



(19) KZ (13) B (11) 35233  
(51) A61K 39/12 (2006.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01)  
C12N 15/33 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 7/00 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2018.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0402.1

(22) 29.06.2021

(45) 13.08.2021, бюл. №32

(72) Червякова Ольга Викторовна; Исабек Айша Уранқызы; Тайлакова Эльмира Талгатовна; Садикалиева Сандугаш; Мухами Назым; Султанкулова Кулайсан Турлыбаевна; Орынбаев Мухит Бармакулы; Закарья Кунсулу

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) He Y., Qi J., Xiao L., Shen L., Yu W., Hu T. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. // Eng. Life Sci. – 2021. – Vol. 21(6). – P. 453-460.

RU 2730897 C1, 26.08.2020.

CN 111848754 A, 30.10.2020.

RU 2733832 C1, 07.10.2020.

(54) **РЕКОМБИНАНТНЫЕ ПЛАЗМИДНЫЕ ДНК pET/RBD, pET/N, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ RBD (РЕЦЕПТОР СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА S БЕЛКА), N (НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА) КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2, ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI ER2566 – ПРОДУЦЕНТЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОРОНАВИРУСНЫХ БЕЛКОВ RBD, N, И РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ RBD (РЕЦЕПТОР СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН S БЕЛКА), N (НУКЛЕОКАПСИДНЫЙ БЕЛОК) КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-**

### **СИСТЕМ И СУБЪЕДИНИЧНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ – COVID-19**

(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается получения генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках Escherichia coli рекомбинантных белков RBD (рецептор связывающего домена S белка), N (нуклеофосфопотеина) коронавируса SARS-CoV-2. Представлены рекомбинантные плазмидные ДНК pET/RBD, pET/N, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 и содержащие в соответствии с физическими и генетическими картами плазмид, приведенными на фиг. 2: плазмидный вектор pET28, включающий фрагмент, кодирующий олигопептид LENNHHHHH или AAALENNHHHHH, фрагмент размером 632 п.о., кодирующий фрагмент белка S (RBD) коронавируса SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки, или фрагмент размером 1250 п.о., кодирующий белок N коронавируса SARS-CoV-2, (фиг. 1, а, б). Штаммы бактерий E.coli ER2566/pET/RBD, ER2566/pET/N, – продуценты рекомбинантных вирусных белков RBD, N, содержащие соответственно рекомбинантные плазмидные ДНК pET/RBD, pET/N, депонированные в Коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК под регистрационными номерами М-17-20/D, М-18-20/D, соответственно; и рекомбинантные белки коронавируса SARS-CoV-2 pET/RBD, pET/N. Охарактеризованные решения могут быть использованы при создании тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против новой коронавирусной инфекции – COVID-19.

Изобретение относится к области биотехнологии и касается получения генетических конструкций, обеспечивающих синтез в клетках *Escherichia coli* рекомбинантных белков RBD (рецептор связывающего домена S белка), N (нуклеокапсидного белка) коронавируса SARS-CoV-2, состоящих из соответствующих белков и С-концевого олигопептида LЕNNНННН, ААALENNНННН, соответственно, взаимодействующих с сыворотками доноров, больных или переболевших коронавирусной инфекцией COVID-19, и вызывающих выработку вируснейтрализующих антител в организме человека и животных, и может быть использовано для разработки средств профилактики и диагностики новой коронавирусной инфекции – COVID-19.

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) – новый коронавирус, был идентифицирован как причина коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19), возникшей в городе Ухань, Китай, в конце 2019 года и распространившейся по всему миру. Этот коронавирус, вызывает тяжелые респираторные инфекции, передающиеся от человека к человеку. В январе 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила вспышку эпидемии, связанной с SARS-CoV-2, чрезвычайную ситуацию в области здравоохранения международного значения, а 11 марта 2020 года охарактеризовала принявшее мировой масштаб распространение болезни как пандемию [WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Дата обращения 20.04.2021].

По данным на июнь 2021 года, подтверждено более 170 млн случаев заражения человека, около 4 млн летальных исходов [Коронавирус онлайн обновления (англ.). Johns Hopkins University. URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map>. Дата обращения 20 апреля 2021 г.].

SARS-CoV-2 имеет геном в виде одноцепочечной смысловой РНК размером примерно 30 т.п.н., который включает пять основных открытых рамок считывания, кодирующих неструктурные полипротеины репликазы и структурные белки, а именно белок шипа (spike, S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (N) [Zhu G, Zhu C, Zhu Y, Sun F. Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins. // *Curr Res Microb Sci.* – 2020. – Vol. – 1. – P. 53-61. doi:10.1016/j.crmicr.2020.06.003].

Установлено, что большинство антител, обладающих вируснейтрализующей активностью в отношении вида коронавирусов (MERS, SARS и др.) специфически связываются с различными эпитопами рецептор связывающего домена белка S [Hofmann H. et al. S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. // *Journal of Virology.* –

2004. Vol. 78(12). – P. 6134-6142; He Y. Receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains multiple conformation-dependent epitopes that induce highly potent neutralizing antibodies. // *Journal of Immunology.* – 2005. – Vol. 174(8). – P. 4908-4915; He Y. Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol. 324(2). – P. 773-781]. Вируснейтрализующей активностью обладают антитела, препятствующие связыванию белка S вируса SARS-CoV-2 с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) на клетках человека. Структурным доменом белка S, образующим сайт связывания с рецептором ACE2, является рецептор-связывающий домен (RBD). Антитела способные связываться с RBD блокируют контакт вируса с рецептором ACE2 и, как следствие, препятствуют проникновению вируса в клетки человека.

