



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/75 (2023.08); C07K 14/32 (2023.08); C12R 2001/125 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2023103583, 15.02.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.02.2023Дата регистрации:
28.11.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.02.2023

(45) Опубликовано: 28.11.2023 Бюл. № 34

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Щербаков Дмитрий Николаевич (RU),
Колосов Пётр Владимирович (RU),
Каргашилова Екатерина Николаевич (RU),
Ирkitова Алёна Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

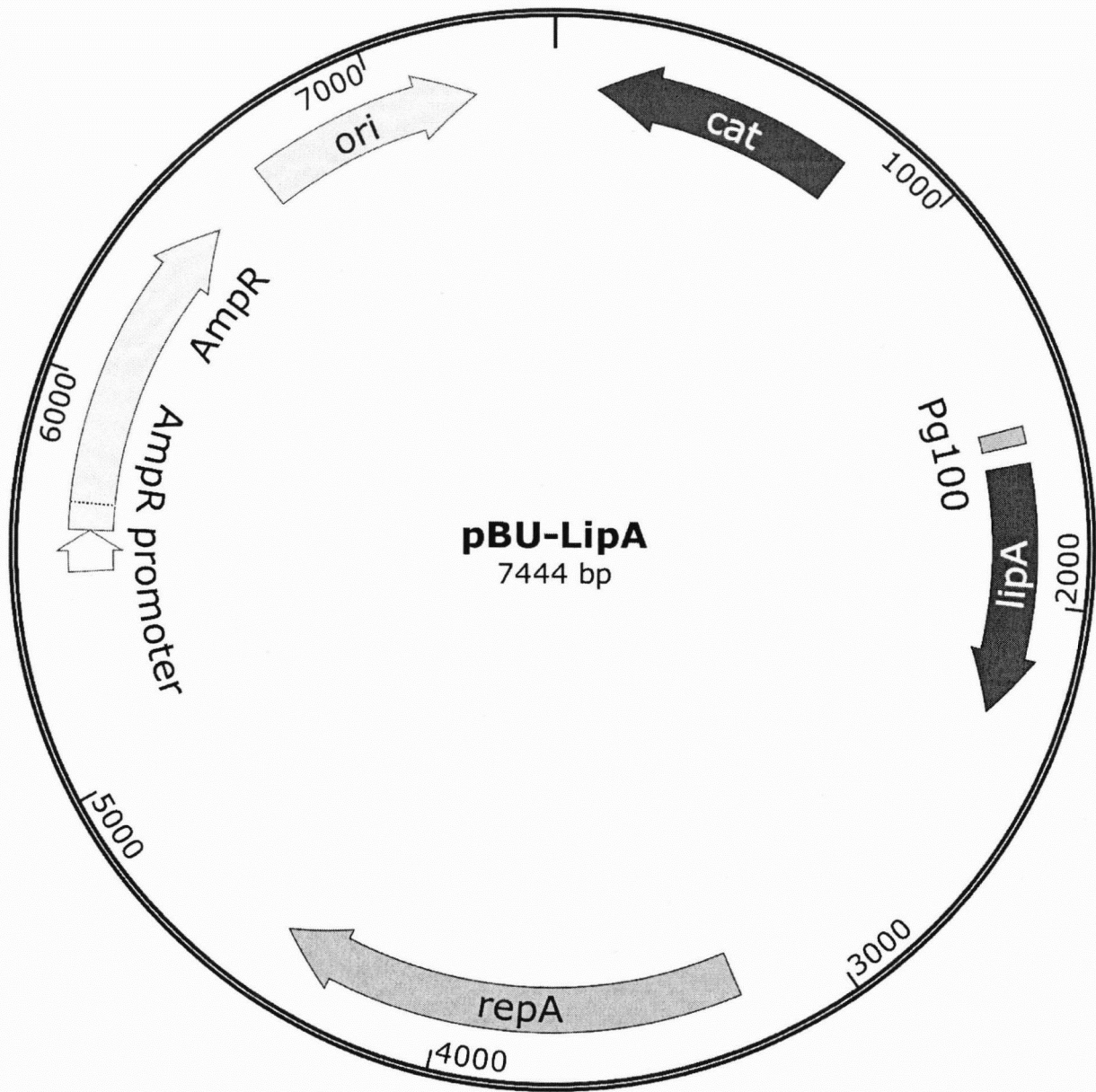
(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 2500812 C1, 10.12.2013. RU
2540873 C1, 10.02.2015. RU 2507261 C1,
20.02.2014. WO 2009094084 A1, 30.07.2009.
JISHENG MA et al., Overexpression and
characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*,
Protein Expression and Purification, 2006,
Volume 45, Issue 1, pp.22-29.(54) Рекомбинантная плазмида pBU-LipA, обеспечивающая синтез белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложена рекомбинантная плазмида pBU-LipA, обеспечивающая синтез рекомбинантного белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN массой 19,3 кДа в клетках *Bacillus subtilis*. Размер плазмиды 7444 п. н. Плазмида характеризуется физической и генетической картой, представленной на фиг. 1.

