

(19)



VALSTYBINIS PATENTŲ BIURAS

(10) **LT 3312 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: **3312**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 15/31,
C12P 21/02,
C12N 15/62,
C12N 15/31,
C12N 15/76,
C07K 13/00**

(21) Paraiškos numeris: **IP477**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 04 07**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 06 26**

(60) SU duomenys: **SU 4894397, 1991 01 18**

(31,32,33) Prioritetas: **354265, 1989 05 19, US
410706, 1989 09 22, US**

(72) Išradėjas:

**Antonio Daza Ortega, ES
Jose Antonio Gil, ES
Tomas Vigai Garcia, ES
Juan Francisco Martin, ES**

(73) Patent savininkas:

**APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING NV, 6, John B. Gorslaweg, Curacao
(AN), NL**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001
Vilnius, LT**

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

I-859, 19890519, Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, FR

(54) Pavadinimas:

SAF poli-peptidas, genas, promotorius ir jų panaudojimas Streptomyces ekspresijai

(57) Referatas:

Atskleidžiamas naujai išskirto geno, vadinamo SAF (antrinio metabolizmo aktyvacijos faktorius), klonavimas ir apibūdinimas. Šis genas koduoja naują polipeptidą, vadinamą SAF polipeptidu, kuris tiesiogiai arba netiesiogiai moduliuoja iš ląstelės išskiriamų fermentų ekspresiją Streptomyces. Aprašyti DNR vienetai arba fragmentai, koduojantys SAF polipeptidą; vektoriai, turintys minėtą DNR; organizmai-šeimininkai, transformuoti tokiais vektoriais, ir iš ląstelės išskiriamų fermentų arba heterologinių polipeptidų gavimo būdai, kultivuojant tokius organizmus-šeimininkus.

Šis išradimas yra iš biotechnologijos srities. Tiksliau jis skirtas naujam polipeptidui, didinančiam iš ląstelės išskiriamų fermentų gamybą, DNR, koduojančiai šį polipeptidą, rekombinantiniam vektoriui, į kurią įeina ši DNR, ir organizmui-šeimininkui, transformuotam šio rekombinantinio vektoriaus, kurio sudėtyje yra DNR, koduojanti šį polipeptidą. Be to, išradimas skirtas geno, koduojančio šį naują polipeptidą, promotoriaus sekai. Toliau šis išradimas skirtas *Streptomyces* ekspresijos sistemoms ir svetimų DNR sekų ekspresijos *Streptomyces* ir polipeptidų bei baltymų koduojamų šiomis svetimomis DNR sekomis, išskyrimo į terpę būdams.

Streptomyces yra gerai žinomi įvairių iš ląstelės išskiriamų fermentų, įskaitant proteazes, fosfatazes, ksilanazes, celiuliazes, amilazes, lipazes ir nukleazes, gamintojai. Be to, *Streptomyces* giminės nariai gamina daugybę antibiotikų, pigmentų bei kitų antrinių metabolitų ir pasižymi sudėtinga diferenciacija pasibaigiančia sporų susidarymu. Bandymuose *Streptomyces* kultūrų serijose paprastai iš ląstelės išskiriamų fermentų gamybą, antibiotikų gamybos pradžia ir pigmentų biosintezė bei sporuliacija sutampa. Visus šiuos procesus slopina maitinimo sąlygos, skatinančios didelį augimo greitį, ir aktyvuoja P, C ir N kiekio sumažėjimas. Gali būti, kad fermentų išskyrimas, antrinių metabolitų susidarymas ir diferencijacija vieni nuo kitų nepriklauso, bet reaguoja į tuos pačius paleidimo mechanizmus.

Klonuoti keli *Streptomyces* genai, koduojantys iš ląstelės išskiriamus fermentus. Tarp jų - agarazė iš *Streptomyces caelicolor*, endoglikozidazė H iš *Streptomyces plicatus*, ksilanazė iš *Streptomyces lividans*, alfa-amilazė iš *Streptomyces hydroscopicus*, celiuliazė iš *Strept.spA2*, beta-galaktozidazė iš

Strept. lividans ir beta-lakmatazė iš *Strept. cacaoi*,
badius ir *fradiae*.

5 Tačiau mechanizmai, kurie reguliuoja šių genų
ekspresiją, yra iš esmės nežinomi. Prie specifinių
reguliavimo mechanizmų, tokių kaip amilazės indukcija
dekstriniais bei maltotriozė ir anglies metabolinis
amilazės arba agarazės reguliavimas, matyt, atsiras
10 bendri kelių iš ląstelės išskiriamų fermentų
aktyvacijos mechanizmai, kadangi, sumažinus maitinimą,
Streptomyces tuo pačiu metu stebėta kelių polimerinius
substratus degraduojančių fermentų gamyba. Tokie
transaktyvuojantys reguliuojantys genai rasti *Bacillus*
subtilis (J.BACTERIOL. 169:324-333, 1987), *Bacillus*
15 *natto* (J.BACTERIOL.166:20-28,1986), ir *Bacillus*
licheniformis.

Pozityvūs reguliuojantys genai, veikiantys fermentų
gamybą ir/arba sekreciją galėtų būti klonuoti, ieškant
20 padidintos iš ląstelės išskiriamų fermentų sekrecijos
menkuose sekreciniuose kamienuose, tokiuose kaip
S.lividans.

Aprašytos sistemos svetimų DNR sekų ekspresijai
25 *Streptomyces*, pvz., EP 148552 ir WO 88/07079. Šios
sistemos naudoja *Streptomyces* gaminamus iš ląstelės
išskiriamų fermentų endogeninius promotorius.

Pagrindinis šios išradimo tikslas yra pateikti naujo
30 išskirto geno, čia toliau vadinamo saf (antrinio
metabolizmo aktyvacijos faktorius) genu, koduojančio
naują polipeptidą (toliau čia vadinamą SAF
polipeptidu), klonavimą ir apibūdinimą. Šis SAF
polipeptidas tiesiogiai arba netiesiogiai keičia
35 *Streptomyces* iš ląstelės išskiriamų fermentų genų
ekspresiją, sąveikaudamas su ekstraląstelinių fermentų
struktūrinių genų kontroline sritimi.

Kitas šio išradimo aspektas yra organizmai-šeimininkai arba ląstelės, transformuotos aukščiau aprašytais klonuojamais vektoriais, tuo būdu padidinant iš
5 ląstelės išskiriamų fermentų arba norimo heterologinio polipeptido gamybą.

Penktas šio išradimo aspektas yra iš ląstelės išskiriamų fermentų arba norimo polipeptido gavimo
10 būdas, kultivuojant transformuotą organizmą-šeimininką pagal šį išradimą ir išskiriant produktą iš auginimo terpės.

Dar vienas šio išradimo aspektas yra saf geno
15 promotorius.

Ir dar vienas šio išradimo aspektas yra klonuojamų vektorių, kurie apima saf geno promotorių, sujungto su endogeninio iš ląstelės išskiriamo fermento sekrecijos
20 signaline dalimi, abi dalis sujungiant su svetima DNR seka, sukūrimas; šis aspektas taip pat apima organizmus arba ląsteles-šeimininkus, transformuotus tokių klonuojamų vektorių, sukeliančių svetimo polipeptido, koduoto svetimos DNR seka, ekspresiją ir sekreciją.

Kitas šio išradimo aspektas yra tokio klonuojamo vektoriaus, turinčio svetimą DNR seką, integracija į *Streptomyces* chromosominę DNR. Ekspresijos vektorius, turintis saf geną, taip pat bus įjungtas į tokius
30 transformuotus organizmus, ir panaudotas gaunant produktą.

Šie ir kiti šio išradimo objektai bus detalčiau aprašyti tolesniuose skyriuose.

35 Iš *Streptomyces griseus* ATCC 10137 išskirtas DNR fragmentas koduojantis saf (antrinio metabolizmo

aktyvacijos faktorius) geną, dalyvaujantis *S.lividans* ir *S.caelicolor* mažiausiai penkių fermentų įprastoje reguliacijoje. *Saf* genas aptiktas visuose tikrintuose *Streptomyces*, tai leidžia daryti prielaidą, kad šis
5 genas vaidina svarbų vaidmenį metabolizme. Iš tikrųjų, DNR fragmentas, turintis geną, panašų į *saf* geną, mūsų buvo klonuotas iš *Streptomyces griseus* IMRU 3570, kandicidiną gaminančio kamieno. Tiriant kai kuriuos *Streptomyces*, pvz., *S.lividans* ir *S.lactamdurans*, pagal
10 hibridizacijos pobūdį daroma prielaida, kad *saf* genas yra chromosominėje DNR keliuose kopijose.

Toliau aprašomas geno, dalyvaujančio iš ląstelės išskiriamų fermentų gamyboje ir sporuliacijoje
15 *Streptomyces*, pirmas pavyzdys.