Другим значимым для формирования иммунного ответа является белок N коронавирусов. N-белки многих коронавирусов обладают высокой иммуногенностью и обильно экспрессируются во время инфекции [Cong Y., Ulasli M., Schepers H., Mauthe M., V'Kovski P., Kriegenburg F., Thiel V., de Haan C.A.M., Reggiori F. Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. // *J. Virol.* – 2020. Vol. – 94. – P. e01925-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01925-19>]. Белок N является репрезентативным антигеном для Т-клеточного ответа в условиях вакцинации, индуцируя SARS-специфическую пролиферацию Т-клеток и цитотоксическую активность [Gao W., Tamin A., Soloff A., D'Aiuto L., Nwanegbo E., Robbins P.D., Bellini W.J., Barratt-Boyes S., Gambotto A. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. // *Lancet.* – 2003. – Vol. – 362. – P. 1895-1896. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14962-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14962-8); Okada M., Takemoto Y., Okuno Y., Hashimoto S., Yoshida S., Fukunaga Y., Tanaka T., Kita Y., Kuwayama S., Muraki Y., Kanamaru N., Takai H., Okada C., Sakaguchi Y., Furukawa I., Yamada K., Matsumoto M., Kase T., Demello D.E., Peiris J.S., Chen P.J., Yamamoto N., Yoshinaka Y., Nomura T., Ishida I., Morikawa S., Tashiro M., Sakatani M. The development of vaccines against SARS corona virus in mice and SCID-PBL/hu mice. // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23. – P.2269-2272.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.036>], и вызывает выработку антител IgG в высоких уровнях у пациентов с SARS [Leung D.T., Tam F.C., Ma C.H., Chan P.K., Cheung J.L., Niu H., Tam J.S., Lim P.L. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 190. – P. 379-386. <https://doi.org/10.1086/422040>]. Эпитопы, отвечающие за выработку антител находятся в средней и С-концевой области белка N [Dutta N.K., Mazumdar K., Lee B.H., Baek M.W., Kim D.J., Na Y.R., Park S.H., Lee H.K., Kariwa H., Mai Le Q., Park

J.H. Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine. // *Immunol. Lett.* – 2008. – Vol. 118. – P. 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.03.003>].

Таким образом, RBD белка S и белок N вируса SARS-CoV-2 являются перспективными кандидатами для субъединичных вакцин и диагностических тест-систем при коронавирусной инфекции COVID-19.

Известны способы получения рекомбинантного RBD коронавируса SARS-CoV-2 с использованием культур клеток животного происхождения. Так, RBD стабильно экспрессировали в клетках яичника китайского хомячка CHO-S-RBD [Способ получения штамма клеток яичника китайского хомячка, продуцента рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2, штамм клеток яичника китайского хомячка, продуцент рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2, способ получения рекомбинантного белка RBD вируса SARS-CoV-2, тест-система для иммуноферментного анализа сыворотки или плазмы крови человека и ее применение: патент RU2723008C1, МПК C07K 14/165 (2006.01), C12N 15/50 (2006.01), C07K 1/36 (2006.01), C07K 1/16 (2006.01), C07K 16/10 (2006.01) / Щепляков Д. В., Есмагамбетов И. Б., Логунов Д. Ю., Деркаев А. А., Симакин П. В., Ижаева Ф. М., Джаруллаева А. Ш., Зубкова О. В., Ожаровская Т. А., Должикова И. В., Тухватулин А. И., Тухватулина Н. М., Фаворская И. А., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л.; Заявитель ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, заявка №2020116437 от 19.05.2020, опубл. 08.06.2020 Бюл. № 16 (RU)], в клетках эмбриональной почки человека HEK293 [Cell strain for high expression of SARS-COV2-RBD and method thereof: Patent CN112375741A, C12N 5/0686, Application CN202011292238.8A, 2020-11-18; Application filed by Shanghai Daiao Biotechnology Co Ltd)]. Белки были успешно использованы при разработке диагностических тестов. Также известен рекомбинантный S белок коронавируса SARS-CoV-2 экспрессируемый в бакуловиральной системе. Установлено, что вакцина, приготовленная на основе данного белка с добавлением адьюванта вызывала выработку вируснейтрализующих антител [Goepfert P.A., Fu B., Chabanon A., Bonaparte M.I., Davis M.G., Essink B.J., Frank I., Haney O., Janoszyk H., Keefer M.C., Koutsoukos M., Kimmel M.A., Masotti R., Savarino S. J., Schuerman L. et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine formulations in healthy adults: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1–2, dose-ranging study // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2021. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00147-X)].

Экспрессия рекомбинантных белков в клетках животных и насекомых обеспечивает посттрансляционную модификацию и правильную сборку белков. Однако себестоимость получения рекомбинантных белков в этих системах очень высока.

