

Винахід відноситься до розділу молекулярної біології, генної інженерії і може бути використаний при біотехнологічному синтезі білка **GAG** ВІЛ-1 і в медицині для конструювання тест-систем, придатних для виявлення антитіл до ВІЛ в сироватках крові пацієнтів.

Прототипами винаходу є сімейство бактеріальних експресійних векторів в типу **pEX1-3** (Keith K Stanley and Paul Luslo., Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones for human liver proteins // EMBO Journal, v.3, N6, pp.1429 - 1434). Ці вектори походять від **cro-lacZ** злитних плазмид, які експресують велику кількість злитних білків під контролем **Pr** промотору фагу лямбда.

У основу винаходу покладене завдання створити генноінженерну конструкцію, яка забезпечить мікробіологічний синтез в **E.coli** злитного білка **GAG** ВІЛ-1 у склад якого входять послідовності амінокислот білків **GAG** ВІЛ-1: **p17, p24, p15**.

Суть винаходу полягає в одержанні модифікованої послідовності плазмідної ДНК, відповідаючої за синтез злитного білка **GAG** в бактеріях **E.coli**. Для цього була створена рекомбінантна плазміда **pK1724**, яка містить наступні інсерційні фрагменти ДНК: фрагмент гену **cro** розміром - фрагмент **LacI**, розміром 114н., - делетований фрагмент **LacZ**, розміром 426н., - фрагменти ДНК, відповідаючі за послідовності білків **GAG p17**, розміром 354н., **p24**, розміром 690н. і **p15**, розміром 222н. фрагменти ДНК з'єднували ДНК-лігазою фага **T4** і одержаним лігатом трансформували клітини **E.coli**.

Рекомбінантні клони **E.coli** нарощували і тестували методом імуноблотінгу, використовуючи сироватки крові людини які утримували антитіла до ВІЛ-1. Подальша модифікація плазмиди складалась в одержанні делеції розміром 630н.п. в області бета-галактозидного гена рестриктазою **HpaI**. Фізична карта одержаного плазмидного вектора приведена в додатку 1. Плазміда **pK1724** кодує гібридний білок молекулярною масою 70,376Д.

Штам - продуцент гібридного білка **(ITG- 36)** одержували трансформацією клітин **E.coli Y1090** плазмідною **pK1724**.

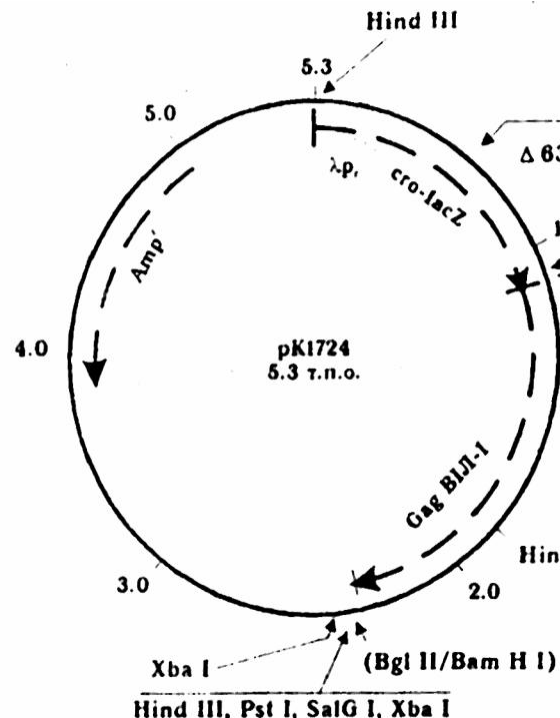
Клітини-продуценти ростуть добре на простих поживних середовищах при температурах 32 - 42 градуси. При рості на м'ясо-пептонному поживному агарі формують гладкі, круглі, плоскі, сірі, блискучі колонії з рівними краями. При рості на рідких поживних середовищах утворюють інтенсивну муть.

Клітини не споживають ацетат, аданіт, лактозу, ксилозу. Джерелом азоту з'являються пептон, амінокислоти і мінеральні солі в амонійній і нітратній формах. Клітини ростуть при pH 5,0 - 8,0. Синтез гібридного білка відбувається при вирощуванні культури **E.coli ITG-36** при температурі 32 - 42 градуси **С**.

В оптимальних умовах ферментації рекомбінантного штама гібридний білок

нагромаджується усередині клітин в нерозчиненій формі у вигляді тілець включення і по кількості складає до 10 - 20% всього білка клітин.

Клітини рекомбінантного штамму виявляють стійкість до ампіциліну обумовлену рекомбінантною плазмідною **pK1724**.



Рестриційна карта рекомбінантної плазмиди **pK1724**
Δ - делеція

Амінокислотна послідовність рекомбінантного білка

pGAG BIL-1, 623 амінокислоти. Молекулярна маса рекомбінантного білка 70376 Д. Ізoeлектрична точка рекомбінантного білка **PI=8,54**.

MEQRITLKEA	WDRSGAWLLP	VSLVKKRITL	APNTQDASPR	ALADSLMQL
AHPFFASNRN	SEEARIDRPS	QQLRSINGEN	RFAPFAPPEA	VPESWLECD
NQMNGYDAP	TYINVITYPT	VNPPFVPTEN	PTGCYSLTFN	VDESMLQEG
HEHPLHQQV	MDQTMVQDR	WEKILRRPGG	KKKYKLKHIV	WASRELER
GCRQILGQLQ	PSLQTGSEEL	RSLYNTVATL	YCVHQRIEIK	DTKEALDK
QQAADTGHS	SOVSQNPYIV	QNIQGMVHQ	AISPRTLNAW	VKVVEEKAL
SEGATPQDLN	TMLNTVGGHQ	AAMQMLKETI	NEEAAEWDRV	HPVHAGPI
IAGTTSTLQE	QIGWHTNNPP	IPVGEIYKRW	IILGRNKIVR	MYSPTSILL
YVDRFYKTLR	AEQASQEVKN	WMTETLLVON	AMPDCKTILK	ALGPAATL
PGHKARVLAE	AMSQVTNTAT	IMMQRGNFRN	QRKMVKCFNC	GKEGHTAR
CGKEGHQMKD	CTERQANFLG	KIL		