Рекомбинантный ген, кодирующий целевой белок липазы А *Bacillus natto*, встроен по сайтам рестрикции BamHI и AatII в область полилинкера вектора pBU, содержащего сильный промотор и сигнальную последовательность. Изобретение обеспечивает эффективную наработку рекомбинантного белка липазы А и его экспорт в культуральную среду. 2 ил., 1 табл., 3 пр.



Рекомбинантная плазмида pBU-LipA, обеспечивающая синтез белка
липазы А штамма *Bacillus natto* IAN

Фиг. 1

RU 2808501 C1

RU 2808501 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/75 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 15/75 (2023.08); C07K 14/32 (2023.08); C12R 2001/125 (2023.08)(21)(22) Application: **2023103583, 15.02.2023**(24) Effective date for property rights:
15.02.2023Registration date:
28.11.2023

Priority:

(22) Date of filing: **15.02.2023**(45) Date of publication: **28.11.2023 Bull. № 34**

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Shcherbakov Dmitrij Nikolaevich (RU),
Kolosov Petr Vladimirovich (RU),
Kargashilova Ekaterina Nikolaevich (RU),
Irkutova Alena Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**(54) **RECOMBINANT PLASMID pBU-LipA, PROVIDING SYNTHESIS OF LIPASE A PROTEIN FROM BACILLUS NATTO STRAIN IAN**

(57) Abstract:

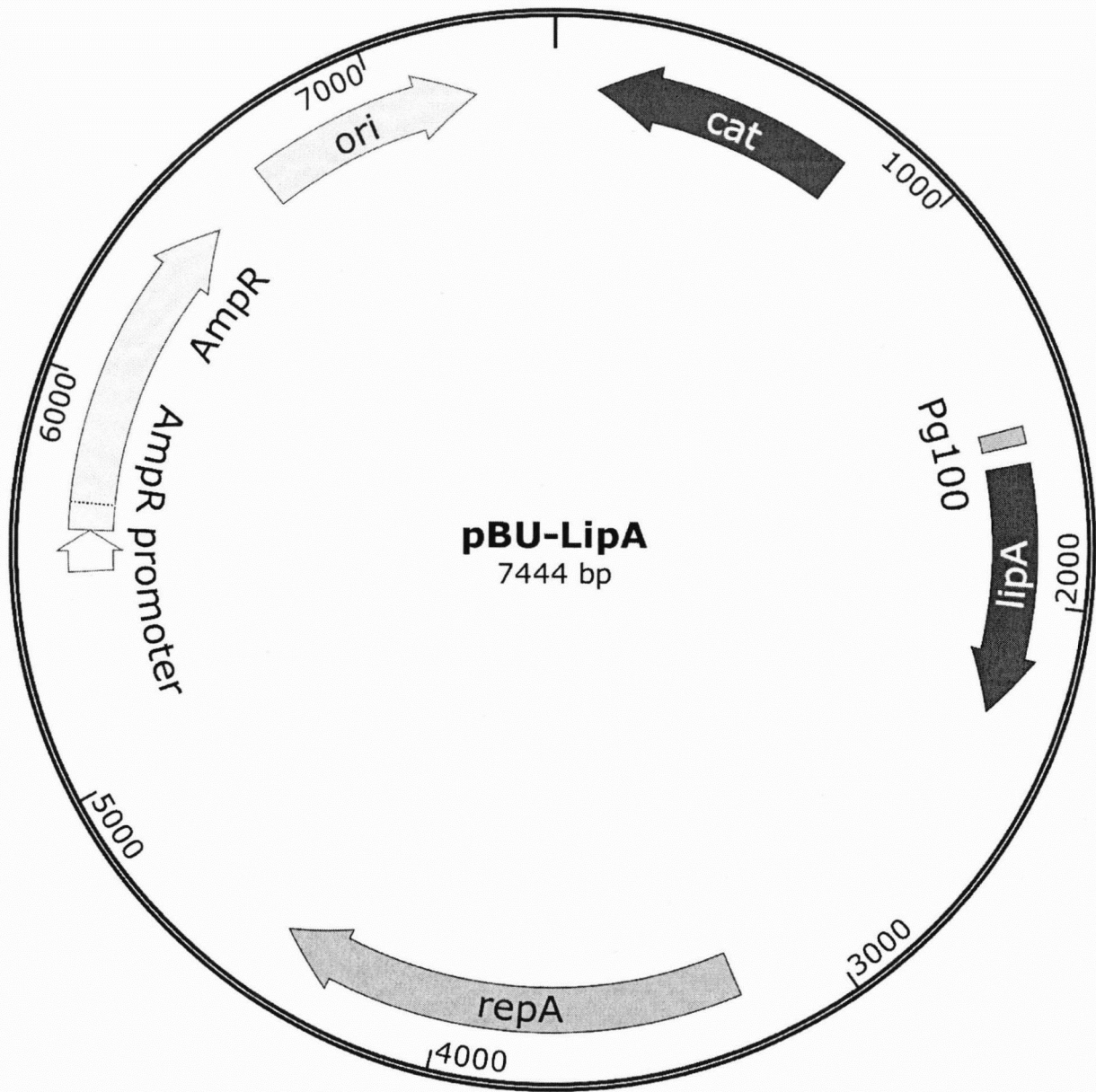
FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: recombinant plasmid pBU-LipA has been proposed, which ensures the synthesis of the recombinant lipase A protein of the Bacillus natto IAN strain weighing 19.3 kDa in Bacillus subtilis cells. Plasmid size is 7444 bps. The plasmid is characterized by a physical and genetic map shown in Figure 1. The recombinant gene encoding the target protein of Bacillus