Альтернативной системой экспрессии рекомбинантных белков являются бактериальные клетки *Escherichia coli*. Иммунизация животных рекомбинантным RBD SARS-CoV, экспрессированным в клетках *E. coli*, вызывала выработку вируснейтрализующих антител и обеспечивала защиту животных от заражения [Du L., Zhao G., Chan C.C., et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and *E. coli* cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. // *Virology.* – 2009. – Vol. 393(1). – P.144-150. doi:10.1016/j.virol.2009.07.018]. Однако RBD SARS-CoV существенно отличается по структуре от RBD SARS-CoV 2 и не может быть использован для разработки средств профилактики и диагностики при новой коронавирусной инфекции.

Наиболее близкими к заявленному изобретению являются штаммы *E. coli*, трансформированные рекомбинантными плазмидными ДНК на основе векторов pET, экспрессирующие рекомбинантные RBD SARS-CoV-2. Фрагмент белка S, включающий RBD, кодируемый аминокислотными остатками 330-583 [He Y., Qi J., Xiao L., Shen L., Yu W., Hu T. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli*. // *Eng. Life Sci.* – 2021. – Vol. 21(6). – P. 453-460. doi:10.1002/elsc.202000106] или 319-541 [Bellone M.L., Puglisi A., Dal Piaz F., Hochkoeppler A. Production in *Escherichia coli* of recombinant COVID-19 spike protein fragments fused to CRM197. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2021. – Vol. 558. – P. 79-85. doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.056] или 319-640 [Fitzgerald G.A., Komarov A., Kaznadzey A., Mazo I., Kireeva M.L. Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319-640 in *E. coli*, and its refolding and purification. // *Protein Expr Purif.* – 2021. – Vol. 183. – P. 105861. doi:10.1016/j.pep.2021.105861], экспрессировали в бактериальных клетках и очищали с использованием металл-аффинной хроматографии. Очищенные рекомбинантные белки получали в буферных растворах, содержащих как минимум 1 М мочевины. Присутствие мочевины в вакцинных полупродуктах не желательно, так как это может оказывать негативное влияние на взаимодействие белков с используемым адьювантом.

Аналогом к заявленному изобретению для белка N SARS-CoV-2 может служить способ получения рекомбинантного N белка в клетках *E.coli* [Novel coronavirus N protein recombinant antigen and application thereof: Patent CN111848754A, C07K 14/005; Application CN202010798708.1A, 2020-08-10 / Application filed by West China Hospital Sichuan University]. Однако получаемые в результате рекомбинантные белки N являются усеченными, что может снизить уровень иммунного ответа при их использовании.

Техническим результатом заявляемого изобретения является создание плазмидных ДНК pET/RBD, pET/N, на их основе штаммов бактерий *E.coli*, обеспечивающих синтез высокоспецифичных рекомбинантных белков RBD, N коронавируса

SARS-CoV-2, которые распознаются сыворотками больных и переболевших коронавирусной инфекцией и вызывают выработку вируснейтрализующих антител в организме человека и животных.

Указанный технический результат достигается конструированием плазмид рЕТ/RBD, рЕТ/N путем встраивания в плазмидный вектор рЕТ28 последовательностей кДНК, кодирующих фрагмент белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки, или белок N, соответственно. Трансформация полученными плазмидами клеток *E.coli*, штамм ER2566, обеспечивает синтез рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2.

Сущность изобретения состоит в следующем:

Генно-инженерными методами получают плазмиды рЕТ/RBD, рЕТ/N, содержащие гены, кодирующие рекомбинантные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, содержащие фрагмент белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN, или белок N и С-концевой олигопептид ААALENNNNNN. Последовательности кДНК, кодирующие соответствующие белки коронавируса SARS-CoV-2, получают методом ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК вируса SARS-CoV-2/KZ\_Almaly04.2020, выделенного из клинического образца и депонированного в республиканском депозитории коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности» КН МОН РК.

Клетки *E.coli* ER2566 трансформируют сконструированными плазмидами рЕТ/RBD, рЕТ/N и выращивают в течение ночи. Ночную культуру (1/50) засевают в свежую среду LB с канамицином (50 мкг/мл). Синтез белков индуцируют добавлением изопронил-бета-галактопиранозида (ИПТГ) до концентрации 1 мМ в период среднелогарифмической фазы роста культуры. Индуцированные клетки инкубируют в течение 4 ч при 37°C, после чего собирают центрифугированием при 5000 g. Из индуцированных клеток выделяют рекомбинантные белки методом аффинной хроматографии. В результате получают рекомбинантные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, имеющие молекулярные массы 23, 46 кДа, соответственно, и состоящие из фрагмента белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевого олигопептида LЕNNNNNN, или белка N и С-концевого олигопептида ААALENNNNNN, аминокислотные последовательности которых кодируются нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, представленные на фигуре 1.

