimeric gene encoding the full-length alkaline phosphatase CmAP and the full-length Yersinia pseudotuberculosis OmpF porin, linked together by a sequence encoding a flexible linker (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1). A recombinant strain of E. coli Rosetta

(DE3)/pET40CmAP/OmpF, which is a producer of a bifunctional hybrid CmAP/OmpF polypeptide, and which is obtained by modification of the E. coli Rosetta (DE3) strain with this pET40CmAP/OmpF plasmid, is proposed.

EFFECT: high yield of hybrid protein with the properties of recombinant highly-active alkaline phosphatase and pore-forming protein.

2 cl, 2 dwg, 3 ex

1 C 1 7 8 4 8 7 1 C 1



Фиг. 1

R U 2 6 3 4 8 7 1 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и позволяет получать микробиологическим синтезом по оптимизированной технологии новый гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* и высокоспецифичного к антителам больных псевдотуберкулезом порина *Yersinia pseudotuberculosis*, который может быть использован для улучшения диагностической тест-системы псевдотуберкулеза.

Псевдотуберкулез, или экстраинтестинальный иерсиниоз, относится к числу широко распространенных инфекций, что, в первую очередь, обусловлено высокой адаптационной способностью такого возбудителя, как *Y. pseudotuberculosis* [Г.П. Сомов, Н.Н. Беседнова, Ф.Ф. Антоненко. Псевдотуберкулез. М.: Медицина, 2001, 256 с.]. Порины, или интегральные порообразующие белки наружной мембраны бактерий, как поверхностные антигены представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета макроорганизма, которые активируют факторы немедленной защиты и участвуют в формировании специфического иммунного ответа, направленного на освобождение от патогена. Особенности структуры и поверхностная локализация в клетке обуславливают участие поринов в осуществлении динамической связи между бактериями и окружающей средой.

Из бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 512, серовар IB) был выделен белок - порин, названный иерсинином, относящийся к термозависимым порообразующим белкам наружной мембраны грамотрицательных бактерий, ассоциированным с пептидогликаном [О.Д. Новикова, Г.М. Фролова и др. Конформационная стабильность и иммунохимические свойства иерсинина - основного белка внешней мембраны псевдотуберкулезного микроба // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 763-772]. При иммунизации экспериментальных животных этим белком была получена специфическая антисыворотка с высоким титром. В ряду поверхностных белков иерсинин принадлежит к числу иммунодоминантных антигенов наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба. Показано, что при иммунизации как крупных, так и мелких лабораторных животных в сыворотке крови обнаруживаются антитела к иерсинину. При естественном развитии заболевания у людей антитела к порину преобладают. Иерсинин реагирует не только с антисыворотками к бактериям всех 6-ти сероваров *Y. pseudotuberculosis*, но и с антисыворотками к бактериям других видов иерсиний.

На основе этих результатов разработан иммуноферментный метод (ИФА) для диагностики псевдотуберкулеза с использованием иерсинина в качестве диагностического антигена [О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова и др. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний // Вестник ДВО РАН, 2004. №3, с. 35-44; RU 2339952 C1, 27.11.2008]. Данная диагностическая тест-система отличается от коммерческого диагностикума на основе типоспецифических липополисахаридов тем, что в сыворотках больных обнаруживаются антитела ко всем вариантам возбудителя псевдотуберкулеза. Высокая чувствительность тест-системы позволяет выявлять развитие инфекционного процесса на ранних стадиях (7-10 дней от начала проявления клинических признаков).

Известно, что ИФА диагностика на основе типоспецифических антигенов требует долговременной подготовки и многочисленных затрат на коммерческие антитела. Такого рода проблемы можно решить при помощи заявляемой конструкции бифункционального белка CmAP/OmpF, обладающего свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*, высокочувствительного по отношению к антителам к возбудителю псевдотуберкулеза.

Методами молекулярного клонирования установлены структуры порина OmpF [GenBank, код доступа AY855840] и щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* ВКМ В-2021 Д (CmAP) [GenBank, код доступа ABD92772]. Описаны методы получения высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP [RU 2447151 C1, 10.04.2012] и рекомбинантного порина OmpF в виде телец включения в клетках *E. coli* с последующим его рефолдингом и очисткой [Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д. и др. Выделение и характеристика рекомбинантного OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Биоорган. химия. 2008. №2. С. 1-8].

Задача изобретения - конструирование рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli*, несущего такую экспрессирующую конструкцию (плазмиду), которая позволит получать в препаративных количествах целевой продукт - высокоочищенный недеградированный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF в водорастворимой форме с сохранением как антигенной активности OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*, так и ферментативных свойств высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP, используемой для цветной визуализации поринсвязанных комплексов в иммуноферментном методе диагностики иерсиниоза на разных стадиях развития инфекционного процесса.