natto lipase A is inserted at the BamHI and AatII restriction sites into the polylinker region of the pBU vector, which contains a strong promoter and signal sequence.

EFFECT: effective production of recombinant lipase A protein and its export into the culture medium.

1 cl, 2 dwg, 1 tbl, 3 ex



Рекомбинантная плазмида pBU-LipA, обеспечивающая синтез белка
липазы А штамма *Bacillus natto* IAN

Фиг. 1

RU 2808501 C1

RU 2808501 C1

Область техники

Изобретение относится к генетической конструкции (плазмиде), обеспечивающей синтез рекомбинантного белка - липазы А *Bacillus natto* IAN. Способ включает дизайн генетической конструкции и методы трансформации.

5 Уровень техники

Липазы - ферменты, осуществляющие гидролиз триацилглицеридов с образованием жирных кислот и глицерина. Основными коммерчески-значимыми характеристиками, которыми должны обладать липазы, являются термостабильность, устойчивость к щелочным условиям, органическим растворителям (RU 2508402 C1).

10 Источником липолитических ферментов являются грибы и бактерии, в частности многие бациллы (RU 2508402 C1). В изобретениях RU 2500812 C1, RU 2475532 C1, RU 2451075 C1, RU 2575804 C1 (Journal of Biotechnology. - 1997. - V. 56. - P. 89-102), (Protein Expression and Purification. - 2003. - V. 28. -N. 1. - P. 102-1), RU 93042492 A, RU 2508402 C1
15 приводят методы получения термостабильных липаз в продуцентах *Bacillus licheniformis*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida parapsilosis*, *Geobacillus thermocalenulatus*, *Pichia pastoris*, *Rhizopus orizae*, *Escherichia coli*. К недостаткам изобретений можно отнести невысокую активность продуцентов, либо трудозатратный способ выделения и очистки ферментного препарата.

Липаза А (LipA) является небольшим белком с массой 19,3 кДа, продуцируемым
20 *Bacillus subtilis*. В отличие от большинства липаз, LipA не имеет lid домена, закрывающего активный участок фермента, и не проявляет межфазной активации (Borrelli G. M., Trono D., 2015). Оптимальный pH для работы LipA 10,0, температурный интервал 35-40°C. LipA проявляет активность в отношении сложных эфиров глицерина и жирных кислот,
25 длина цепи которых составляет от 6 до 18 атомов углерода, максимальная активность показана для эфиров жирных кислот с длиной цепи C8-C14 (Eggert T. et al. 2002; R. Jing Ma et al. 2017). На практике LipA широко используется при синтезе фармацевтических препаратов, в частности для получения энантиомеров лекарственных веществ (Безбородов А.М., Загустина Н.А., 2014).

Получение LipA проводят в культурах *E. coli* и *B. subtilis*. По сравнению с *E. coli B. subtilis* имеет ряд преимуществ: 1) *B. subtilis* непатогенна; 2) продуцент *B. subtilis* способен обеспечить синтез и секрецию рекомбинантных белков непосредственно в культуральную среду; 3) культура *B. subtilis* легко масштабируется, возможно культивирование в больших ферментерах (R. Jing Ma et al. 2017). Однако, несмотря на достоинства, продукция LipA в рекомбинантной *B. subtilis* все еще ограничена из-за
35 таких проблем, как низкий уровень транскрипции, блокирование секреторного аппарата, деградация внеклеточной протеазы и так далее. Поэтому поиск и конструирование векторов, позволяющих оптимизировать регуляторные элементы экспрессии *B. subtilis*, являются актуальными научными задачами.

Раскрытие изобретения

40 Задачей настоящего изобретения является разработка экспрессионной системы и структуры плазмиды для получения липазы А, продуцируемой штаммом *Bacillus natto* IAN.

Техническим результатом изобретения является экспрессионная генетическая конструкция rBU-LipA, содержащая нуклеотидную последовательность белка липазы
45 А, обеспечивающая экспрессию белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN в культуральную среду.