Saf genas koduoja 113 amino rūgščių polipeptidą (*SAF* polipeptidą); transkripcijos- transliacijos tyrimai in vitro *E.coli* parodė, kad pasigamina taisyklingo dydžio
20 baltymas - apie 15000 daltonų. *SAF* polipeptidas turi didelį teigiamą krūvį (18 teigiamai pakrautų amino rūgščių) ir neturi sudėties, būdingos lyderiniam polipeptidui arba transmembraniniam baltymui, ir todėl mažai tikėtina jo tiesioginė įtaka baltymo išskyrimui.
25 Teigiamo krūvio baltymas gali lengvai sąveikauti su DNR. Iš tikrųjų, *SAF* polipeptide aptinkama DNR surišanti sritis, būdinga kai kuriems reguliuojantiems baltymams (ANN. REV. BIOCHEM. 53: 293-321, 1984). Netikėtai buvo nustatyta, kad *saf* promotorius yra
30 žymiai veiklesnis negu natūralus iš ląstelės išskiriamų fermentų promotorius. Pvz., amilazės genas ekspresuoja žymiai daugiau amilazės, kai gamtinis amilazės promotorius pakeičiamas *saf* promotoriumi. Tuo būdu, *saf* promotorius gali būti panaudotas vietoj gamtinio
35 baltymo promotoriaus bet kuriuo endogeninio polipeptido arba baltymo ekspresijos padidinimui.

SAF polipeptidas pasižymi plejotropiniu poveikiu, t.y., veikia daugiau negu viena kryptimi iš ląstelės išskiriamus fermentus, pigmentų gamybą ir diferenciaciją. Pagal šį išradimą pasiekama padidinta endogeninių iš ląstelės išskiriamų fermentų gamyba.

Kalbant plačiau, *saf* genas ir atitinkamas polipeptidas gali būti panaudoti norimų heterologinių baltymų iš *Streptomyces* ekspresijos padidinimui, įterpiant geną, koduojantį norimą baltymą į tinkamą skaidymo vietą geno, koduojančio iš ląstelės išskiriamą fermentą, kurio ekspresiją didina SAF, arba jo dalies, transformuojant *Streptomyces* šeimininką, turintį *saf* geną, su rekombinantiniu genu ir kultivuojant transformuotas bakterijas, kad jos išskirtų norimą baltymą arba jo dalį. Geriau, kuomet heterologinė DNR, kontroliuojama *saf* promotoriaus, yra įterpiama chromosominę DNR, ir tuo pačiu metu įterpiamas ekspresijos vektorius, turintis DNR, koduojančią SAF polipeptidą. Ekspresijos vektoriaus nereikia integruoti į chromosominę DNR.

Jau rašyta apie plejotropinius genus, veikiančius antibiotikų sintezę ir *Streptomyces* diferenciaciją. Genas *afsB*, teigiamai reguliuojantis A-faktoriaus, aktinorodino ir prodigiozino gamybą *Streptomyces caelicolor* ir *Streptomyces lividans*, buvo klonuotas iš *S.caelicolor* A3(2) (Horinouchi et al., J.BACTERIOL. 155:1238-1248, 1983).

Saf genas skiriasi nuo *afsB*, ir iš tikrųjų jie priešingai veikia aktinorodino gamybą. Bendra tarp jų yra tai, kad jų aminorūgščių sekos yra būdingos DNR-rišantiems baltymams. Abu genai, *saf* ir *afsB*, turi promotorius be -10 ir -35 suderinimo sekų ir gali jungtis su potencialias transliacijas reguliuojančiais signalais bei stipriu kamieniu ir kilpelinėmis

struktūromis, galinčiais veikti kaip transkripcijos terminatoriai (Horinouchi et al., J.BACTERIOL. 168:257-269, 1986). Jeigu transkripcinė forma sudaro labai stabilia kilpą, tai ribosomų prisijungimas darosi neįmanomas. Rasta, kad tokie į atenuaciją panašūs genų veiklos kontrolės mechanizmai moduliuoja *Streptomyces* atsparumo antibiotikams genus (Horinouchi et al., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 77:7079-7083, 1980). Kadangi saf genas gali būti laikomas "pagrindiniu" genu, įjungiančiu daugybę genų fermentų sekrecijai, jo ekspresija, matomai, griežtai kontroliuojama ląstelėje. Visi fermentai, stimuliuojami saf geno, dalyvauja sudėtingų polimerų skaidyme, ir todėl galima prielaida, kad šis genas yra bendros reguliacijos sistemos dalis, kuri dalyvauja alternatyvių mitybos šaltinių paieškoje, panašiai kaip tai siūloma *Bacillus* atveju (Henner et al., J.BACTERIOL.170:296-300, 1988).

Fig.1 Chromosominės DNR fragmentų iš *S.griseus* ATCC 10137 klonų pIJ702 *Bql* II saite, turinčių genetinę determinantę šarminės fosfatazės supergamybai, restrikcinė analizė.

Fig.2 Homologijos tarp pULAD3 1 kb *Bql* II fragmento ir kitų *Streptomyces* rūšių genomines DNR analizė Spathern hibridizacijos būdu. (A) DNR fragmentai, gauti genomines DNR skaidant *Bam*HI (2-7 takeliai). (B) DNR, parodytų panylyje A, hibridizacija su 1 kb fragmentu kaip zonu. Takeliai: 1.DNR, skaidyta Hind III, gaunant 23, 9.59, 6.68, 4.29, 2.28,1.94 ir 0.58 kb dydžio fragmentus; 2.*S.lactamdurans*; 3.*S.acrimycini*; 4.*S.caelicolor* 1157; 5.*S.griseus* 2212; 6.*S.griseus* 3570; 7.*S.lividans* 1326.

Fig.3 *S.lividans*, transformuotų pIJ702 (kairėje) ir *S.lividans*, transformuotų pULAD3 (dešinėje), proteazės

(A), amilazės (B) ir lipazės (C) aktyvumų tyrimai Petri lėkštelėse.

5 Fig.4 Geno dozės efektas *saf* geno ekspresijai. *S.lividans*, transformuotų pIJ702 (kairėje) ir *S.lividans*, transformuotų pULAD3 (viduryje), ir *S.lividans*, transformuotų pULAD30 (dešinėje), proteazės (A) ir amilazės (B) gamyba.

10 Fig.5 *Saf* geno atskleidimas pULAD3 1kb *Bql* II fragmentas panaudotas kaip pradinė medžiaga. Iš ląstelės išskiriamų fermentų gamyba, panaudojant visas plazmidžių konstrukcijas, įvertinta lėkštelėse su kieta terpe, kaip pažymėta aprašyme: laukinio tipo
15 producenats; ++; +++ ir ++++ žymi skirtingus supergamybos laipsnius. Trumpos atviros rodyklės rodo tirozinazės geno (*mel*) plazmidėje pIJ702 lokalizaciją ir transkripcijos kryptį. Užjuodinti ratukai (•→) žymi *mel* geno promotorių; Atviri ratukai (° →) rodo įprastą promotoriaus plazmidėje pIJ702 aktyvumą ir atviri
20 kvadratai (→) žymi *saf* promotorių. Transkripcijos kryptis parodyta rodyklėmis. ORF1 atitinka *saf* skaitymo rėmelį, išvestą iš nukleotidinės sekos duomenų.

25 Fig.6 pULAD3 1 kb *Bql* II fragmento nukleotidinė seka ir *saf* geno produkto aminorūgščių seka. Pabrauktas antras ATG iniciacijos kodonas. Invertuotos komplementarios pasikartojančios sekos parodytos susieinančiomis rodyklėmis. Banguota linija rodo aminorūgščių seką, panašią į žinomą DNR-surišančių baltymų DNR-jungiančius
30 domenų.

35 Fig.7 *Saf* geno produkto išvesto aminorūgščių sekos srities palyginimas su žinomų DNR-surišančių baltymų DNR-jungiančiais domenais.

Fig.8 Pasikartojančios nukleotidinės sekos prieš srovę ir pasroviui nuo *saf* geno.

5 Fig.9 Pasikartojančios nukleotidų grupės, esančios *saf* gene.

Fig.10 Plazmidė pIJ702.

10 Fig.11 11 A ir B brėžiniuose parodyta išskirto iš *S.griseus* amilazės geno pilna nukleotidų seka ir jo produkto aminorūgščių seka. Manoma, kad *Bst*E II pjūvis yra optimali vieta svetimų geno prijungimui.

15 Fig.12 Strategija, naudota *S.griseus* IMRU 3570 α -amilazės geno klonavimui, panaudojant plazmidę pIJ699.

20 Fig.13 Grafikų serijos rodo įvairių plazmidžių α -amilazės gamybą lėkštelėse priklausomai nuo laiko, esant įvairiai terpei:

(^) MM+krakmolas (1%)+tio

() MM 1 mMMP+krakmolas(1%)+tio

25

() MM be fosfato+krakmolas(1%)+tio

(•) MM+krakmolas(1%)+tio+ITPG.