Поставленная задача решена путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующей химерный полипептид CmAP/OmpF, и рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF, обеспечивающих индуцируемый синтез с высоким и стабильным выходом активного растворимого бифункционального белка CmAP/OmpF, обладающего свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и высокочувствительного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*.

Технический результат заявленного изобретения - получение растворимого активного гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и высокочувствительного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* с высокими выходом и уровнем очистки.

Плазмида pET40CmAP/OmpF имеет 8767 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen), или последовательности фрагмента ДНК размером 2577 п.о., содержащего химерный ген, начинающий трансляцию со щелочной фосфатазы CmAP (N-конец) и заканчивающийся порином OmpF с C-концевой части молекулы рекомбинантного белка, соединенным со щелочной фосфатазой гибким линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>.

На фиг. 1 представлена физическая карта плазмиды pET40CmAP/OmpF и область плазмиды, ответственная за экспрессию гибридного белка CmAP/OmpF. Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pET40CmAP/OmpF, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержит последовательность структурного гена CmAP, соответствующую открытой рамке считывания для зрелого белка CmAP, последовательность соединяющего линкера (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> и последовательность структурного гена OmpF, соответствующую открытой рамке считывания для белка OmpF (SEQ ID NO: 1).

Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF получен трансформацией клеток *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen) плазмидой pET40CmAP/OmpF с использованием традиционной генно-инженерной технологии [Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A. Laboratory Manual*. 2bd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989].

Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF 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. Грамотрицательные, 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/OmpF 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/OmpF -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)/pET400CmAP/OmpF не патогенен и не токсичен для теплокровных животных.

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

Способ получения гибридного бифункционального белка CmAP/OmpF заключается в следующем: клетки штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF культивируют в жидкой питательной среде LB в течение 18 ч при 16°C, затем бактериальные клетки осаждают центрифугированием, суспензию клеток дезинтегрируют в буфере, далее экстракт центрифугируют, затем надосадочную жидкость помещают на колонку с Ni-сефарозой (GE Healthcare), далее элюируют белок с 0,5 М имидазолом, затем белковый элюат помещают на колонку с ионообменной смолой для удаления имидазола и получения активной фракции целевого белка. Выход рекомбинантного гибридного бифункционального белка CmAP/OmpF составляет не менее 10 мг рекомбинантного белка из 1 л культуры с удельной активностью щелочной фосфатазы не менее 1000 ед/мг белка и свойствами OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*, характерными для природного аналога.

Рекомбинантный гибридный бифункциональный белок CmAP/OmpF имеет молекулярную массу 127,5 кДа, включая плазмидный шаперон DsbC с молекулярной массой 32,5 кДа, широкий диапазон значений температуры (25-37°C) и pH 7,5-9,5 для проявления фосфатазной активности и антигенных свойств порина OmpF. Плазмидный шаперон Dsb не дает существенного вклада в функциональную способность обеих частей химеры CmAP/OmpF, поэтому этап его удаления из рекомбинантного белка с помощью энтерокиназы по предусмотренному генетической конструкцией сайту рестрикции не обязателен.

Рекомбинантный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF успешно апробирован в ИФА тест-системах при связывании с антителами к поринам иерсиний в мышинных антисыворотках к рекомбинантному порину OmpF, а также в сыворотках крови больных иерсиниозом независимо от серологического варианта возбудителя *Y. pseudotuberculosis*. Использование ИФА тест-системы на основе бифункционального порина CmAP/OmpF позволит обеспечить высокий уровень дифференциальной диагностики иерсиниозов от других острых кишечных инфекций со сходными клиническими признаками как на ранних (первая неделя), так и поздних стадиях (вторая

- четвертая неделя) развития инфекционного процесса.

На фиг. 2 представлены результаты ИФА, проведенного на микропланшете (Costar), сенсibilизированном антителами из мышинной антисыворотки к рекомбинантному порину OmpF и антителами из сывороток крови больных иерсиниозом с применением гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF, полученного от рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40 CmAP/OmpF. Уровень аффинности гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF к специфическим антителам определяли по концентрации поринсвязанных комплексов, измеренной в единицах активности щелочной фосфатазы CmAP.

Использование порина в составе гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF с активностью щелочной фосфатазы позволяет сократить ИФА на две стадии по сравнению с процедурой, которая требовалась раньше (иммобилизация белка и использование вторых антител).