Указанный технический результат достигается получением рекомбинантной плазмиды rBU-LipA, размером 7444 пар нуклеотидов (п.н.), характеризующейся физической и

генетической картой, представленной на фиг. 1, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, обеспечивающей синтез рекомбинантного белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN массой 19,3 кДа в клетках *Bacillus subtilis*.

5 Рекомбинантный ген белка липазы А, имеющей нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2 от нуклеотида в положении 1650 п. о. до нуклеотида в положении 2285 п. о., кодирующий целевой белок липазы А *Bacillus natto* полной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, встроено по сайтам рестрикции BamHI и AatII в область полилинкера вектора pBU, содержащего сильный промотор, что обеспечивает эффективную наработку рекомбинантного белка и его экспорт в культуральную среду.

10 Изобретение иллюстрируется следующими графическими фигурами. На фиг. 1 представлена физическая и генетическая карта рекомбинантной плазмиды pBU-LipA, предназначенной для синтеза липазы А *Bacillus natto* в клетках *Bacillus subtilis*, имеющей следующие основные структурно-функциональные регионы:

15 - нуклеотидная последовательность, кодирующая устойчивость к хлорамфениколу (cat) (113-763 п. н.);

- нуклеотидная последовательность синтетического промотора Pg100 (1557-1600 п. н.);

- нуклеотидная последовательность, кодирующая ген липазы А (SEQ ID NO: 1) (1650-2285 п. н.);

20 - нуклеотидная последовательность начала репликации в *Bacillus subtilis* (repA) (3246-4438 п. н.);

- ген устойчивости к антибиотику ампициллин AmpR (5626-6486 п. н.) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (5521-5625 п. н.), обеспечивающие репликацию плазмиды в *E. coli*;

25 - участок начала репликации ori (6657-7245 п. н.).

На фиг. 2. представлена электрофореграмма, иллюстрирующая наработку липазы А *Bacillus natto* IAN в клетках *Bacillus subtilis*: 1 - маркер молекулярного веса (Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker); 2 - культуральная жидкость, содержащая рекомбинантный белок липазы А *Bacillus natto* IAN; 3 - культуральная жидкость, полученная при культивировании нетрансформированной *Bacillus subtilis* (отрицательный контроль).

Для лучшего понимания сущности предлагаемого изобретения ниже приведены примеры (1-3) его осуществления.

35 Пример 1. Конструирование рекомбинантной плазмиды pBU-LipA для синтеза липазы А *Bacillus natto* IAN в системе *Bacillus subtilis*

Последовательность гена липазы А была амплифицирована из колонии дикого штамма *Bacillus natto* из коллекции инжинирингового центра «Промбиотех». Для амплификации использовались праймеры LipA-F и LipA-R (таблица 1). ПЦР-продукт гена липазы А размером 636 п.н. в составе реакционной смеси был нанесен на агарозный 40 гель, выделен из геля с помощью набора «Евроген» Cleanup Standard (Россия) в соответствии с рекомендациями производителя, встроено в состав вектора pJET.2.1, входящего в набор CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific™), в соответствии с инструкциями производителя. Полученной плазмидой pJET-LipA трансформировали культуру *E. coli* штамм Stb13 по общепринятой методике с помощью CaCl₂. Далее 45 выделяли плазмидную ДНК pJET-LipA с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген», Москва) в соответствии с инструкцией производителя и проверяли секвенированием по методу Сэнгера с помощью набора CEQ2000Dye Terminator Cycle Sequencing Kit в

соответствии с инструкциями производителя.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для конструирования рекомбинантной плазмиды pBU-LipA

Название	Последовательность нуклеотидов
LipA-F	ATGAAATTTGTAAAAAGAAGGATCATTGCACT
LipA-R	TTAGTTTGTATTCTGGCCCCCGC
LpA-F	aaaaaaGGATCCATGAAATTTGTAAAAAGAAGGATCATTGCACT
LpA-R	aaaaaaGACGTCTTAGTGGTGATGGTGATGATGGTTTGTATTCTGGCCCCCGC

Далее в нуклеотидную последовательность липазы А вводили сайты рестрикции BamHI и AatII с помощью ПЦР с использованием праймеров LpA-F и LpA-R (таблица 1), в качестве матрицы для амплификации была использована плазида pJET-LipA.