30 Apatinis panelis dešinėje rodo plazmidės pULVD10 gamybos dydžius, palyginus su pULTV1, *S.lividans* ir pULTV100 (žiūr.Fig.6a) geriausioje gamybos terpėje (X). *S.lividans* (pIJ699) MM be fosfato+1%krakmolas+tio:(•) pULTV1 aukščiau aprašytose terpėse; (-) pULTV100
35 aukščiau aprašytose terpėse; ir (^) pULVD10 MM 1 mMMP+1%krakmolas+tio.

Fig.14 Rekombinatinės *Streptomyces* ląstelės, turinčios chromosominį geną, gaminantį sulietą baltymą su CRF molekule, ir plazmidės, turinčias DNR, koduojančią SAF polipeptidą, konstrukcijos schema.

5

Igyvendinimų, kuriems teikiama pirmenybė, aprašymas

Čia aprašomas darbas buvo atliktas su tokiais medžiagomis ir metodais.

10

Bakterijų kamienai ir plazmidės. Šiuose tyrimuose panaudoti *Streptomyces* ir *E.coli* kamienai, pateikti 1-oje lentelėje. Plazmidės ir fagai pateikti 2-oje lentelėje.

15

Terpė ir auginimo sąlygos. *Streptomyces* kamienai auginti RZYE, minimalioje terpėje (MM), TSB (Difco) arba IEUE, papildytoje 34% sacharozės ir 5 mM MgCl₂ (Hopwood et al., Genetic manipulation of *Streptomyces*. A LABORATORY MANUAL. The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985). *Streptomyces* kamienai auginti induose su trigubomis pertvaromis, esant 28°C temperatūrai rotaciniame kratytuve, sukančią 220 aps/min. greičiu.

25

E.coli kamienai auginti Luria terpėje (LB) (Miller et al., EXPERIMENTS IN MOLECULAR GENETICS, p.433. Cold Spring Harbor Laboratories, New York, 1972) arba Luria Agare (LA), esant 37°C temperatūrai.

30

Fermentų aktyvumo tyrimai lėkštelėse. *Streptomyces* kamienų šarminės fosfatazės (AP-angl.) aktyvumo tyrimai atlikti PRMM terpėje (MM) be gliukozės, turinčioje sumažintą fosfatų kiekį (1 mM), pridėjus 30 mkg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolilfosfato-p-toluidino (XP). Kolonijos, gaminančios AP, buvo mėlynos, o nepajėgios jos pagaminti buvo baltos. *E.coli* kamienams naudota BXP

35

terpė (1 ltr turinti 10 g baktopektono, 12 Trizma bazės, 10 g NaCl, 20 g Difoagaro, pH 7.5 ir 40 mkg/ml XP).

- 5 *Streptomyces* kolonijų amilazės aktyvumas tirtas MM (be gliukozės), pridedant 1% krakmolo. Po 3-jų dienų augimo lėkštelės paveiktos jodo garais. Prašviesėjimo zonos aplink kolonijas atsiranda dėl krakmolo suskaidymo. Lipazės aktyvumas matuotas, auginant *Streptomyces* MM, 10 pridėjus 2% (w/v) alyvų aliejaus, 0,5% (w/v) Tween 80 ir 0.5% Tween 20 (w/v).

- Po 20 dienų augimo į lėkšteles įpilta 1 ml 1 M CaCl_2 . Lipazės gamyba stebima kaip Ca^{2+} -riebios rūgšties- 15 komplekso nuosėdos. Proteazės aktyvumas tirtas MM (be gliukozės), pridėjus 0,5% kazeino ir 10 mM CaCl_2 . Fermento aktyvumas nustatytas kaip prašviesėjimo zonos apie kolonijas.

- 20 *S. caelicolor* agarazės aktyvumas tvirtas MM be gliukozės, užliejant lėkšteles Gramo jodino tirpalu. Beta-galaktozidazės aktyvumas stebimas kaip mėlyna spalva kolonijų, augančių MM be gliukozės, pridėjus X-gali (36 mkg/ml) ir IPTG (10 mkg/ml).

- 25 **DNR išskyrimas.** Visa DNR iš *Streptomyces* išskirta kaip aprašyta Hopwood ir kt. (Hopwood et al., Genetic manipulation of *Streptomyces* A LABORATORY MANUAL. The John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985). Plazmidinė 30 DNR iš *Streptomyces* arba *E. coli* išskirta Kieser metodu (Kieser et al., PLASMID 12:19-36, 1984).

- Klonavimas.** 10 mkg *S. griseus* kamieno ATCC 10137 chromosominės DNR ir 0.5 mkg *pIJ702* suskaidyta Bql II 35 ir liguota 12 valandų, esant 14°C, panaudojant T4 DNR ligazę. Ligavimo mišinys naudotas betarpiškai transformacijai. DNR fragmentų subklonavimas atliktas

skaidant 1-2 mkg plazmidinės DNR atitinkamu
restrikcijos fermentu(-ais), ir reakcijos produktai
atskirti panaudojant gelio elektroforezę žemos lydymosi
temperatūros agarozėje (LMPA-angl.). Norimos DNR
5 juostos ekstrahuotos, panaudojant CTAB metodą
(Landgridge et al., ANAL. BIOCH.103:264271,1980).

Transformacijos būdai. *Streptomyces* kamienai
transformuoti, kaip aprašyta (Hopwood et al., Genetic
10 manipulation of *Streptomyces*. A LABORATORY MANUAL. The
John Innes Foundation, Norwich, U.K., 1985). Po
transformacijos protoplastai patalpinti į R2YE terpę ir
palikti regeneruotis 15-20 valandų, esant 30°C. Tada po
1 ml vandeninio tiostreptono tirpalo (300 mkg/ml)
15 išpilstyta į lėkšteles, džiovinta 1 arba 2 valandas ir
inkubuota 2-3 dienas. Transformantai pernešti į PRMM
terpę, turinčią tiostreptono (50 mkg/ml) ir XP (30
mkg/ml).

20 *E.coli* transformacija atlikta pagal Cohen et al.,
(PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 69:2110-2114,1972).
Transformantų selekcija atlikta lėkštelėse, turinčiose
ampicilino (200 mkg/ml). Esant reikalui, pridėta X-gal
(36 mkg/ml) ir IPTG (10 mkg/ml) į LA lėkšteles.

25 **Hibridizacijos tyrimai.** DNR pernešta iš agarozės gelio
ant nitroceliuliozinių filtrų ir hibridizuota kaip
aprašyta (Hopwood et al., Genetic manipulation of
Streptomyces. A LABORATORY MANUAL. The John Innes
30 Foundation, Norwich, U.K.,1985). 7.2 Kb *Bql* II
fragmentas iš plazmidės pULAD1 ir 2 Kb *Bql* II
fragmentas iš plazmidės pULAD3 panaudoti kaip zondai.
Hibridizacijos atliktos, esant 79°C 24 valandas.
Filtrai plauti dukart po 30 min. 2 g SSC, 0.1% SDS ir
35 tada dar du kartus po 30 min. 0.2 g SSC, 0.1%, esant
70°C.

Nukleotidinės sekos analizė. Nukleotidinė seka nustatyta grandinės terminacijos metodu pagal Sieger et al., (PROC. NATL. ACAD SCI. USA 74:5463-5467, 1977). DNR fragmentai subklonuoti į M13mp10 ir M13np11, kad gautųsi bet kurios orientacijos įterpimas. Ligavimo mišiniai transfektuoti į kompetentines *E.coli* JM103 ląsteles ir pagal baltas dėmes atrinkti intarpai. Sekos nustatytos grandinėse, naudojant Amersham International plc. (U.K.) ir Sequenase (United States Biochemical Corporation, USA) rinkinius analizei. Visų fragmentų sekos nustatytos, naudojant dGTP, bet DITP naudotas vietoj dGTP, kai reikėjo. Reakcijos mišiniai atskirti 6% ir 8% poliakrilamidiniuose sekvenavimo geliuose, po to eksponuojant su rentgeno juosta autoradiografijai.

15

Promotorių klonavimas. Fragmentai, pasižymintys transkripcijos iniciacijos aktyvumu, buvo atrinkti, panaudojant daugiakopijinę promotoriaus-zondo plazmidę pIJ486 (Ward et al., MOL. GENET. 203:468-478, 1986). Transformantai, atsparūs kanamicinui, (Km) išskirti perkeliant į MM, turinčią 15 mkg/ml Km.

20

Transkripcija-transliacija in vitro. Plazmidės pULAD300 ir pUC19 transkribuotos ir transliuotos, panaudojant prokariotinės DNR kryptingos transliacijos rinkinį iš Amersham International plc. L(35S) metioninas naudotas kaip radioaktyvi žymė. 12.5% poliakrilamidiniai geliai, turintys natrio dodecilo sulfato, panaudoti žymėtų baltymų analizei.