Существенными преимуществами вышеописанного способа получения гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF являются:

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

- использование несложной двухстадийной хроматографической очистки

рекомбинантного белка, что позволяет получить чистый гибридный полипептид CmAP/OmpF за короткое время и с большим выходом.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Конструирование плазмиды pET40CmAP/OmpF

Рекомбинантную плазмиду pET40CmAP/OmpF, содержащую химерный ген, кодирующий полноразмерную щелочную фосфатазу CmAP и полноразмерный порин *Y. pseudotuberculosis* OmpF, соединяющиеся через гибкий линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>, фланкированный сайтами рестрикции NcoI и SacI, конструируют на основе коммерческой плазмиды pET-40b(+) (Novagen).

Фрагмент ДНК, содержащий химерный ген гибридного полипептида CmAP/OmpF, получают в два этапа. На первом этапе проводят полимеразную цепную реакцию с использованием плазмиды 40Pho в качестве матрицы для получения гена щелочной фосфатазы CmAP и праймеров X-PhoN\_F и Pho40X-SacI-R, где X-PhoN\_F - праймер, специфичный по отношению к N-концевой последовательности CmAP, включающий сайт для рестриктазы NcoI; Pho40X-SacI-R - обратный праймер, специфичный по отношению к C-концевой последовательности CmAP, включающий полинуклеотид, кодирующий линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> и сайт рестрикции SacI:

X-PhoN\_F: 5'-TATTCCATGGCAGAGATCAAGAATGTCAATTCTGAT-3'

Pho40X-SacI-R: 5'-TTAAGAGCTCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCA  
GAACCACCACCACCCTTCGCTACCACTGTCTTCAGATACTGTCCT-3'.

Данную реакцию проводят в следующих условиях: 10× Encyclo буфер, 50× смесь полимераз Encyclo («Encyclo PCR kit», Евроген, Москва), 50× смесь dNTP (10 mM каждого), смесь праймеров (5 μM каждого), 20 нг ДНК. Процесс амплификации состоит из следующих стадий: 30 циклов ПЦР (15 с - 95°C, 1 мин 30 с - 72°C) и инкубация 10 мин при 72°C. 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 ч, затем ферменты удаляют из реакционной среды по стандартной методике фенолом (1:1) [Sambrook J. et. al. Molecular Cloning. A. Laboratory Manual. 2bd ed. Cold Spring Harbor, NY, 1989]. В водную фракцию, содержащую



фрагмент, добавляют 1/10 объема 0,3 М ацетата Na, pH 5,2 и 1/2 объема изопропилового спирта и оставляют на -20°C 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 деионизованной воды.

5 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  
10 клеток *E. coli* Rosetta (DE3). Трансформанты высевают на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 ч при 37°C клоны отсевают, выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают плазмидную ДНК pET40CmAP,  
15 содержащую последовательность CmAP с линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> на С-концевой части.

На втором этапе проводят амплификацию гена OmpF белка с использованием геномной ДНК грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis* и пары праймеров, несущих сайты рестриктаз SacI и SalI:

OmpF40-Sac-dir: 5'-ТТААGAGCTCCGAAATCTATAACAАAGATGGCAACA-3'

20 OmpF40-Sal-rev: 5'-ТТААGTCGACTTAGAACTGATAAACCAAGCCAAC-3'

Для создания конструкции pET40CmAP/OmpF полученный ген порина OmpF и 2 мкг плазмидной ДНК pET40CmAP обрабатывают рестриктазами SacI и SalI в соответствии с методикой, описанной выше, и очищают в 1% геле легкоплавкой агарозы. Очищенные  
25 ПЦР-фрагменты OmpF и векторную часть плазмиды pET40CmAP сшивают при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции к лигазе (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°C клоны отсевают,  
30 выделяют плазмидную ДНК и анализируют на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Отбирают ДНК, содержащую необходимые последовательности генов CmAP и OmpF, представляющую собой плазмиду pET40CmAP/OmpF размером 8767 п.о. (фиг. 1).

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

35 Рекомбинантный штамм-продуцент *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF получают путем трансформации клеток штамма *E. coli* Rosetta (DE3) рекомбинантной плазмидой pET40CmAP/OmpF. Ночную культуру (0,5 мл LB) рекомбинантного штамма-продуцента гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF помещают в пятилитровую колбу с жидкой средой МХ, содержащей на литр 10 г бактотриптона, 7,5 г  
40 бактодрожжевого экстракта, 70 г сорбитола, до 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мл глицерина, 12 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 25 мг/мл канамицина, pH 7,7, культивируют на шейкере при 200 об/мин при температуре 37°C в течение 3-4 ч до оптической плотности 0,6-0,8 (OD 600 нм), затем проводят процедуру «heat shock» нагреванием при 42°C в течение 30 мин, после чего  
45 охлаждают и добавляют индуктор экспрессии IPTG до конечной концентрации 0,2 мМ, далее инкубируют при 16°C в течение 18 ч.