На основе вектора pBU, оптимизированного под штамм *Bacillus subtilis*, получали конструкцию pBU-LipA (фиг. 1), содержащую нуклеотидную последовательность LipA. Для этого проводили ферментативный гидролиз вектора pBU и ПЦР-продукта нуклеотидной последовательности, кодирующей липазу А, эндонуклеазами рестрикции BamHI и AatII. Далее проводили лигирование гидролизованных ПЦР-продукта и вектора pBU и последующую трансформацию по общепринятой методике с помощью CaCl₂ культуры *E.coli* штамм Stb13 полученной плазмидой. Выделяли полученную плазмидную ДНК pBU-LipA с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген», Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Идентичность плазмиды pBU-LipA спроектированной подтверждали секвенированием по методу Сэнгера с помощью набора CEQ2000Dye Terminator Cycle Sequencing Kit в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 2. Получение рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis*, обеспечивающего синтез липазы А *Bacillus natto* IAN

Полученной рекомбинантной плазмидой pBU-LipA была проведена трансформация методом электропорации клеток *B. subtilis* WB800N. Культуру клеток в количестве 50 мл подращивали до OD_{λ600}=0.2 о.е. Затем в культуру добавили 0,5 гр. трионина, 1 гр. глицил-глицина, 0,05 гр. триптофана и 15 мкл TWEEN 80 и инкубировали в течение часа при 30°C. После культуру клеток инкубировали 20 мин на льду. 50 мл культуры центрифугировали 10 мин 5000g при 4°C на центрифуге AvantiJ-301. Осажденную биомассу дважды промыли в 5 мл EP Buffer (0,5 М трегалоза, 0,5 М сорбитол, 0,5 М маннитол, 0,7 мМ MgCl, 0,5 мМ K₂HPO₄, 0,5 мМ KH₂PO₄, pH=7,4). После промывки ресуспендировали в 0,5 мл EP Buffer. 100 мкл суспензии клеток перенесли в 2 мл холодные кюветы для электропорации и добавили ДНК с расчетом 25 нг/мкл. Произвели электропорацию при 2,5 kV на электропораторе MicroPulser. К электропорированным клеткам добавили питательную среду YTx2 с 0,5 М сорбитолом и 0,38 М маннитолом. Инкубировали 3 часа при 37°C. 50 и 200 мкл культуры высевали на чашки с агаризованной средой YTx2, содержащие 5 мкг/мл хлорамфеникола. Чашки помещали в термостат 30°C и инкубировали в течение ночи. На следующий день были идентифицированы отдельные колонии, содержащие плазмиду pBU-LipA.


```

IAN</InventionTitle>
<SequenceTotalQuantity>3</SequenceTotalQuantity>
<SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
5    <INSDSeq_length>7444</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
10   <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7444</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
15   <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q2">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
20   </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ttaagttattggtatgactggttttaagcgcaaaaaagttgctttttc
25  gtacctattaatgtatcgttttagaaaaccgactgtaaaaagtacagtcggcattatctcatattataaa
    agccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagttcataaacaatcctgcatgataaccatcac
    aaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaaataattgaattacctttattaatgaatcttctgc
    tgtaataatgggtagaaggtaactactattattattgatatttaagttaaaccagtaaataagtcctat
    ggaataatagaaaagagaaaaagcattttcaggtataggtgttttgggaaacaatttccccgaaccattat
30  atttctctacatcagaaaaggatataaatcataaaactctttgaagtattctttacaggagtccaaatacc
    agagaatgttttagatacaccatcaaaaattgtataaaagtggtcttaacttatcccaataacctaactct
    ccgtcgtattgtaccagttctaaaagctgtatttgagtttatcacccttgctactaagaaaataaatg
    cagggtaaaatttatatccttctgttttatgtttcggtataaaacactaatatcaatttctgtggttat
    actaaaagtcgtttgttggttcaataatgattaaatatctcttttcttccaattgtctaaatcaatt
35  ttattaaagttcatttgatatgcctcctaaatttttatctaaagtgaatttaggaggcttacttgtctgc
    tttcttcattagaatcaatccttttttaaaagtcaatattactgtaacataaataatatttttaaaaata
    tcccactttatccaattttcgtttgtaactaatgggtgcttttagttgaagaataaagaccacattaaa
    aatgtggtcttttgtgttttttaaaaggatttgagcgtagcgaaaaatccttttcttcttatcttgat
    aataagggtaactattgccgatcgtccattccgacagcatcgccagtcactatggcgtgctgtagcgcc
40  attcgccattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcggcggcctcttcgctattacgccagct
    ggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgt
    aaaacgacggccagtgaaatcgagctcaggccttaactcacattaattgcgctgctcactgcccgtt
    tccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcg
    tattggcgctacgatctttcagccgactcaaacatcaaatcttacaatgtagtctttgaaagtattaca
45  tatgtaagatttaaatgcaaccgtttttcggaaggaaatgatgacctcgtttccaccggaattagcttg
    gtaccaaaaggaggtaaggatcactagaaaaatttttaaaaaatctcttgacattggaaggagatattgtt
    attataagaattgcggaattgtgagcggataacaattcccatataaaggaggaaggatccatgaaatttg
    taaaaagaaggatcattgcacttgtaacaattttgatgctgtctgttacatcgctgtttgcgttgacgc