Исходным генетическим материалом для конструирования рекомбинантных плазмид рЕТ/RBD, рЕТ/N являются:

а) плазмидный вектор рЕТ28 (Novagen, США), обеспечивающий встройку фрагментов кДНК, кодирующих белки RBD, N коронавируса SARS-

CoV-2, и их экспрессию под контролем промотора T7;

б) фрагменты кДНК, кодирующие белки RBD, N, которые получают в полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции с использованием в качестве матрицы РНК коронавируса SARS-CoV-2, и олигонуклеотидных праймеров:

RBD-DIR- ccaccatggttagattcctaattacc, RBD-REV- catctcgagcaaatagtagac, N-DIR- tagccatggataatggaccscaaatcagcg, N-REV- tagcgccgcgctcagcactgctcatggattg, обеспечивающих наличие в продуктах амплификации сайтов рестрикции NcoI и XhoI, NcoI и NotI, соответственно.

Полученные в результате плазмиды рЕТ/RBD, рЕТ/N (фигура 2), характеризуются следующими признаками:

а) имеют размер 5857, 6484 п.о., соответственно;

б) кодируют рекомбинантные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, содержащие фрагмент белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN, и белка N и С-концевой олигопептид ААALENNNNNN;

в) состоят из следующих элементов:

- фрагмента кДНК размером 651 п.о., кодирующего фрагмент белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN, или размером 1278 п.о., кодирующего белок N коронавируса SARS-CoV-2 и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN;

- плазмидного вектора рЕТ28, обеспечивающего эффективную транскрипцию полученных генов, кодирующих рекомбинантные белки коронавируса SARS-CoV-2, и их экспрессию;

г) содержат:

- сайт инициации репликации плазмиды рBR322;

- промотор бактериофага T7;

- генетический маркер kan, определяющий устойчивость к канамицину при трансформации клеток *E.coli*;

- рекомбинантный ген, кодирующий фрагмент белка S (RBD) SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN, или белка N коронавируса SARS-CoV-2 и С-концевой олигопептид LЕNNNNNN.

Для получения штаммов продуцентов рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 компетентные клетки бактерий *E.coli* ER2566 (F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 geneI gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10R(mcr 73: miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1(TetS)endA1dcm), NEB, трансформируют сконструированными плазмидными ДНК рЕТ/RBD, рЕТ/N. Полученные таким образом штаммы *E.coli* ER2566/рЕТ/RBD, ER2566/рЕТ/N характеризуются следующими признаками:

Морфологические признаки. Клетки мелкие утолщенной палочковидной формы, грамтрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки. Клетки хорошо растут на простых питательных средах. На твердой агаровой среде образуют круглые, гладкие,

прижатые, мутные с ровным краем колонии. При росте на жидких средах образуют интенсивную ровную муть. Оптимальная температура 37°C, pH от 6,8 до 7,0.

Устойчивость к антибиотикам. Бактерии устойчивы к канамицину (50 мкг/мл) за счет рекомбинантной плазмидной ДНК.

Штаммы *E.coli* ER2566/pET/RBD, ER2566/pET/N обеспечивают индуцируемый ИПТГ синтез рекомбинантных белков RBD, N с выходом 5-15 мг очищенного белка с 1 л культуры.

Полученные штаммы депонированы в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под регистрационными номерами М-17-20/D, М-18-20/D, соответственно.

Изобретение иллюстрируется графическими материалами, представленными на фигурах с 1 по 4 и таблицей 1.

Фигура 1а. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды pET/RBD, кодирующая рекомбинантный белок RBD, представляющий собой фрагмент белка S SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LENNNNNN

Фигура 1б. Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды pET/N, кодирующая рекомбинантный белок N, состоящий из белка N коронавируса SARS-CoV-2 и С-концевого олигопептида LENNNNNN

Фигура 2. Общая схема структурной организации плазмид pET/RBD, pET/N, (физическая карта). RBD, N – гены, кодирующие соответствующие рекомбинантные белки, T7 promoter – промотор фага T7, T7 terminator – терминатор фага T7, kan – ген устойчивости к канамицину, указаны также некоторые сайты рестрикции

Фигура 3. Электрофоретический анализ белков клеточного лизата *E.coli* штамма ER2566, трансформированного плазмидами pET/RBD (а), pET/N (б). М – маркер молекулярного веса (ThermoScientific, США); Tot – после индукции IPTG; So – растворимые белки; IN – включения

Фигура 4. Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков RBD и N. М – маркер молекулярного веса; дорожки 1, 2 – RBD; дорожки 3, 4 – N; дорожки 1, 3 – клеточный лизат до индукции; дорожки 2, 4 – после индукции ИПТГ. Взаимодействие с сывороткой, полученной от переболевших коронавирусной инфекцией людей. Рекомбинантные белки отмечены звездочками

Сущность предлагаемого изобретения поясняется примерами его исполнения и использования.

Пример 1. Способ конструирования плазмид pET/RBD, pET/N

В качестве матрицы для амплификации генов, кодирующих белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-

2 используют РНК вируса SARS-CoV-2/KZ\_Almaly04.2020.

Амплификацию генов проводят на термоциклере GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems с использованием набора SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase и специфических праймеров.