Для определения продуктивности штамма водные клеточные 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/OmpF

Рекомбинантный штамм-продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF - *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF инкубируют в пятилитровой колбе в жидкой среде MX, содержащей на литр 10 г бактотриптона, 7,5 г бактодрожжевого экстракта, 70 г сорбитола, до 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4 мл глицерина, 12 г KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 25 мг/мл канамицина, рН 7,7, на шейкере при 200 об/мин 18 ч при 16°C. Бактериальные клетки осаждают на проточной центрифуге при 5000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток дезинтегрируют ультразвуком в 20 мл буфера А (0,05 М трис-НСl, рН 8,5, 0,01% NaN<sub>3</sub>) 5 раз в течение 30 с, охлаждая во льду. Затем суспензию центрифугируют при 10000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость собирают и помещают на колонку с Ni-сефарозой (GE Healthcare). Элюцию белка проводят 0,5 М имидазолом в буфере А. Фракцию с элюированным белком помещают на колонку с ионообменной смолой MonoQ (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А. Элюцию белка проводят буфером В (25 мМ Tris-НСl, рН 8,5), градиенте соли NaCl (0-0,5 М), фракции с активностью щелочной фосфатазы собирают.

Выход рекомбинантного белка составляет 10 мг из 1 л культуры.

Идентификацию полученного рекомбинантного полипептида проводят по первым 10 аминокислотам на автоматическом секвенаторе. Секвенирование препарата рекомбинантного белка, выделенного из клеток штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF, показало, что N-концевой составляющей химерного белка CmAP/OmpF является аминокислотная последовательность Ala-Glu-Ile-Lys-Asn-Val-Ile-Leu-Met-Ile, соответствующая первым 10 аминокислотам щелочной фосфатазы CmAP.

Ферментативную активность гибридного полипептида CmAP/OmpF определяют по расщеплению пара-нитрофенилфосфата (п-НФФ). Стандартная инкубационная смесь в объеме 500 мкл содержит 15 мМ п-НФФ, 1 М диэтанолamina (ДЭА), рН 10,3; либо 2 мМ п-НФФ, 0,1 М трис-НСl, 0,2 М KCl, рН 9,5-10,0 и фермент. После 30 мин инкубации при 37°C реакцию останавливают добавлением 2 мл 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции п-нитрофенола (п-НФ) определяют спектрофотометрически при длине волны 400 нм. За единицу активности щелочной фосфатазы принимают количество фермента, катализирующего освобождение 1 мкМ п-НФ ( $\epsilon_{400 \text{ нм}} = 18600$ ) в течение 1 мин инкубации. Удельную активность выражают в единицах активности фермента на 1 мг белка. Концентрацию белка в растворе определяют по методу Брэдфорда.

Антигенную активность пориновой части гибридного полипептида CmAP/OmpF определяют методом ИФА по уровню аффинности к специфическим антителам к порину OmpF (фиг. 2). В лунки микропланшета, сенсibilизированного мышиной поликлональной специфической сывороткой к рекомбинантному порину OmpF и сыворотками крови больных иерсиниозом, добавляют раствор гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF, полученного от рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40 CmAP/OmpF, в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл. Уровень аффинности рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF к специфическим антителам определяют по концентрации CmAP/OmpF-связанных комплексов, измеренной в единицах активности щелочной фосфатазы CmAP.

Полученные данные по характеристике и функциональной активности продукта

экспрессии искусственного химерного гена гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF свидетельствуют о соответствии антигенной активности исследуемого полипептида таковой его природного аналога - порина OmpF, применяемого в ИФА диагностике псевдотуберкулеза, или экстраинтестинального иерсиниоза.

Как следует из приведенных примеров, авторы получают активный рекомбинантный гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP и высокоспецифичного порина грамтрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis* с высоким выходом при относительно простой и надежной технологии.

Заявленное изобретение позволяет:

- с помощью использования рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF получать путем биосинтеза большое количество растворимого активного гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF;
- использование металлоаффинной и ионообменной хроматографий при очистке рекомбинантного белка из водного экстракта клеток рекомбинантного штамма-продуцента позволяет получать гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF с чистотой не менее 98% в качестве аналога природного иммуногенного порина *Y. pseudotuberculosis* OmpF, связывающийся со специфическими к порину антителами, конъюгированный ферментной меткой, применяемого для проведения ИФА при диагностике псевдотуберкулеза, или экстраинтестинального иерсиниоза.