25

Išradimo įgyvendinimo variantai

Tolesnis detalus aprašymas iliustruos šį išradimą:

30

Ivairių *Streptomyces* šarminės fosfatazės gamyba.

Tirta dešimties įvairių *Streptomyces* kamienų (sąrašas 1-oje lentelėje) šarminės fosfatazės gamyba keliose kietose terpėse. *S.griseus* ir IMRU 3570 ir *S.griseus* ATCC 10137 buvo geriausi producentai visose ištirtose terpėse. Geriausia kieta terpe šarminės fosfatazės gamybai buvo PRMM (turinti 30 mkg/ml XP). Šioje terpėje *S.griseus* IMRU 3570 ir *S.griseus* ATCC 10137 parodė tamsiai mėlyną spalvą po 48 augimo val. *S.lividans* 1326 ir *S.caelicolor* JI 2280 buvo menki šarminės fosfatazės producentai: per 20 augimo valandų PRMM, turinčioje XP, stebėta tik šviesiai mėlyna spalva.

15 Geno, dalvyaujančio šarminės fosfatazės gamyboje, klonavimas

Iš kamieno *S.griseus* ATCC 101137 išskirta visa DNR suskaidyta *Bql* II, ir ligavimo mišinys transformacijos būdu įvestas į protoplastus *S.lividans* 1326. Transformantai perkelti į PRMM, turinčią tiostreptono (50 mkg/ml) ir XP (30 mkg/ml). Viena tamsiai mėlyna kolonija rasta tarp 2800 melanino negatyvių *S.lividans* transformantų. Ši tamsiai mėlyna kolonija turėjo pIJ702 darinį su 7.2 kb *Bql* II intarpu, kuris pavadintas pULAD1 (Fig.1).

Plazmidė pULAD1 buvo nestabili kamiene *S.lividans* ir po retransformacijos atsirasdavo baltos ir mėlynos kolonijos. Visos mėlynos kolonijos turėjo pradinę pULAD1, o baltos kolonijos - turėjo pULAD1 su delecija ir toliau nebuvo tirtos. Kadangi nestabilumas galėjo būti dėl per didelio intarpo dydžio tokioje plazmidėje, kaip pIJ702, kuri pasižymi nestabilumu, tai 7.2 kb intarpas buvo subklonuotas į plazmidės pIJ699 5 kb *Bql* II fragmentą (Kieser et al., GENE 65: 83-91,1988). Gautos dvi plazmidės su intarpu, orientuotu priešinga

kryptimi. Abi plazmidės buvo stabilios ir genas ekspresavosi abiem orientacijom kamienne *S.lividans*.

Saf geno lokalizacija

5

7.2 kb *Bql* II fragmentas dalinai suskaidytas *Sau3AI* ir liguotas prie *Bql* II suskaidytos *pIJ702*. Ligavimo mišinys transformuotas į *S.lividans* protoplastus, ir transformantai pernešti į PRMM, turinčią XP. Plazmidinė DNR išskirta iš kelių mėlynų kolonijų. Smulkiai ištirtos keturios nedidelės plazmidės: *pULAD2*, *pULAD3*, *pULAD16* ir *pULAD18*, turinčios determinantę šarminės fosfatazės gamybai; jos buvo stabilios, retransformuodavo *S.lividans* protoplastus ir turėjo atitinkamai 2.4, 1, 2.1 ir 1.9 kb dydžio intarpus (Fig. 1). Plazmidė *pULAD3* turėjo patį mažiausią intarpą 1 kb dydžio, kuris vėl galėjo būti išpjautas *Bql* II pagalba. Įvesta į *S.lividans*, *pULAD3* (deponavimo nr. I-859 19.0589 CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 28 rue du Docteur Roux, F75724 Paris Cedex 15, France pagal Budapešto sutartį EPK 28 Taisyklę) padidino šarminės fosfatazės gamybą kaip ir *pULAD1*.

25 **Hibridizacija su kelių *Streptomyces* kamienų chromosomine DNR**

Išskirta iš *S.griseus* ATCC 10137 kamieno visa DNR suskaidyta *BamHI* arba *Bql* II buvo hibridizuota su 7.2 kb *Bql* I II fragmentu iš *pULAD1*, pažymėtu (32p) dCTP "nick" transliacijos būdu. Kaip ir tikėtasi, homologinis šiam zondui 7.2 kb *Bql* II fragmentas aptiktas *S.griseus* ATCC 10137 kamieno DNR, skaidytoje *Bql* II. Visą DNR suskaidžius *BamHI*, tame fragmente rastas vidinis *BamEHI* saitas, kuris davė dvi aiškias hibridizacijos juostas (7.9 Kb ir 9.4 Kb).

Tam, kad būtų išsiaiškinta, ar toks pat genas yra kituose *Streptomyces* kamienuose, visa DNR iš *S.acrimycini*, *S.caelicolor* 1157, *S.griseus* 2212, *S.griseus* 3570, *S.lividans* 1326 ir *S.lactamdurans* NRRL 3802 skaidyta *Bam*HI ir hibridizuota su 1 Kb pULAD3 *Bal* II fragmentu kaip zondų. Hibridizuojant su 9.5 Kb bendra juosta pastebėta tiriant pirmus keturis *Streptomyces* kamienus, minėtus anksčiau. Tuo tarpu pastebėtos atitinkamai 4 ir 5 silpnos hibridizacijos juostos, tiriant DNR išskirtą iš *S.lividans* ir *S.lactamdurans*. Be to, taip pat stebėta hibridizacija su *S.albus* G, *S.caelicolor* JI 2280, *S.clavuligerus* NRRL 3585 ir *S.fradiae* ATCC 10475 DNR. Daugiau nieko nadaryta hibridizacijos juostų apibūdinimui.

15

***E.coli* pho-mutantų komplementacijos stoka**

Pabandyta patikrinti *E.coli* *phoA* mutantų E15 ir AW 1046 komplementaciją, kai klonavome struktūrinį šarminės fosfatazės geną iš *S.griseus* ATCC 10137 kamieno. 7.2 Kb *Bql* II fragmentas iš pULAD1 ir 1 Kb *Bql* II fragmenats iš pULAD3 subklonuoti atskirai abiem orientacijomis *Bam*HI-suskaidytoje pUC19. Visos šios plazmidės konstrukcijos buvo patikrintos *E.coli* kamieno JM103 ląstelėse ir po to panaudotas *E.coli* E 15 (Sarthý et al., J.BACTERIOL. 145:288-292, 1981) ir *E.coli* AW 1046 transformacijai. B-XP nerasta jokių mėlynų kolonijų, tai leido padaryti prielaidą, kad arba pilno struktūrinio šarminės fosfatazės geno nėra *S.griseus* 7.2 kb fragmente arba kad šis genas nesiekspresuoja *E.coli*. Šarminės fosfatazės struktūrinis genas (*phoA*) iš *Bacillus licheniformis* (Hullett, F.M., J.BACTERIOL. 158:978-982, 1984) nesihibridizavo su klonuotu 1 Kb fragmentu (duomenys neparodyti). Be to, *phoB* (reguliacinis) *E.coli* mutantas H2 (Kreuzer et al., GENETICS, 81:459-468, 1975) nebuvo komplementuotas nei

pULAD3 1 kb *Bql* II fragmentu, nei pULAD1 7.2 *Bql* II fragmentu.

Kitų iš ląstelės išskiriamų fermentų supergamyba

5

Kai pULAD3 naudota *S.lividans* protoplastų retransformacijai, stebėta aiški pavėluota ir sporuliacija. Šie plejotropiniai poveikiai paskatino mus ištirti šio geno vaidmenį baltymo išskyrimo arba
10 geno ekspresijos kontrolėje. Kaip parodyta Fig. 3, kai kuriuos iš ląstelės išskiriamus fermentus, tame tarpe amilazę, proteazę ir lipazę, labai gausiai gamino *S.lividans*, transformuotas pULAD3. (β -galaktozidazės gamyba taip pat padidėjo ir jos gamyba prasidėjo
15 maždaug 24-30 val. anksčiau negu netransformuoto *S.caelicolor*. Dėl klonuoto geno plejotropinio poveikio iš ląstelės išskiriamiems fermentams, pigmento gamybai ir diferencijacijai šis genas buvo pavadintas *saf* genu (antrinių metabolizmų aktyvacijos faktorius).

20

Geno dozės efektas

Nustatyta, kad pIJ kopijų skaičius yra 100-200/chromosomai. Nors tikslus pULAD3 kopijų skaičius
25 nenustatytas, abiejų pIJ702 ir pULAD3 juostų intensyvumas rodė esant panašų kopijų skaičių.