```

gtcagtaaaagccgctgaacacaatccagtcggttatggttcacggcattggaggggcatcattcaat
 gcggaattaagagctatctcgtatctcagggctggtcgcgggacaagctgtatgcagttgattttggg
 acaagacaggcacaattataacaatggcccgtattgtcacgattttgtgcaaaaggttttagatgaaac
 ggggtgcgaaaaagtggatattgtcgtcacagtatgggggcggaacacactttactacataaaaaat
 5 ctggacggcggaataaaagttgaaaacgtcgtgacgcttggcgcccaaccgtttgacgacaggcaagg
 cgcttccgggaacagatccaaatcaaaagattttatacacatccatttacagcagtgccgatatgattgt
 catgaattatctcaagattagacggtgctagaaacgttcaaatccatggcggttgacacatcggcctt
 ctgtacagcagccaagtcaacagcctgattaaagaagggctgaacggcgggggccagaatacaaacatc
 atcaccatcaccactaagacgtccccgggagcccgcctaatgagcgggcttttttcacgtcacgcgtc
 10 catggagatctttgtctgcaactgaaaagtttataccttacctggaacaaatggttgaaacatacagggc
 taatatcggccttattaggaatagtcctgtactaataaaatcaggtggatcagttgatcagtatatcttg
 gacgaagctcggaaagaatttgagatgacttgcttaattccacaattaattaagggaaagaataaagc
 gatttgatggtcaaggaatcacggaagaagatactcatgataaagaagctctaaaactattcaataacct
 tacaatggaattgatcgaaaggtggaaggttaatggtacgaaaattaggggatctacctagaaagccac
 15 aaggcgataggtcaagcttaaagaacccttacatggatcttacagattctgaaagtaagaacaacaga
 ggttaaacaaacagaaacaaaaagaaaaaaagcattggtgaaaacaatgaaagttgatgtttcaatccat
 aataagattaaatcgctgcacgaaattctggcagcatccgaagggaattcatattacttagaggatacta
 ttgagagagctattgataagatggttgagacattacctgagagccaaaaactttttatgaatatgaatt
 aaaaaaagaaccaacaaaggctgagacagactccaaacgagctctgttttttaaaaaaatattaggag
 20 cattgaatatatattagagaattaagaaagacatgggaataaaaaatattttaaatccagtaaaaaatga
 taagattatctcagaatatgaagaactctgtttgttttgatgaaaaaacaacaaaaaaatccaccta
 acggaatctcaatttaactaacagcggccaaactgagaagttaaatttgagaaggggaaaaggcggattt
 atacttgatcttaactatctccattttaacattttattaaaccccatacaagtgaaaatcctcttttaca
 ctgttccttttaggtgatcgcggaggacattatgagtgaagtaaacctaaaaggaaatacagatgaatta
 25 gtgtattatcgacagcaaacactggaaataaaatcgccaggaagagaatcaaaaaagggaagaagaag
 tttattatggtgctgaaacggaagagaagatatggacagaagagcaataaaaaacttttcttagacaa
 atttggtacgatataccttacatagaaggtcattatacaatcttaataattacttctttgattttgg
 ggctattttttaggtgctgaaggaattgcgctctatgctcacctaactcgttatgcatacggcagcaag
 acttttgctttcctagtctacaaacaatcgtaaaaaaatggacaagactcctgttacagtttagaggcta
 30 cttgaaactgcttgaaaggtaacggttttatttggaaaggtaaacgtccgtaataaaaccaaggataacaca
 gaggaatccccgatttttaagattagacgtaaggttcctttgctttcagaagaacttttaaatgaaacc
 ctaatatgaaattccagatgacgaggaagcacatgtaaaagaaggctttaaaggaaaagagggtct
 tccaaagggttttgaaaaagagcacgatgaatttgttaaaaaatgatggatgagtcagaacaattaat
 attccagaggccttacaatatgacacaatgtatgaagatatactcagtaaaaggagaattcgaaaagaaa
 35 tcaaaaaacaatacctaatacctacaacatcttttgagagtatatcaatgacaactgaagaggaaaaagt
 cgacagtactttaaaagcgaaatgcaaaatcggtgctcctaagccttcttttgatacctggtttaaaaac
 actaagatcaaaattgaaaataaaaaattgtttattacttgtaccgagtgaatttgcatttgaatggatta
 agaaaagatatttagaaacaattaaacagtccttgaagaagctggatagttttcgaaaaaatcgaact
 aagaaaagtgaataaactgctgaagtatttcagcagttttttttatttagaaatagtgaaaaaatata
 40 atcaggagggtatcaatatttaatgagtactgatttaattttatttagactggaattaataattaacacg
 tagactaattaaaatttaatgagggataaaagaggatacaaaaatattaatttcaatccctattaat
 aacaaggggggattaaaatttaattagaggtttatccacaagaaaagaccctaataaaaattttactag
 ggttataacactgattaatttcttaatgggggagggttaaaaatttaatgacaaagaaaacaatctttta
 agaaaagcttttaaaagataataataaaaaagagctttgcgattaagcaaaactctttacttttcttga
 45 cattatcaaattcatcgatttcaattgttgttatcataaagttaattctgttttgcaaaccttttc
 aggaatataaaacacatctgaggcttgtttataaaactcagggctcgctaaagtcaatgtaacgtagcata
 tgatattggtatagcttccaccaagttagcctttctgcttctctgaatgtttttcatatacttccatgg
 gtatctcctaattgattttcctcatgtagcaaggtatgagcaaaaagtttatggaattgatagttcctctc

```

5 tttttcttcaacttttttatctaaaacaaacactttaacatctgagtcaatgtaagcataagatgttttt
ccagtcataatcctcccaaatcttttagacagaaatctggacgtaaactcttttggtgaaagaattt
ttttatgtagcaatataatccgatacagcaccttctaaaagcgttggggaatagggcattttacctatctc
ctctcattttgtggaataaaaaatagtcataatcgtccatctacctatcctattatcgaacagttgaactt
10 tttaatcaaggatcagtccttttttattattcttaaaactgtgctcttaactttaacaactcgatttgt
ttttccagatctcgagggtaactagcctcgccgatcccgcaagaggcccgagtcaggtggcacttttc
ggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttctaaatacattcaaataatgtagcctcatgag
acaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacattttcgtgtc
15 gcccttattcccttttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctgggaaagtaa
aagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatcct
tgagagttttcgcggcgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtta
ttatcccgtattgacgcccggcaagagcaactcggcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtg
agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccat
aaccatgagtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgct
20 tttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatac
caaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgcttgcaaacactattaactggcga
actacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccactt
ctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcg
gtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagtattctacacgacggggagtca
25 ggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactg
tcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctagg
tgaagatcctttttgataatctcatgacccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcaga
ccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaca
aaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaa
30 ctggcttcagcagagcgcagataccaaataactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaa
gaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgat
aagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacgg
ggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagct
atgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaaca
35 ggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtctgctgggtttcggcacc
tctgacttgagcgtcgatttttgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgc
ggcctttttacggttccctggccttttgctggccttttgctcacatgcttcttctgcttatcccctgat
tctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcga
cgagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgccaatacgcgatgc</INSDSeq_sequence>
40 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>636</INSDSeq_length>
45 <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..636</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q3">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
5    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
10  <INSDSeq_sequence>atgaaatTTGTAAAAAGAAGGATCATTGCACCTTGTACAATTTTGTATGC
TGTCTGTTACATCGCTGTTTGC GTTGCAGCCGTCAGTAAAAGCCGCTGAACACAATCCAGTCGTTATGGT
TCACGGCATTGGAGGGGCATCATTCAATTTTGC GGGAATTAAGAGCTATCTCGTATCTCAGGGCTGGTGC
CGGGACAAGCTGTATGCAGTTGATTTTGGGACAAGACAGGCACAAATTATAACAATGGCCCGGTATTGT
15  CACGATTTGTGCAAAGGTTTTAGATGAAACGGGTGCGAAAAAGTGGATATTGTCGCTCACAGTATGGG
GGGCGCGAACACACTTTACTACATAAAAAATCTGGACGGCGGAAATAAAGTTGAAAACGTCGTGACGCTT
GGCGGCGCAACCGTTTGCAGCACAGGCAAGGCGCTTCCGGGAACAGATCCAAATCAAAGATTTATACA
CATCCATTTACAGCAGTGCCGATATGATTGTCATGAATTATTTATCAAGATTAGCGGTGCTAGAAACGT
TCAAATCCATGGCGTTGGACACATCGGCCTTCTGTACAGCAGCCAAGTCAACAGCCTGATTAAGAAGGG
20  CTGAACGGCGGGGGCCAGAATACAAAC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>212</INSDSeq_length>
25  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
30  <INSDFeature_location>1..212</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
35  </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
40  </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
      <INSDSeq_sequence>MKFVKRRRIALVTILMLSVTSLFALQPSVKAAEHPVVMVHGIGGASFN
FAGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLRSRFVQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIK
45  NLDGGNKVENVVTLGGANRLTTGKALPGTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIG
LLYSSQVNSLIKEGLNGGGQNTN</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>