#### (57) Формула изобретения

1. Плазмида pET40CmAP/OmpF размером 8767 пар оснований (п.о.), определяющая синтез рекомбинантного гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF и характеризующаяся наличием следующих фрагментов: NcoI/SalI-фрагмента плазмиды pET-40b(+) (Novagen) и фрагмента ДНК размером 2577 п.о., содержащего химерный ген, кодирующий полноразмерную щелочную фосфатазу CmAP и полноразмерный порин *Yersinia pseudotuberculosis* OmpF, соединенные между собой последовательностью, кодирующей гибкий линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1).

2. Рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF, полученный путем модификации штамма *E. coli* Rosetta (DE3) плазмидой pET40CmAP/OmpF по п. 1, - продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF.

## Перечень нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

<110> Балабанова Л.А., Голотин В.А., Буйновская Н.С., Портнягина О.Ю.,  
Новикова О.Д., Рассказов В.А.

<120> Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ40CmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и порообразующего мембранного белка порина OmpF, и рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/OmpF – продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF.

<160> 1

<210> 1

<211> 2577

<212> ДНК

<213> *Cobetia marina* ВКМ В-2021 Д, *Yersinia pseudotuberculosis*

<223> Нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ40CmAP/OmpF, фланкированная сайтами NcoI и SalI, содержащая последовательности гена щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia marina* ВКМ В-2021 Д (CmAP), включая последовательность линкера (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>, и гена порообразующего мембранного белка *Y. pseudotuberculosis* (OmpF), соответствующая открытой рамке считывания для гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF.

<400> 1

SalI

```

195  GTCGACTTAG  AACTGATAAA  CCAAGCCAAC  AGCAACAACG  TCGTCTGTCA  TGATTCGGTT
    CAGCTGAATC  TTGACTATTT  GGTTCGGTTG  TCGTTGTTGC  AGCAGACAGT  ACTAAGCCAA

255  AACTTCTGTG  AACAGGTCTT  TGTCCAACAG  GTTGATTTTG  TAATCAACAT  AGGTAGACAT
    TTGAAGACAC  TTGTCCAGAA  ACAGGTTGTC  CAACTAAAAC  ATTAGTTGTA  TCCATCTGTA

315  GTTTTTGTTG  AAGTAGTAGT  AAGTACCAAC  AGAAACATAT  TTCACCAGAT  CATGGTTAGC
    CAAAAACAAC  TTCATCATCA  TTCATGGTTG  TCTTTGTATA  AAGTGGTCTA  GTACCAATCG

375  ATCAACATTG  TTCAGATCCT  TACSTTTGGA  TTGAACATAA  CCCAGTGATG  GCGCGAGACC
    TAGTTGTAAC  AAGTCTAGGA  ATGGAAACCT  AACTTGTATT  GGGTCACTAC  CCGCGTCTGG

435  AAAGTCGAAC  TGATACTGTG  CGGTGATTC  GATATCGCGA  GTCTTGTTCG  CGATGGTGAA
    TTTAGCTTGG  ACTATGACAC  GCCACTAAAG  CTATAGCGCT  CAGAACAAGC  GCTACCACTT

495  ATCATAAAAA  CCGTATGGAG  TCAGGTTCTG  AGTCTCAGCA  TACATTACAG  CCAGGTATAC
    TAGTATTTTT  GGCATACCTC  AGTCCAAGAC  TCAGAGTCGT  ATGTAATGTC  GGTCCATATG

555  GTTGTTTGCG  TCGTATTTAG  CACCAACGTT  CCATGCCTGA  GCTTTGTTCG  STTCAGCGGT
    CAACAAACGC  AGCATAAATC  GTGGTTGCAA  GGTACGGACT  CGAAACAGCG  GAAGTCGCCA

615  AGAACCATAT  TTTTGATCAA  GAGTACGGTT  TGAAGAAGAG  AAACCAGCAC  CGAAGTTAAT
    TCTTGGTATA  AAAACTAGTT  CTCATGCCAA  ACTTCTTCTC  TTTGGTCGTG  GCTTCAATTA

675  GCCATTACCG  AGATCATAAG  TAGAACCGAT  ACCGAAGCCG  TCACCGTTAG  STTCTTTGAC
    CGGTAATGGC  TCTAGTATTC  ATCTTGGCTA  TGGCTTCGGC  AGTGGCAATC  GAAGAAACTG