Kad ištirtume geno dozės efektą, mes subklonavome pULAD3 1 kb *Bql* II fragmentą į mažo kopijų skaičiaus
30 plazmidės pIJ61 *Bam*HI saitą (3-4 kopijos ląstelei) (Hopwood et al., A LABORATORY MANUAL. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.). Ši nauja plazmidė pavadinta pULAD30. Fig. 4 rodo, kad *S.lividans* transformuotų pULAD30, iš ląstelės išskiriamų fermentų gamyba aiškiai
35 sumažėjo, palyginus su *S.lividans*, turinčiu pULAD3. Be to, *S.lividans*, turintis pULAD30, pasižymėjo panašia

pigmento gamyba ir sporuliacijos pobūdžiu kaip ir netransformuoti *S.lividans*.

5 Ekspresija *E.coli* kamienne ir geno atskleidimas

Nors *saf* genas nekomplementavo *E.coli* Pho mutantų, mes pastebėjome, kad pULAD 1 kb *Bal* II intarpas, subklonuotas viena kryptimi į pUC19 (plazmidė pavadinta pULAD300) buvo ekspresuotas *E.coli*, sukeldamas bakterijų nenormalią morfologiją, auginant kietoje terpėje, ir nebuvo ekspresuotas, kai buvo įterptas priešinga kryptimi (plazmidė pULAD301). Plazmidėje pULAD300 ORF (žiūr. žemiau) yra išsidėstęs žemyn nuo lacZ promotoriaus. Šie rezultatai rodo, kad *saf* genas ekspresuojamas *E.coli* iš lacZ promotoriaus, esančio pUC19.

Transkripcijos-transliacijos *E.coli* (su plazmide pULAD300) tyrimai atlikti taip pat in vitro, reakcijos produktus užnešant į 12.5% poliakrilamidinį gelį. 1500 mol masės juosta buvo takelyje atitinkančiame pULAD300, ir jos nebuvo kontroliniame pUC19 takelyje.

Kad tiksliai nustatytume *saf* geno vietą, nuspręsta toliau testuoti plazmidės pULAD300 1 kb fragmento skaidymą. Šiuose bandymuose pasinaudota restrikcija fermentų *Sst*I (nt 216), *Kpn*I (nt 648) ir *Sal*GI (nt 936) unikaliais pjūvio saitais, esančiais 1 kb fragmente. Įvairūs sub-fragmentai iš pULAD300 1 kb intarpo klonuoti į pIJ2921, po to pUC18 darinys, turintis modifikuotą polilinkeri, buvo apribotas *Bql* II saitais (Fig. 10), išskirtas *Bql* II lipnių galų pagalba ir klonuotas į *Bql* II-suskaidytą pIJ702. Tirta *Streptomyces lividans* šarminės fosfatazės, amilazės ir proteazės gamyba panaudojant visas plazmidžių konstrukcijas. Šių tyrimų rezultatai parodyti

schematiškai Fig. 5, ir iš jų galima padaryti tokias išvadas:

1. 1 kb fragmente yra visas *saf* genas, įskaitant jo gamtinių promotorių, kadangi jis buvo ekspresuotas panašiam lygyje abiejose plazmidės pIJ702 orientacijose (plazmidės pULAD3 ir pULAD4).
2. Matomai, šis *saf* genas yra išsidėstęs 648 nukleotidų *Bql*II-*Kpn*I fragmente (plazmidės pULAD5 ir pULAD6).
3. Fragmentas *Sst*I-*Kpn*I (432 nukleotidai), atrodo, turi genetinę determinantę iš ląstelės išskiriamo fermento supergamybai, bet, matyt yra praradęs savojo promotoriaus sritį, kadangi jis ekspresuojamas esant tik vienai orientacijai (plazmidės pULAD10 ir pULAD14), bet ne priešingai (plazmidės pULAD9 ir pULAD13).
4. 215 nukleotidų fragmentas *Bql* II-*Sst*I turi *saf* geno promotoriaus sritį.
5. Visi poveikiai iš ląstelės išskiriamiems fermentams ir diferencijacijai pasireiškėdavo kartu arba buvo prarandami kartu, tuo parodant, kad vienintelis geno produktas yra atsakingas už poveikį visiems fermentams.
6. Nelauktas pasirodė fragmento *Sst*I-*Kpn*I (*saf* genas be promotoriaus) ekspresijos nebuvimas, pradedant *mel*-geno, esančio pIJ702, tirozinazės promotoriumi, kuris vis dėl to buvo ekspresuotas kryptimi (pagal laikrodžio rodyklę). Šis atradimas reiškia, kad fragmentas, pasižymintis promotoriaus aktyvumu, išdėstyta prieš *mel* geną, prie *Bql* II kolnuojamo saito (Bernar et al., GENE 37:101-110,1985). Nors šis atradimas nebuvo paskelbtas, bet apie jį buvo užsiminę keli autoriai (Gil and Hopwood, GENE 25:119-132, 1983). Veiklaus ORF

galimybė priešinga kryptimi (nuo *KpnI-SstI*) atmesta dėl kelių priežasčių:

A. Toks ORF nebuvo aptiktas, tiriant nukleotidinę seką.

5

B. Jei toks ORF egzistuotų, aišku, kad jis turėtų turėti savąjį promotorių, kadangi fragmentas *BqIII-SstI* (nt1 - nt648) ekspresuojamas abiem kryptim (plazmidės *pULAD5* ir *pULAD6*). Be to, beprasmiška atrodo, kad fragmentas *KpnI-SstI*, kuris turėtų turėti promotorių zonoje *KpnI*, galėtų ekspresuotis tik viena kryptimi.

10

C. Ekspresija *E.coli* visada vyksta tuomet, kuomet promotorius *lacZ* - yra vietoje ar prieš numatomą ORF ir niekada - priešinga kryptimi.

15

DNR viršutinio fragmento ORF1 promotoriaus aktyvumas

Tam, kad patvirtintume promotoriaus egzistavimą *BqI-SstI* fragmente, iš ankstesnių bandymų galime padaryti išvadą, kad šis fragmentas turi geną, koduojanti aminoglikozidofosfotransferazę (neo), be jo promotoriaus. Šio geno ekspresija daro *S.lividans* atspariu kanamicinui ir neomicinui. Kada šis fragmentas buvo subklonuotas į *pIJ486* (*SstI* galu, šalia neo geno), buvo sukurta plazmidė *pIJ 484:216*. Pastebėta, kad *S.lividans*, transformuotas *pIJ 486:216*, auga MM terpėje pridėjus daugiau kaip 100 mkg/ml Km, tuo tarpu *S.lividans*, transformuotas *pIJ486*, neaugo MM terpėje, pridėjus 5 mg/ml Km. Šie rezultatai rodo, kad toks fragmentas pasižymi promotoriaus aktyvumu ir palaiko prielaidą apie numatytą ORF.

20

25

30

Kiti samprotavimai, kurie išvesti iš nukleotidinės sekos tyrimų ir galimo ORF yra tokie:

35

1. *Saf* genas apsuptas dviem sritimis su apverstomis ir komplementarinėmis pasikartojančiomis sekomis, galinčiomis sudaryti rRNR labai stabilius ryšius $G=-38.4$ kkal; esant genui *saf* padėtyje (nt 637-697) (Fig. 8).

5

2. Sekvenuotas fragmentas turi didelį G+C procentą, kas būdinga *Streptomyces* genams.

3. Prieš *saf* geną, tarp ATG (nt 219) ir išsidėsčiusių "aukštyn" kryptimi pasikartojančių struktūrų yra labai įdomi nukleotidinė sritis: joje yra trys pasikartojančių nukleotidų poros (kiekviena su 7 nt) (Fig. 9). Labai panašu, kad ši sritis, ypač promotoriaus zona, vaidina svarbų vaidmenį *saf* geno ekspresijos reguliavime.

15

4. Verta paminėti, kad SAF-baltymas turi 18 suminių teigiamų krūvių. Iš teorinių samprotavimų galima daryti išvadą, kad tai sąlygoja žymiai didesnę afiniškumą DNR. Netgi išvestoje aminorūgščių sekoje galima stebėti sritį, labai panašią į DNR-jungiančius baltymų domenų (Pabo and Sauer, 1984) (Fig. 7).