```

</ST26SequenceListing>

(57) Формула изобретения

5 Рекомбинантная плазида рВU-LipA, обеспечивающая синтез рекомбинантного белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN массой 19,3 кДа в клетках *Bacillus subtilis*, имеющая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 размером 7444 п. н. и содержащая в соответствии с физической и генетической картой следующие структурно-функциональные регионы:

10 - нуклеотидная последовательность, кодирующая устойчивость к хлорамфениколу (cat) (113-763 п. н.);

- нуклеотидная последовательность синтетического промотора P_g100 (1557-1600 п. н.);

15 - ген липазы А с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 2 от нуклеотида в положении 1650 по 2285 п. н., кодирующий целевой белок липазы А *Bacillus natto* полной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 и встроенный по сайтам рестрикции BamHI и AatII в область полилинкера вектора рВU, содержащего сильный промотор и сигнальную последовательность, что обеспечивает эффективную наработку рекомбинантного белка и его экспорт в культуральную среду;

20 - нуклеотидная последовательность начала репликации в *Bacillus subtilis* (repA) (3246-4438 п. н.);

- ген устойчивости к антибиотику ампициллину Amp^R (5626-6486 п. н.) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (5521-5625 п. н.), позволяющие проводить препаративную наработку плазмиды в *E. coli*;

- участок начала репликации ori (6657-7245 п. н.).