```

735 TTCAGAACGG TCATTTTTCG CTTGGTATTG CAGGGCAAAG TTCAGGCCGT CAACCATACC  
 AAGTCTTGCC AGTAAAAACG GAACCATAAC GTCCCGTTTC AAGTCCGGCA GTTGGTATGG  
 795 GAAGAAATTG TTGTTACGGT AAGTTGCCAG GCCAGTAGAA CGGCCAGTCA TGAAGTTGTC  
 CTTCTTTAAC AACAAATGCCA TTCAACGGTC CGGTCACTCT GCCGGTCAGT ACTTCAACAG  
 855 AGAGTTGGAG ATTGAATCAC CACCGAACAC TGGCAGCATG TCAGTCCATG CGTTAACGTC  
 TCTCAACCTC TAACTTAGTG GTGGCTTGTC ACCGTCGTAC AGTCAGGTAC GCAATTGCAG  
 915 ATAGATTACG CCGTAGTTAC GGCCATAGTC GAATGAACCG AATTCAGCAA ATTTAGACC  
 TATCTAATGC GGCATCAATG CCGGTATCAG CTTACTTGGC TTAAGTCGTT TAAAGTCTGG  
 975 AGCAAAGCCC AGACGGGTTG CGTTGCCGTC TTGAGCGCCT GAATCTTCAG CGTTGTTTGC  
 TCGTTTCGGG TCTGCCAAC GCAACGGCAG AACTCGCGGA CTTAGAAGTC GCAACAAACG  
 1035 TTGAATGTTG TATTCCTACT GGCCGTAACC GGTCAAGTTG TCAGTAATTT GGGTTTACC  
 AACTTACAAC ATAAGGGTGA CCGGCATTGG CCAGTCAACC AGTCATTAAA CCCAAAGTGG  
 1095 TTTGAAGCCG AAACGAACGT AAGACTTGTC GCCATCTTGT TTGTGTTTAT CGGAGAAAGA  
 AAACCTTCGGC TTTGCTTGCA TTCTGAACAG CGGTAGAACA AACAAACAATA GCCTCTTTCT  
 1155 GTGACGTGCG TCAACTTTAC CGTACAGGTC AAGTTTGTG TTGCCATCTT TGTATAGAT  
 CACTGCACGC AGTTGAAATG GCATGTCCAG TTCAAACAAC AACGGTAGAA ACAATATCTA  
 1215 TTCGAGTCA GAACCACCAC CACCAGAACC ACCACCACCA GAACCACCAC CACCCTTCGC  
 AAGCTCGAGT CTTGGTGGTG GTGGTCTTGG TGGTGGTGGT CTTGGTGGTG GTGGGAAGCG  
 1275 TACCACTGTC TTCAGATACT GTCCTATCTC GGAATGGTGC AGGATGGAAG AGACCGGCAA  
 ATGGTGACAG AAGTCTATGA CAGGATAGAG CCTTACCACG TCCTACCTTC TCTGGCCGTT  
 1335 GATGTCGTTG GCTGGCCCC ATGCAAAGAC GTTACTGGC GTATGGGTGT GCGTACCAGT  
 CTACAGCAAC CGACCGGGG TACGTTTCTG CAACTGACCG CATACCACA CGCATGGTCA  
 1395 CCCCCAGACG GTGTTTTGCT GTGTCGCCAA TGCCCGGCC AGCAGGTTGC GCGCATGTT  
 GGGGGTCTGC CACAAAACGA CACAGCGGTT ACGGGCGCGG TCGTCCAACG GCGCTAGCAA  
 1455 ATAGGGGAAG AAGGCGTCGA AGTCGTGAAC TGCCGGCACC TCGCTGACCC CGAGGTAAC  
 TATCCCCTTC TTCCGCAGCT TCAGCACTTG ACGGCCGTGG AGCGACTGGG GCTCCATTGA  
 1515 ATGTCCATCC ACATGATAGG GGTGGGCTT GTTGGCCAGT ACTTCAGCTG CCTGGGCTTC  
 TACAGGTAGG TGTACTATCC CCAACCCGAA CAACCGGTCA TGAAGTCGAC GGACCCGAAG  
 1575 GGAATCTGG AAGTCACTAT TGCCATTGAC AGCCGCCATC AAGCGAGCCG GTGTGCGCTC  
 CCATTAGACC TTCAGTGATA ACGGTAACGT TCGGCGGTAG TTCGCTCGGC CACACGCGAG  
 1635 ACCTTGCGGT AGTGCCTCGA AATCACTGAG CAGCTCGTAA TAGTCTGCT TCTGCTCATA  
 TGGAACGCCA TCACGGAGCT TTAGTGACTC GTCGAGCATT ATCCAGACGA AGACGAGTAT  
 1695 GAGACTGTCC AGAATCGAGA AGTCACCAA ATTGAAATTG GGAGCGTAAT CCTGATCTGC  
 CTCTGACAGG TCTTAGCTCT TCAGTGGTTT TAACTTTAA CCTCGCATTA GGACTAGACG  
 1755 GAATGCAGGG CCTGATTICT TCTGCGCTGC CGGTAAATTG GCGCTGGAAT AACTGAAGCC  
 CTTACGTCCC GGAATAAAGA AGACGCGACG GCCATTTAAC CGCGACCTTA TTGACTTCGG  
 1815 GAATGCTCCC GTCTCATGGT CGGCCGTTAC CAGGATTATT GTATCGTCTC GGTCTCGCGC  
 CTTACGAGGG CAGAGTACCA GCCGGCAATG GTCCTAATAA CATAGCAGAG CCAGAGCGCG  
 1875 CCAGTCAAAG ACACCTTGCA CGGCCTCATC GAACCTGATC AGTTCATTGA GCATGGTGCC  
 GGTCAGTTTC TGTGGAACGT GCCGGAGTAG CTTGAACTAG TCAAGTAACT CGTACCACGG  
 1935 CGCATCATTG GAATGCGCGG CCCAGTCGAT CTGGCCACCC TCGACCATCA AAAAGAAACC  
 GCGTAGTAAC CTTACGCGCC GGGTCAGCTA GACCGGTGGG AGCTGGTAGT TTTTCTTTGG