20

Saf nukleotidinė seka

25

Viso pULAD3 1 kb *Bql* II intarpo nukleotidinė seka nustatyta, panaudojant plazmidę pULAD300 kaip pradinę medžiagą. Kadangi M13mp10 ir M13mpl1 neturi *KpnI* saito, fragmentai su *KpnI* galais pirmiausiai subklonuoti į pUC19, ir po to išskirti *EcoRI* ir *HindIII* fragmentų pavidalu ir įterpti į mp10 ir mp11, suskaidytus *EcoRI* ir *HindIII*. Aktyvaus rajono pilna nukleotidinė seka turi ORF1, susidedanti iš 339 nukleotidų, koduojančių numatomą SAF polipeptidą (Fig. 6). Yra tik vienas atviras skaitymo rėmelis, turintis *BqlIII-KpnI* fragmentą, kuris prasideda ATG iniciacijos kodonu ties nt 183 ir baigiasi TGA stop kodonu ties nt 524 (ORF1

30

35

Fig. 5 ir 6). Kadangi *SstI*-*KpnI* intarpas, esantis plazmidėje pULAD14, pasižymėjo mažesniu aktyvumo laipsniu, negu plazmidės, turinčios pasroviui *SstI* saito sritį (pULAD3, pULAD4 ir pULAD6), tikėtina, kad

5 ATG (nt 219) rėmelyje su numatomu *saf* skaitymo rėmeliu gali veikti kaip iniciacijos kodonas plazmidėse pULAD10 ir pULAD14. Jokie kiti alternatyvūs iniciacijos

10 tripletai negalimi, kadangi egzistuoja TGA terminacijos kodonas prieš srovę pirmojo ATG. Ilga invertuota pasikartojanti sritis, galinti sudaryti labai stabilų

stiebą ir kilpinę struktūrą ($G=-53.6$ kkal), yra aukščiau *saf* geno, nuo nt 90 iki nt 135. Kita invertuota pasikartojanti seka stebėta pasroviui nuo

15 ORF1 terminacijos tripleto ir tęsiasi nuo 637 iki 697 nukleotidų ($G=-38.4$ kkal).

Saf genas turi didelį G+C kiekį (76.3%) ir žymėtus genus (Hopwood et al., Regulation of Gene Expression 25 Years on, Cambridge University Press, p. 251-276,

20 1986).

Esančio prieš srovę nuo ORF1 DNR fragmento promotorinis aktyvumas

25 Kadangi plazmidės, neturinčios *Bql*II-*SstI* fragmento (nuo nt 1 iki nt 216), ekspresavosi tik viena orientacija (plazmidės pULAD10 ir pULAD14), bet ne

priešinga (plazmidės pULAD9 ir pULAD13), atrodo tikėtina, kad ORF1 promotorius yra tame fragmente.

30 Transkripcijos iniciacijos sekos buvimas šioje srityje įrodytas subklonuojant šį fragmentą į promotoriaus zondinę plazmidę pIJ486 (Ward et al., MOL. GEN. GENET. 203:468-478, 1986), turinčią aminogliukozido fosfotransferazės geną (neo) be promotoriaus. Šio geno

35 ekspresija sąlygoja *S.lividans* atsparumą kanamicinui ir neomicinui. *Bql* II fragmentas subklonuotas į pIJ486 (*SstI* galas proksimaliai neo genui) (plazmidė pavadinta

pIJ 486:216). *S.lividans*, transformuotas pIJ486:216 galėjo augti MM, turinčioje daugiau negu 100 mkg/ml kanamicino, tuo tarpu *S.lividans*, turintis pIJ486, neauga MM, turinčioje 5 mkg/ml kanamicino. Tai rodo, kad fragmentas *Bql*II-*Sst*I pasižymi promotoriaus aktyvumu. Tačiau nukleotidinės homologijos su kitais *Streptomyces* promotoriais tyrimai neišryškino tipiško -10 ar -35 sričių "konsensuso" (Hopwood et al., Regulation of gene Expression 25 Years On, Cambridge University Press, p. 251-276, 1986).

Amilazės geno klonavimas

Dabar nustatyta *S.griseus* IMRU 3570 amilazės geno (*amy*) nukleotidinė seka. Visa nukleotidų seka ir išvesta *S.griseus* amilazės geno produkto aminorūgščių seka parodyta Fig. 11. Baltymas su lyderiniu peptidu turi 566 aminorūgštis (nuo nt 318 iki nt 2155, abu įskaitant), kas atitinka 59,713 D PM. Plazmidė pULADV1, turinti visą α -amilazės geną, sukonstruota, skaidant *S.griseus* IMRU 3570 DNR su *Sau*3A, ir išskiriant nuo 3 iki 9 kb frakcijas bei liguojant su *Bql*II-suskaityta pIJ699. Po α -amilazės aktyvumo skryningo atrinkta plazmidė pULTV1, turinti visą α -amilazės geną. Šios plazmidės pULTV1 konstrukcija pateikta Fig. 12. Kitas plazmidės su visu α -amilazės genu gavimo būdas yra jos konstravimas iš dviejų mažesnių fragmentų. Tarp plazmidžių, gautų klonuojant *S.griseus* DNR biblioteka yra tokių plazmidžių, kurios turi dalinį geną, prasidedantį 5'-gale, ir tokių, kuriose dalinis genas prasideda 3'-gale. Iš pirmojo galima gauti 1.3 kb fragmentą *Bam*HI-*Sac*I, į kuri įeina geno 5' galas, o iš antro galima išskirti 1.2 kb *Sac*I-*Sal*I fragmentą, turintį šio geno 3'-galą. Abu fragmentai gali būti sujungti su pIJ2921, paveikta *Sal*I-*Bam*HI, kad gautume plazmidę su intaktiniu α -amilazės genu (pULTV200).

Padidintas saf promotoriaus efektyvumas

Tam, kad išbandytume amy geno ekspresiją, kontroliuojant įvairiems promotoriams, tyrėme kamienų
5 *S.lividans* JI66 amilazės gamybą. Šis amy genas pateiktas įvairių promotorių kontrolei, ir amilazės gamyba lyginta su gamyba, gauta kontroliuojant savam gamtiniam promotoriui (*Pamy*). Tirti saf geno (*Psaf*), Km^r geno (*Pneo*), sintezės PABA genų (*Ppab*) ir *E.coli*
10 β -galaktozidazės geno (*Plac*) promotoriai. Plazmidė pULTV220, turinti amilazės geną be promotoriaus, gauta, liguojant fragmentą *EcoRI-BqlII*, išskirtą iš pULTV200, su 5 *EcoRI-BamIII* suskaidyta pUC18. Fragmentas *EcoRI-HindIII* iš pULTV220 liguotas tiesiog su saf, pab arba
15 Km^r genų promotoriais, kad gautume atitinkamai plazmides pULVD10, pULVA1 ir pULTV80. pULTV150, turinti lac promotorių, gauta pULTV220 skaidant *HindIII* ir liguojant su 5 kb pIJ699 *HindIII* fragmentu.

20 Gautų plazmidžių gamybos tyrimai atlikti lėkštelėse su terpe MM+krakmolais(1%)+tiostreptonas, MM be fosfato+krakmolais+tiostreptonas ir MM+krakmolais(1%)+tiostreptonas+IPTG. Kontrolei naudotos plazmidės pIJ699, pULTV100 (žiūr. Fig. 6a) ir pULTV1. Santykiniai
25 amilazės gamybos matavimai atlikti, įvertinant žiedo apie kiekvieną koloniją, atsiradusio augimo terpę nudažius su I_2 , plotą.

Įvairių konstrukcijų plazmidžių gamybos grafikais
30 pateikti Fig. 13. Išskyrus kontrolę, didžiausia gamyba stebėta terpėje M(1 mM P)+krakmolais+tiostreptonas. Aiškiai matyti, kad gamybos maksimumas gautas panaudojus pULVD10, kuri turi saf geno promotorių (1482 mm^2 , palyginus su 1335 mm^2 kito geriausio
35 producento pULTV150, turinčio *Plac* promotorių, inkubuojant 114 valandų).

Fig. 13 (žemutinis panelis, dešinėje) pateiktas pULVD10 gamybos lygis, palyginus su kontrolėmis, esant geriausioms kiekvienai konstrukcijai žinomoms sąlygoms. pULVD10 gamybos padidėjimas, lyginant su gamtinio pULTV1 gamyba, yra gana žymus: 1482 mm^2 , palyginus su 1105 mm^2 .

Tokiu būdu, *saf* geno promotorius gali būti panaudotas pakeisti kitus, nuosavus, gamtinius promotorius, kad būtų padidinta įvairių endogeninių *Streptomyces* polipeptidų ir baltymų ekspresija. Panašiai, galima tikėtis, kad įterpus svetimą DNR, *saf* geno promotorius duos panašius pagerintus rezultatus, kaip tai parodyta su amilaze.

15

Svetimo polipeptido ar baltymo ekspresija

Tam, kad būtų ekspresuojamas svetimas polipeptidas arba baltymas, geriausia įterpti svetimą DNR į tinkamą endogeninio geno, koduojančio iš ląstelės išskiriamą fermentą, atpažinimo saitą taip, kad būtų gauta svetimo polipeptido arba baltymo sekrecija. Kai šiuo genu yra amilazės genas, tinkamu atpažinimo saitū yra *BstE* II saitas (Fig. 11). Svetima DNR įterpiama tokiu būdu, kad būtų išsaugoti sekrecijos signalai tiek, kiek įmanoma, iš ląstelės išskiriamo fermento geno. Kadangi šie signalai išdėstyti daugiausia lyderinėje sekoje, akivaizdu, kad amilazės geno atveju terminalinis karboksilinis galas taip pat svarbus sekrecijai. Tokiu būdu, gali būti geriau sukurti sulietą baltymą, įterpiant svetimą DNR į endogeninę DNR, negu pašalinti endogeninės DNR transkripcinę dalį ir pakeisti ją svetima DNR.