Продукты амплификации, кодирующие фрагменты RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, расщепляют ферментами рестрикции XhoI и NcoI, NotI и NcoI. Аналогично проводят обработку рестриктазами плазмидной ДНК вектора pET28. После чего линейизованный вектор и ПЦР-фрагменты очищают электрофоретически в 1% агарозном геле с последующим выделением ДНК с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, в соответствии с рекомендациями производителя. Лигирование проводят в стандартном буфере с использованием T4-ДНК-лигазы. Полученной лигазной смесью трансформируют клетки *E.coli* ER2566. С помощью рестрикционного анализа и ПЦР отбирают клоны, содержащие вставки соответствующих размеров. Полученные таким образом рекомбинантные плазмиды обозначают pET/RBD, pET/N, соответственно. Схемы плазмидных ДНК pET/RBD, pET/N (физические карты) представлены на фигуре.

Пример 2. Получение штаммов-продуцентов рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2.

Клетки *E.coli* ER2566 трансформируют полученными плазмидами pET/RBD, pET/N. Из единичной колонии трансформированных клеток готовят ночную культуру при 37°C. Ночную культуру (1/50) засевают в свежую среду LB с канамицином (50 мкг/мл) и инкубируют при 37°C. Когда культура достигнет среднелогарифмической фазы роста индуцируют синтез белка добавлением изопропил-бета-галактопиранозидом до конечной концентрации 1 мМ. Индуцированные клетки инкубируют при 37°C в течение 4 ч, после чего клетки собирают центрифугированием при 5000 g и анализируют методом электрофореза в 12% ДСН-ПААГ [Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1999. – 1104 pp. ISBN-13978-0-471-32938-1]. Результаты этого анализа, представленные на фигуре 3, показывают наличие в индуцированных культурах клеток *E.coli* ER2566/pET/RBD, ER2566/pET/N дополнительного белка с молекулярной массой 23, 46кДа, соответственно, что согласуется с расчетными значениями молекулярных масс рекомбинантных белков RBD, N.

Пример 3. Очистка рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2

Рекомбинантные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 получают из фракции клеточных включений индуцированных клеток *E.coli* ER2566/pET/RBD, ER2566/pET/N, в результате аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе,

Invitrogen, США, согласно инструкции производителя.

Осадок клеток растворяют в буфере 1 (10 мМ трис HCl pH 7,5, 1% тритон X100, 150 мМ NaCl), из расчета 10 мл на 1 г сырого веса клеток. К полученной суспензии добавляют лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл. Далее проводят двукратно процесс замораживания-оттаивания. Клетки замораживают при температуре минус 80°C в течение 30 мин, оттаивают – при 37°C в течение 30 мин. Затем суспензию инкубируют при 4°C в течение 16 ч. Далее суспензию трехкратно обрабатывают ультразвуком в течение 2 мин с перерывами в 2 мин. Центрифугируют 16000×g при 4°C в течение 20 мин. Осадок (включения) последовательно промывают исходным объемом буфера 2 (20 мМ трис HCl pH 7,5, 2% тритон X100, 500 мМ NaCl), два раза, и один раз буфером 3 (20 мМ трис HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl). Осадок (включения) растворяют в буфере 4 (6 М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ трис HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол) (в исходном объеме буфера 1), инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре на ротаторе с минимальной скоростью вращения. Центрифугируют 16000×g при 4°C в течение 20 мин. Надосадок переносят в чистую емкость, осадок отбрасывают. Затем надосадок фильтруют через капсульные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Полученные фракции используют для выделения рекомбинантных белков методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, Invitrogen, США. Ni-NTA агарозу уравнивают буфером 4 (6 М гуанидин гидрохлорид, 20 мМ трис HCl pH 8, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол). Далее проводят сорбцию белка. Затем колонку отмывают буфером 4 и проводят рефолдинг белка градиентом буфера 4/буфера 5 (100 мМ М аргинина гидрохлорид, 20 мМ трис HCl pH 8, 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, 1 мМ L-глутатиона редуцированного (GSH), 0,1 мМ L-глутатиона окисленного (GSSG)), отмывают буфером 5. Белок элюируют буфером 6 (1 М аргинина гидрохлорид, 20 мМ трис HCl pH 8, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол). Элюат собирают фракциями по 0,5V колонки, которые анализируют электрофоретически. После анализа фракции, содержащие целевой белок объединяют. Удаление имидазола проводят методом гель-фильтрации на сефадексе G-25, уравниваемом буфером 7 (1 М аргинина гидрохлорид, 300 мМ NaCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4).

Определение концентрации рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 в препаратах проводят по методу Лоури [Lowry O.H., Rosebraugh N.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275]. Общий выход белков составляет 5-15 мг очищенного белка с 1 л культуры клеток E. coli.

Пример 4. Оценка иммунохимических свойств рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2

Очищенные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 анализируют методом вестерн-блота с

использованием сывороток доноров, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2. Для этого проводят электрофорез очищенных белков RBD, N в 12% ДНС-ПААГ и переносят на нитроцеллюлозную мембрану, которую после блокирования сайтов неспецифического связывания раствором 5% сухого молока в буфере TBS-T (150 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, 0.1% tween-20, pH 7.5) инкубируют с сыворотками доноров, больных или переболевших новой коронавирусной инфекцией. После чего мембраны отмывают трехкратно буфером TBS-T. Связавшиеся антитела проявляют конъюгатом протеина А со щелочной фосфатазой в разведении. Визуализацию иммунного комплекса осуществляют с использованием 5-бromo-3-индолил фосфата и нитротетразолиевого голубого. Пример вестерн-блот анализа приведен на фигуре 4.