25

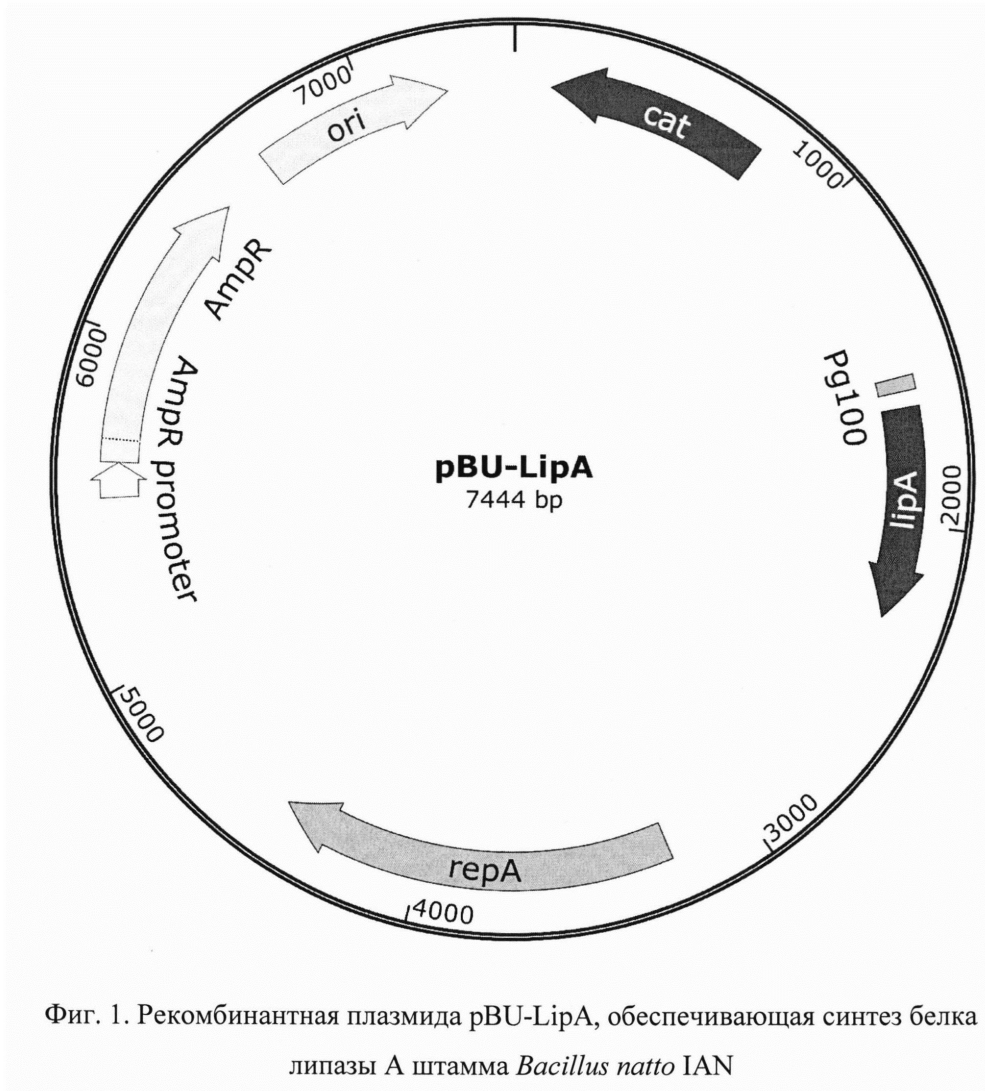
30

35

40

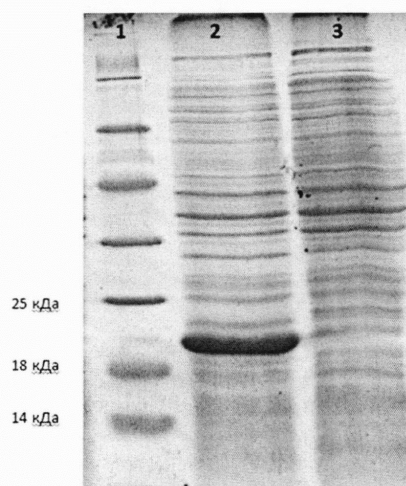
45

1



Фиг. 1. Рекombинантная плазмида pBU-LipA, обеспечивающая синтез белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN

2



Фиг. 2. Рекombинантная плазмидa pBU-LipA, обеспечивающая синтез белка липазы А штамма *Bacillus natto* IAN