Žinoma, kad *saf* genas kontroliuoja iš ląstelės išskiriamų fermentų gamybą chromosominėje DNR. Matyt, chromosominėje DNR yra atpažinimo sekos, kurios

atpažįsta SAF polipeptidą ir sukelia iš ląstelės išskiriamo fermento gamybos padidėjimą. *Saf* geno kombinacija su amilazės genu plazmidėje neiššaukia amilazės padidintos gamybos. Tokiu būdu, geriau
5 patalpinti svetimą baltymą, sujungtą su sekrecijos seka endogeninio iš ląstelės išskiriamo fermento, kontroliuojamo SAF, ir geriausia toliau sujungti su *saf* promotoriumi (nesant nuosavo promotoriaus), į chromosominę DNR, vietoje plazmidės. Tuo būdu, svetimo
10 polipeptido arba baltymo gamyba bus toliau sustiprinta gamtiniu SAF. Tolimesniame darbo etape *saf* genas bus plazmidės pagalba įterptas į tuos pačius organizmus, kuriuose svetima DNR seka buvo įterpta į chromosominę DNR. Tai užtikrins svetimo polipeptido arba baltymo
15 padidintą sekreciją.

DNR fragmentai gali būti klonuoti į *Streptomyces* chromosominę DNR bet kurio iš žinomų *Streptomyces* bakteriofaginių vektorių pagalba, tokių kaip 0C31 arba
20 R4 (Chater et al., "Gene cloning in *Streptomyces*" in *Gene Cloning in Organisms Other than E.coli*, ed. by P.H.Hofschneider et al., Springer-Verlag, Berlin, 1982, p.87-95). Fig. 14 diagrama rodo geriausią svetimo baltymo sekrecijos gavimo būdą, šiuo atveju CRF, iš
25 *Streptomyces*. KC 400 yra 031 darinys, kuris neturi surišimo saito (*att*⁻) ir turi *C*⁺ geną. Žiūr. Charter, K.F. et al., "Mutational cloning in *Streptomyces* and the isolation of antibiotic production genes", *Gene*, 26:67-78 (1983). *C*⁺ genas koduoja represorių,
30 reikalingą lizogeninei būsenai palaikyti. Saitas *att* laukinio tipo fage sąlygoja fago prisijungimą prie ląstelės-šeimininkės DNR bei išsilaisvinimą iš ten. Be *att* saito šis fagas negali integruoti į šeimininko chromosomą, kol joje neklonuotas homologinis DNR
35 fragmentas. Tam kamiene-šeimininke gali būti panaudotas bet kuris endogeninis genas ir, tuo būdu, jis paprastai žymimas "genas X" Fig. 14. Fagas 031 KC 400 paruošiamas

žinomais būdais (žiūr. Hopwood, D.A. et al., "Genetic manipulation of *Streptomyces* A Laboratory Manual", The John Foundation, Norwich, U.K. (1985)), tam, kad būtų įterptas geno (geno X) homologinis fragmentas, kaip ir

5 geno turinčio saf promotorių ir endogeninį α -amilazės geną su genu CRF, sujungtu skaitymo rėmelyje su α -amilazės genu. Užkrėtus *Streptomyces* kamieną-šeimininką, geriausia *S. caelicolor* A3(2) (turimą kolekcijoje John Innes Institute, Norwich, U.K.), šiuo

10 fagu visa fago DNR bus įterpta į ląstelės-šeimininkės chromosominę DNR, pradedant homologinio geno X, šiam tikslui geriau panaudojant Campbell tipo rekombinaciją. Kaip nurodyta, visi naudojami būdai šių procedūrų įgyvendinimui yra šios srities specialisto žinių

15 ribose, taip kad toks įterpimas gali būti atliktas tiesiogiai be nereikalingo eksperimentavimo.

Ląstelės su įterptu chromosominiu genu po to paveikiamas taip, kad galima būtų įterpti plazmidę

20 pULAD3. Tokios ląstelės ekspresuos SAF polipeptidą, kuris savo ruožtu padidins chromosominio geno α -amilazės sekreciją. Saf promotoriaus, esantis šiame gene toliau didins α -amilazės sekreciją. Išskirta α -amilazė turės prijungtą prie CRF molekulę, kuri gali

25 būti lengvai atskirta paveikus atitinkamu fermentu.

Nors *Streptomyces* α -amilazės genas pateiktas pavyzdžiu, tačiau reikia suprasti, kad norint padidinti ekspresiją saf promotoriaus pagalba, galima panaudoti

30 *Streptomyces*, bet kokio polipeptido ar baltymo geną ir jį modifikuoti pašalinant jo gamtinų promotorių ir pakeičiant saf promotoriumi. Panašiai svetimas polipeptidas ar baltymas gali būti įterpti į bet kuri iš endogeninių genų. Geriau, kai parenkamas toks

35 endogeninis genas, kuris ekspresuoja sekretuojamą baltymą, šiuo atveju svarbu išsaugoti sekrecijos signalinę seką. Geriausi rezultatai bus gauti, kuomet

pasirinktas genas svetimo geno įterpimui yra SAF promotoriaus valdomas ir kuomet įterpiama į chromosominę DNR, be to, panaudojant konkurentinį plazmidės, turinčios saf geną, įterpimą.

5

Nors CRF buvo paminėtas specialiai, reikėtų suprasti, kad svetima DNR seka gali būti bet kuri ne iš *Streptomyces* išskirta DNR seka, koduojanti baltymą arba polipeptidą, ypač eukariotinės arba virusinės prigimties. Tokių eukariotinių ir virusinių DNR sekų pavyzdžiai yra sekos, koduojančios žmogaus ir gyvulio leukocitų interferonus ($\text{IFN-}\alpha$), fibroblastų interferonus ($\text{INF-}\beta$) ir imuninius interferonus ($\text{INF-}\gamma$), žmogaus insuliną, žmogaus ir gyvulio augimo ir kitus hormonus, pavyzdžiui, kartikotropiną išlaisvinantį faktorių (CRF), žmogaus serumo albuminą ir įvairius žmogaus kraujo faktorius ir plazminogeno aktyvatorius, bei audinių, urokinazės, hepatito B viruso šerdies ir paviršiaus antigenus, FMD viruso antigenus ir kitus žmogaus, gyvūnų ir virusinius polipeptidus ir baltymus.

20

Nors saf promotoriui teikiama pirmenybė, svetimo polipeptido arba baltymo gamyba toliau bus didinama, transformuojant ląsteles-šeimininkus ekspresijos vektoriumi, turinčiu saf geną. Ekspresijos vektorius gali būti šios ląstelės plazmidės DNR. Tuo būdu, gali būti panaudotas endogeninis arba bet kuris kitas promotorius, ir bus gauta svetimo polipeptido arba baltymo sekrecija.

25

30

Šis konkrečių įgyvendinimų aprašymas taip atskleidžia bendrą išradimo esmę, kad kiti, panaudodami savo žinias šioje srityje, galės lengvai modifikuoti ir/arba pritaikyti išradimą įvairiems kitiems panaudojimams konkrečių kitų įvairių įgyvendinimų forma, neatsitraukdami nuo bendros koncepcijos, todėl tokios adaptacijos ir modifikacijos įjungiamos į atskleistų

35

įgyvendinimų reikšmę ir apimtį. Taip pat reikėtų suprasti, kad šio išradimo frazeologija ir terminologija panaudota ne apribojimams, o aprašymo aiškumui.

5 **1-a lentelė.** Bakteriniai kamienai

Pažymėjimas	Atit. charakteristika	Šaltinis
<i>S.griseus</i> ATCC 10137	laukinis tipas	ATCC
<i>S.griseus</i> JI 2212	laukinis tipas	JI
<i>S.griseus</i> IMRU 3570	laukinis tipas	IMRU
<i>S.griseus</i> JI 1326	laukinis tipas	JI
<i>S.acrimycini</i> JI 2236	laukinis tipas	JI
<i>S.caelicolor</i> JI 2280	<i>CysE24, PabA1, str1</i>	JI
<i>S.clavuligerus</i> NRRL 3585	laukinis tipas	NRRL
<i>S.lactamdurans</i> NRRL 3802	laukinis tipas	NRRL
<i>S.albus</i> G	laukinis tipas	JI
<i>E.coli</i> E15	<i>phoAB</i>	CGSC
<i>E.coli</i> AW1046	<i>phoA, phoC, tsZ::tnS, leu, Kan^R</i>	1
<i>E.coli</i> H2 (<i>E.coli</i> CGSC 5259)	<i>phoB52, pho-35</i>	CGSC
<i>E.coli</i> JM103	<i>proAB, lacZ M12</i>	2

JI: Collection of microorganisms of John Innes Institute.