Пример 5. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток животных, иммунизированных рекомбинантными белками RBD, N коронавируса SARS-CoV-2

Для иммунизации хорьков использовали смесь рекомбинантных белков RBD, N по 10 мкг каждого в дозе. Для усиления иммунного ответа белки соединяли с адьювантом AddaS03, Invivogen. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 21 сут. Через две недели после второго введения проводят забор крови для получения сывороток.

Для постановки реакции нейтрализации SARS-CoV-2 используют культуру клеток Vero. Конфлюентный монослой клеток трипсинизируют и ресуспендируют в полной среде. Определяют концентрацию клеток с помощью гемацитометра и сеют клетки в 96-луночные планшеты (Corning, USA) 5 × 10<sup>4</sup> клеток/луночка (0.2 мл/луночка в конечном объеме). Планшеты инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 18-24 ч до получения конфлюентного монослоя.

Исследуемые сыворотки инактивируют при 56°C 30 мин и готовят двукратные разведения от 1:2 до 1:64 в объеме 2 мл каждого разведения используя среду с содержанием 2% FBS в качестве разбавителя. Затем к каждому разведению сыворотки добавляют равный объем вируса SARS-CoV-2 в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Смесь вируса с разведениями сывороток инкубируют при 37°C в течение 1 ч. Каждой смесью заражают по четыре луночки с монослоем клеток в 96-луночной планшете в объеме 200 мкл. Инфицированную культуру клеток инкубируют при 37°C в течение 72 ч. Результаты учитывают через 72 ч по наличию цитопатических изменений в культуре клеток. Разведение, которое ингибирует цитопатический эффект, вызванный вирусом, в 50% инфицированных культур клеток принимают за титр нейтрализующих антител исследуемой сыворотки. В реакции используют следующие контроли: контроль вируса (вирус + среда); контроль сыворотки (сыворотка + среда).

Результаты теста подтвердили способность рекомбинантных белков вызвать выработку в организме животных вируснейтрализующих антител (табл.1).

Из вышеизложенного видно, что получены плазмидные ДНК и бактериальные штаммы-продуценты, обеспечивающие экспрессию рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, имеющих молекулярные массы 23, 46 кДа, соответственно.

Рекомбинантные белки распознаются сыворотками от доноров, инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 и вызывают в организме человека и животных выработку вируснейтрализующих антител.

Таблица 1

Вируснейтрализующая активность сывороток крови хорьков, иммунизированных рекомбинантными белками RBD, N коронавируса SARS-CoV-2

Номер животного	Средний геометрический титр вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2, log <sub>2</sub>
1	2,4±0,2
2	2,73±0,13
3	3,2±0,2
4	2,87±0,13
5	2,53±0,29

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/RBD, рЕТ/N, обеспечивающие синтез рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2 в клетках *Escherichia coli* ER2566, размерами 5857, 6484 п.о., соответственно и содержащие согласно физическим и генетическим картам плазмид:

- плазмидный вектор рЕТ28, включающий фрагмент, кодирующий олигопептид LENNNNNH или AAALENNNNH, и уникальные сайты рестрикции XhoI и NcoI или NotI и NcoI;

- XhoI – NcoI - фрагмент размером 632 п.о., кодирующий фрагмент белка S (RBD) коронавируса SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки, или NotI – NcoI -фрагмент размером 1250 п.о., кодирующий белок N коронавируса SARS-CoV-2, причем нуклеотидные последовательности и кодируемые ею аминокислотные последовательности фрагментов белков и С-концевого олигопептида LENNNNNH или AAALENNNNH, фрагмента плазмидного вектора, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2.

2. Штаммы бактерий *Escherichia coli* ER2566/pET/RBD, ER2566/pET/N, – продуценты

рекомбинантных белков RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, содержащие соответственно рекомбинантные плазмидные ДНК рЕТ/RBD, рЕТ/N по п.1 и депонированные в Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан под регистрационными номерами М-17-20/D, М-18-20/D, соответственно.