1995 ATCATCATCC TGTTCAAGCA TTGACAGTGC TTTTGGGTC ATCTCATGCA GGGTCGGCTG  
 TAGTAGTAGG ACAAGTTCGT AACTGTCACG AAAAAACCAG TAGAGTACGT CCCAGCCGAC

2055 CTGACGCTGT GGGTCATCAT GGCTATCTCG AAAGCTGATA CCATCCGCCA TACCCGAGTT  
 GACTGCGACA CCCAGTAGTA CCGATAGAGC TTTGCGACTAT GGTAGGCGGT ATGGGCTCAA

2115 GGCGAATAGC CCCAATACCT TGGTGCCATT GAGTGCGGCC ATCTGATCAC GCGTAAAGGC  
 CCGCTTATCG GGGTTATGGA ACCACGGTAA CTCACGCCGG TAGACTAGTG CGCATTTCGG

2175 TAGCCCATAG CCTTGATCTG CAGCTTCCTG GAGCAGATTT CGTTCATCCT TGCGCTTGGA  
 ATCGGGTATC GGAAGTAGAC GTCGAAGGAC CTCGTCTAAA GCAAGTAGGA ACGCGAACCT

2235 GGTGCGGAC CAGGCACCTT GCATCAGCGT CTCGACACTG CCCGCGCTTT CCCCGGCTC  
 CCAACCGCTG GTCGGTGAA CGTAGTCGCA GAGCTGTGAC GGGCGCGAAA GGGGGCCGAG

2295 ACTGACGGAG TATGGCAGCA AGTGACGCAA CCCTCCGAC AGCATGACAT CCGGCCAGT  
 TGACTGCCTC ATACCGTGCT TCACTGCCTT GGGAGGGCTG TCGTACTGTA GGCCGGGTCA

2355 CATGAGCATG TCTTCGGCAA TGGCATTTC CAGTGAACGA TGCGGCTGGT GGGCGGCGAA  
 GTACTCGTAC AGAAGCCGTT ACCGTAAAAG GTCACTTGCT ACGCCGACCA CCCGCCGCTT

2415 GGCCGCGCGA GTCGCGTGGG TCAGGCGCGT ATCGGACACC AATCCGCTGG CCTTGCCGAC  
 CCGGCGGCTT CAGCGCACCC AGTCCGCGCA TAGCCTGTGG TTAGGCCACC GGAACGGCTG

2475 TCGTTTGGCA AGCTCGAGGA CGGTTTCCAC CCGATTACCC TCTGAATCTA TGCCGATCAC  
 AGCAAACCGT TCGAGCTCCT GCCAAAGGTG GGCTAATGGG AACTTAGAT ACGGCTAGTG

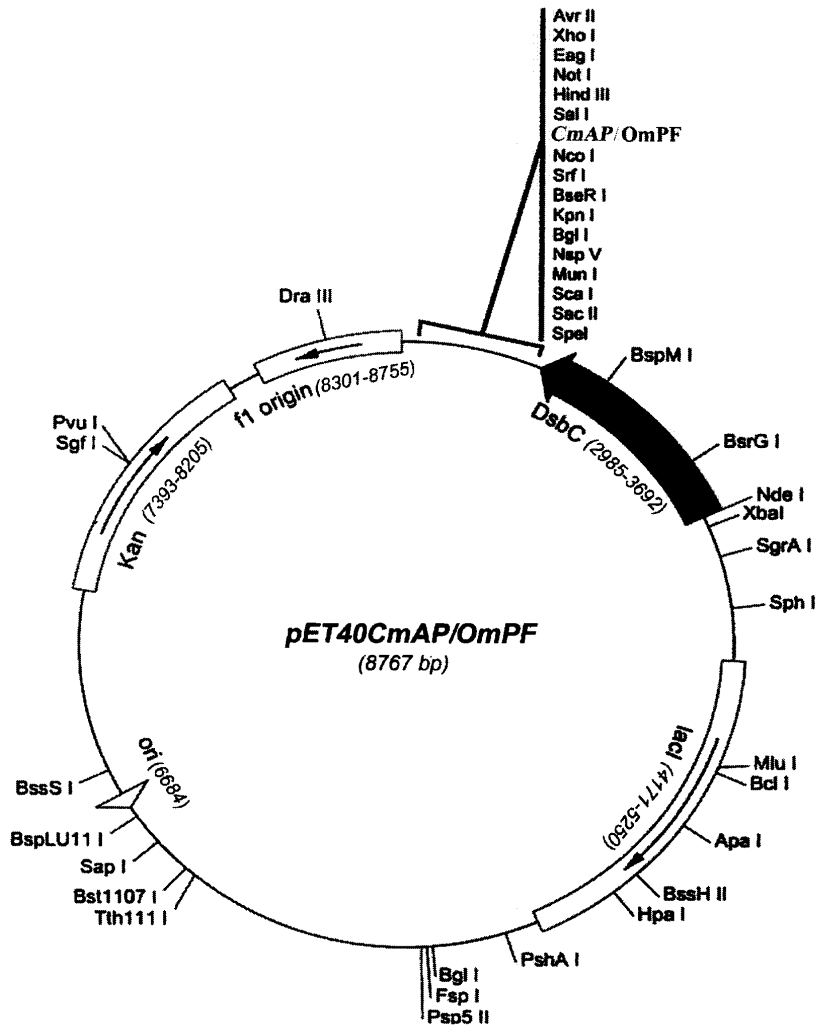
2535 CTCGCCCCCG GTGAAGATAC CCGTCGAGAG CTGAGTCGCT GAACAGGCCG AATCCACTAC  
 GAGCGGGGGC CACTTCTATG GGCAGCTCTC GACTCAGCGA CTGTGCCGGC TTAGGTGATG

2595 CACGGCATCT TCAGGGTGAG TCAATGAAGC GCCCACCACG CCTTCCTTCG CCAGCTGGTA  
 GTGCCGTAGA AGTCCCACCT AGTTACTTCG CGGGTGGTGC GGAAGGAAGC GGTGACCAT

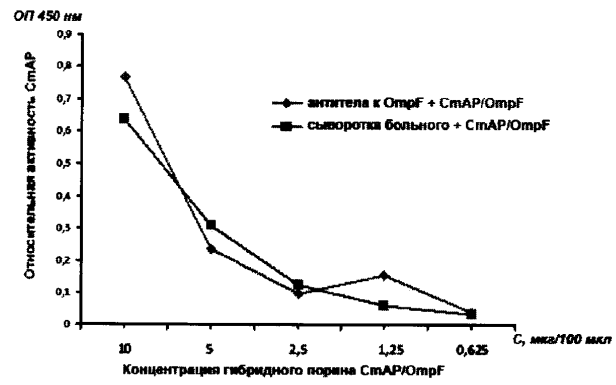
2655 GAGTGCCGTC GAACGCCCTT GATATATCGA ATCCGGCGCA CGATTGGCGT ATGTCTCCAG  
 CTCACGGCAG CTTGCGGGAA CTATATAGCT TAGGCCGCGT GCTAACCGBA TACAGAGGTC

2715 CATGCCAACC TGCTGGGGCC CCATGCCATC GCCAATCATC AGAATGACAT TCTTGATCTC  
 GTACGGTTGG ACGACCCCGG GGTACGGTAG CGGTTAGTAG TCTTACTGTA AGAACTAGAG

2775 TGCCATGG  
ACGGTACC  
 NcoI



Фиг. 1



ФИГ 2