3. Рекомбинантные белки RBD, N коронавируса SARS-CoV-2, используемые для создания диагностических тест-систем и конструирования субъединичных вакцин против новой коронавирусной инфекции – COVID-19, имеющие молекулярные массы 23, 46 кДа, соответственно, и состоящие из фрагментов или полных белков коронавируса и С-концевого олигопептида LENNNNNH или AAALENNNNH, включающие аминокислотные последовательности, кодируемые нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2

```

<160> 2
<210> 1
<211> 651
<212> RNA
<213> SARS-CoV-2
<400> 1
  1  Met Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu
    ATG GTT AGA TTT CCT AAT ATT ACA AAC TTG TGC CCT TTT GGT GAA
  46  Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg
    GTT TTT AAC GCC ACC AGA TTT GCA TCT GTT TAT GCT TGG AAC AGG
    Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn
  91  AAG AGA ATC AGC AAC TGT GTT GCT GAT TAT TCT GTC CTA TAT AAT
    Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Val Ser Pro Thr
  136 TCC GCA TCA TTT TCC ACT TTT AAG TGT TAT GGA GTG TCT CCT ACT
    Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Thr Asn Val Tyr Ala Asp Ser Phe
  181 AAA TTA AAT GAT CTC TGC TTT ACT AAT GTC TAT GCA GAT TCA TTT
    Val Ile Arg Gly Asp Glu Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly Gln Thr
  226 GTA ATT AGA GGT GAT GAA GTC AGA CAA ATC GCT CCA GGG CAA ACT
    Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe Thr
  271 GGA AAG ATT GCT GAT TAT AAT TAT AAA TTA CCA GAT GAT TTT ACA
    Gly Cys Val Ile Ala Trp Asn Ser Asn Asn Leu Asp Ser Lys Val
  316 GGC TGC GTT ATA GCT TGG AAT TCT AAC AAT CTT GAT TCT AAG GTT
    Gly Gly Asn Tyr Ser Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser Asn
  361 GGT GGT AAT TAT AAT TAC CTG TAT AGA TTG TTT AGG AAG TCT AAT
    Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr Gln Ala
  406 CTC AAA CCT TTT GAG AGA GAT ATT TCA ACT GAA ATC TAT CAG GCC
    Gly Ser Thr Pro Cys Asn Gly Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe
  451 GGT AGC ACA CCT TGT AAT GGT GTT GAA GGT TTT AAT TGT TAC TTT
    Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr
  496 CCT TTA CAA TCA TAT GGT TTC CAA CCC ACT AAT GGT GTT GGT TAC
    Gln Pro Tyr Arg Val Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu His Ala
  541 CAA CCA TAC AGA GTA GTA GTA CTT TCT TTT GAA CTT CTA CAT GCA
    Pro Ala Thr Val Cys Gly Pro Lys Lys Ser Thr Asn Leu Leu Glu
  586 CCA GCA ACT GTT TGT GGA CCT AAA AAG TCT ACT AAT TTG CTC GAG
    His His His His His His ***
  631 CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA

```

Фиг. 1а – Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды рЕТ/RBD, кодирующая рекомбинантный белок RBD, представляющий собой фрагмент белка S SARS-CoV-2 с 327 по 532 аминокислотные остатки и С-концевой олигопептид LENNNNN

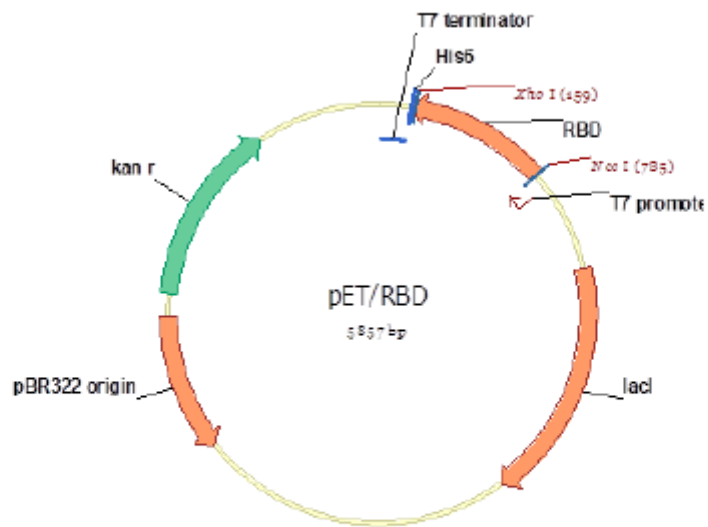
```

<210> 2
<211> 519
<212> RNA
<213> SARS-CoV-2
<400> 2
1   Met Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr Phe
   ATG GAT AAT GGA CCC CAA AAT CAG CGA AAT GCA CCC CGC ATT ACG TTT
49  Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser
   GGT GGA CCC TCA GAT TCA ACT GGC AGT AAC CAG AAT GGA GAA CGC AGT
97  Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr
   GGG GCG CGA TCA AAA CAA CGT CGG CCC CAA GGT TTA CCC AAT AAT ACT
145 Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu Lys
   GCG TCT TGG TTC ACC GCT CTC ACT CAA CAT GGC AAG GAA GAC CTT AAA
193 Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro Asp
   TTC CCT CGA GGA CAA GGC GTT CCA ATT AAC ACC AAT AGC AGT CCA GAT
241 Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly Gly
   GAC CAA ATT GGC TAC TAC CGA AGA GCT ACC AGA CGA ATT CGT GGT GGT
289 Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu
   GAC GGT AAA ATG AAA GAT CTC AGT CCA AGA TGG TAT TTC TAC TAC CTA
337 Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly
   GGA ACT GGG CCA GAA GCT GGA CTT CCC TAT GGT GCT AAC AAA GAC GGC
385 Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp His
   ATC ATA TGG GTT GCA ACT GAG GGA GCC TTG AAT ACA CCA AAA GAT CAC
433 Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln Leu
   ATT GGC ACC CGC AAT CCT GCT AAC AAT GCT GCA ATC GTG CTA CAA CTT
481 Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg
   CCT CAA GGA ACA ACA TTG CCA AAA GGC TTC TAC GCA GAA GGG AGC AGA
529 Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser
   GGC GGC AGT CAA GCC TCT TCT CGT TCC TCA TCA CGT AGT CGC AAC AGT
577 Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Lys Arg Thr Ser Pro Ala Arg
   TCA AGA AAT TCA ACT CCA GGC AGC AGT AAA CGA ACT TCT CCT GCT AGA
625 Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp
   ATG GCT GGC AAT GGC GGT GAT GCT GCT CTT GCT TTG CTG CTG CTT GAC
673 Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln
   AGA TTG AAC CAG CTT GAG AGC AAA ATG TCT GGT AAA GGC CAA CAA CAA
721 Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys
   CAA GGC CAA ACT GTC ACT AAG AAA TCT GCT GCT GAG GCT TCT AAG AAG
769 Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala
   CCT CGG CAA AAA CGT ACT GCC ACT AAA GCA TAC AAT GTA ACA CAA GCT
817 Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln
   TTC GGC AGA CGT GGT CCA GAA CAA ACC CAA GGA AAT TTT GGG GAC CAG
865 Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala
   GAA CTA ATC AGA CAA GGA ACT GAT TAC AAA CAT TGG CCG CAA ATT GCA
913 Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly
   CAA TTT GCC CCC AGC GCT TCA GCG TTC TTC GGA ATG TCG CGC ATT GGC
961 Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile
   ATG GAA GTC ACA CCT TCG GGA ACG TGG TTG ACC TAC ACA GGT GCC ATC
1009 Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu
   AAA TTG GAT GAC AAA GAT CCA AAT TTC AAA GAT CAA GTC ATT TTG CTG
1057 Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys
   AAT AAG CAT ATT GAC GCA TAC AAA ACA TTC CCA CCA ACA GAG CCT AAA
1105 Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg
   AAG GAC AAA AAG AAG AAG GCT GAT GAA ACT CAA GCC TTA CCG CAG AGA
   Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp

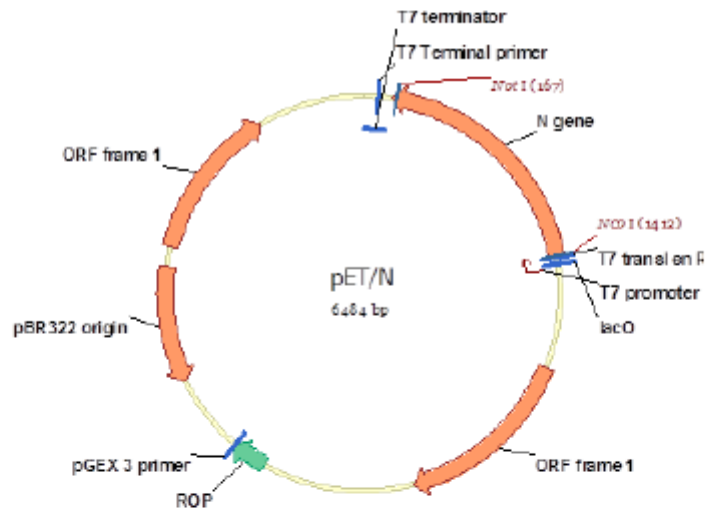
1153 CAG AAG AAA CAG CAA ACT GTG ACT CTT CTT CCT GCT GCA GAT TTG GAT
   Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ala Ala
1201 GAT TTC TCC AAA CAA TTG CAA CAA TCC ATG AGC AGT GCT GAC GCG GCC
   Ala Leu Glu His His His His His His His ***
1249 GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA

```

Фиг. 16 – Нуклеотидная последовательность и кодируемая ею аминокислотная последовательность фрагмента плазмиды pET/N, кодирующая рекомбинантный белок N, состоящий из белка N коронавируса SARS-CoV-2 и С-концевого олигопептида LEHHHHH



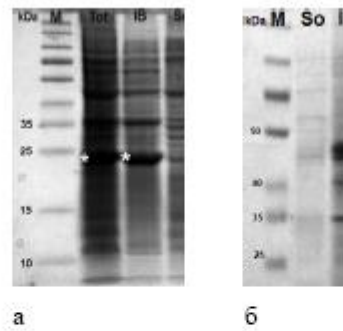
A



Б

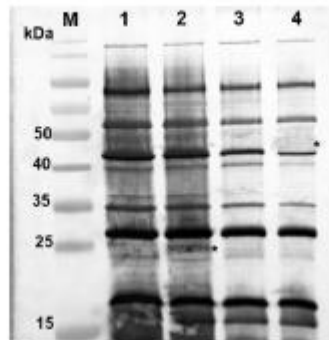
T7 promoter – промотор фага T7, T7 terminator – терминатор фага T7, kan – ген устойчивости к канамицину, указаны также некоторые сайты рестрикции

Фиг. 2 – Общая схема структурной организации плазмид pET/RBD, pET/N, RBD, N – гены, кодирующие соответствующие рекомбинантные белки



М – маркер молекулярного веса (ThermoScientific, США); Tot – после индукции IPTG; So – растворимые белки; IN – включения

Фиг. 3 – Электрофоретический анализ белков клеточного лизата *E. coli* штамма ER2566, трансформированного плазмидами pET/RBD (а), pET/N (б)



М – маркер молекулярного веса; дорожки 1, 2 – RBD; дорожки 3, 4 – N; дорожки 1, 3 – клеточный лизат до индукции; дорожки 2, 4 – после индукции ИПТГ

Фиг. 4 – Вестерн-блот анализ рекомбинантных белков RBD и N