Coleny Lane, Norwich NR4 UH, United Kingdom.

ATCC: American Type Culture Collection.

IMRU: Waksmans Institute of microbiology, Rutgers University,
New Brunswick, N.J., USA.

NRRL: Northern Regional Research Laboratories, Peoria, ILL.USA.

CGSC: *E.coli* Genetic Stock Center.

2-a lentelė. Plazmidės ir fagai

Žymėjimas	Atit. charakteristika	Šaltinis
pIJ702	atsparumas tiostreptonui ir melaninas ⁺	3
pIJ699	atsparumas tiostreptonui, biomicinui ir kanamicinui	4
pIJ61	atsparumas tiostreptonui ir neomicinui	5
pIJ486	atsparumas tiostreptonui ir saf genas be promotoriaus	6
pULAD serija	<i>Streptomyces</i> ir <i>E.coli</i> vektoriai, turintys saf geną ir/arba papildomas sekas	Šis darbas
pIJ486::216	pIJ486, turinti saf promotoriaus sritį	Šis darbas
pUC19	bla ⁺ , lacZpZoZ'	7
pIJ2921	bla ⁺ , lacZpZoZ'	Žiūr. Fig. 10
M13mp10 ir mpl1	fagai viengrandinės DNR gavimui	8
pULTV1 ir 200	<i>Streptomyces</i> vektoriai, turintys amilazės geną	Šis darbas
pULTV220	<i>Streptomyces</i> vektorius, turintis amilazės geną be promotoriaus	Šis darbas
pULVD10	<i>Streptomyces</i> vektorius, turintis amilazės geną su saf promotorium	Šis darbas
pULVA1	<i>Streptomyces</i> vektorius, turintis amilazės geną su pab promotorium	Šis darbas
pULTV80	<i>Streptomyces</i> vektorius, turintis amilazės geną su Km ^r promotorium	Šis darbas
pULTV150	<i>Streptomyces</i> vektorius, turintis amilazės geną su lac promotorium	Šis darbas

Literatūra, cituojama 1-oje ir 2-oje lentelėse

1. Hoffman, C.S., Wright.1985. Fusion of secreted
proteins to alkaline phosphatase: an approach for
5 studying protein secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
82:5107-5111.

2. Messing, J., R. Crea, and P.H. Seeburg. 1981. A
system for shotgun DNR sequencing. Nucl. Acids. Res.
10 9:309-321.

3. Katz, E., C.J. Thompson, and D.A. Hopwood.1983.
Cloning and epression of the tyrosinase gene from
Streptomyces antibioticus in *Streptomyces lividans*. J.
15 Gen. Microbiol.129:2703-2714.

4. Kieser, T., and R.E. Melton.1988. Plasmid pIJ699, a
multicopy positive-selection vector for *Streptomyces*.
Gene 65:83-91.
20

5. Hopwood, D.A., M.J..Bibb, K.F. Chater, T. Kieser,
C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P., Smith,
J.M. Ward, and H. Schrempf 1985. Genetic manipulation
of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes
25 Foundation, Norwich, U.K.

6. Ward, J.M., G.R. Janssen, T. Kieser, M.J. Bibb, M.J.
Butner, and M.J. Bibb.1986. Construction and
characterization of series of multi-copy promoter-
30 prober plasmid vectors for *Streptomyces* using the
aminoglycoside phosphotransferase genes from Tn5 as
indicator. Mol Gen. Genet. 203:468-478.

7. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Massing.1985.
35 Improved M13 phage cloning vectors and host strains:
nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
GENE 33:103-119.

8. Messing, J.1983. New M13 Vectors for Cloning. Methods Enzymol.101:20-78.

5 ***Streptomyces lividans* KULTŪRŲ TRANSFORMUOTŲ ĮVAIRIOMIS PLAZMIDĖMIS BALTYMO-NEŠĖJO (AMILAZĖS) KIEKYBINIS ĮVERTINIMAS KULTŪROS TERPĖSE (SUPERNATANTUOSE)**

10 Mes naudojome tris skirtingus būdus išskirto baltymo kiekiui nustatyti:

1. Nudažytų sudabru baltymo juostų SDC-PAGE geliuose arba tų pačių gelių fotonegatyvų (juostų) spektrodensitometrija, panaudojant Shimadzu
15 spektrodensitometrą.

2. Įvairių baltymų kiekių analizė, panaudojant aukšto slėgio skystinę chromatografiją, įrengtą su kolonėle C8 Aquapore RP-300 (200x4.6 nm: Brownlee Labs, USA).
20

3. HPLC analizė, panaudojant molekulinę Sievino (gelio filtracija) kolonėlę Protein Pak 300 SW.

REZULTATAI

25 *S.lividans* (pULTV1100), *S.lividans* (pULVD10) ir *S.lividans* (pULTV80) sporos inokuliuotos į Lechevalier + 1% krakmolo terpę. Maksimalus amilazės aktyvumas gautas atitinkamai per 36, 60 ir 60 fragmentacijos
30 valandas. Bendras baltymo kiekis belasteliniam skystyje (supernatante) nustatytas Bradford metodu. 5 µg proteino iš kiekvienos terpės ištirta SDS-PAGE ir nudažyta sidabru.

35 1. Spektrodensitometrija atlikta *S.lividans* (pULTV100) (5µg proteino), *S.lividans* (pULVD10) (5µg proteino)

S.lividans (pULTV80 (5 µg proteino) supernatantų SDS-PAGE (10% akriliamido) juostų spektrodensitometrija.

2. Aukšto slėgio skystinės chromatografijos (HPLC) kolonėlėje Awuapore RP-300-baltymai eliuoti panaudojant 50 mM acto rūgšties-amonio acetato buferį ir metanolio gradientą; 0-20 min. 0% metanolį; 30-35 min. 100% metanolį; 45 min. 0% metanolį. Amilazė eliuota 100% metanolium per 33-34 min. Rezultatai parodyti 3-ioje lentelėje.

3. HPLC *proteine-Pak 300 SW* - tų pačių darinių, kaip aukščiau kultūros terpių supernatantai, dializuoti ir koncentruoti liofilizacija. Baltymai išplauti acto rūgšties- amonio acetato buferiu su srauto greičiu 0.5 ml/min. Amilazės eliucijos piko centras 21-22 min.

3-ia lentelė

Maksimalus specifinis aktyvumas (nkatal/mg dr svorio)		Baltymo koncentracija supernatante (mg/l)	α-amilazė (%)				α-amilazės (mg/l) baltymas			
			HPLC		Shimadzu (450nm)	HPLC				
			Protein Pak 300 SW	Aquapore		Protein Pak 300 SW	Aquapore RP-300			
pULTV100	25 (36 h)	143	58%	40%	49%	82.9	57.2	71		
pULVD10	450 (60 h)	965	86.03%	70.5%	84.2%	849.5	680	812		
pULTV80	430 (60 h)	662	--	--	88.6%	--	--	586		

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Grynas polipeptidas, turintis tokią aminorūgščių seką:

5

Met Cys Ser Ala Val Val Ala Ala Ala Val Ser Ser Met Ser Arg
Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ala Thr Arg Arg Ser Ala Ala Val Ser
Pro Pro His Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Cys Ile Ser Ala Cys Ser
Trp His Ser Thr Ile Thr Gly His Arg Ala Gln Thr Arg Leu Ala
10 Ala Ser Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ala Val Gly Ser Phe Asp Gly
Ala Lys Asn Arg Pro Ala Ser Ser Arg Arg Gln Ala Ala Ser Glu
Cys Gln Gly Pro Ala Ser Ser Ser Arg Ala Gly Val Arg Trp Ala
Gly Thr Ala Ala Asn Gly Arg Gly Ter

15 ir/arba jos fragmentus, pasižyminčius tuo pačiu aktyvumu.

2. DNR seka, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji koduoja polipeptidą pagal 1 punktą.

20

3. DNR seka, turinti tokią nukleotidinę seką:

ATG TGC TCG GCC GTC GCG GCG GCG GCC GTG AGC TCG ATG TCC CGC
CGT CGC CGC CGG GCC AGC GCC ACC CGG CGC TCC GCT GCG GTG AGC
25 CCG CCC CAC ACT CCG TAC CGC TCG GGC TGT ACT AGC CGC TGC TCC
TGG CAC TCC ACC ATC ACC GGA CAC CGG GCA CAG ACC CGC TTG GCC
GCC TCC TCG CGG GCC AGC CGG GCG GCG GTC GGC TCC TTC GAC GGG
GCG AAG AAC AGG CCG GCC TCG TCG CGG CGG CAG GCC GCA TCG GAA
TGC CAG GGG CCC GCG TCG TCC TCC CGT GCG GGG GTC CGC TGG GCC
30 GGA ACG GCG GCG AAC GGC AGA GGC TGA.

4. DNR seka, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji hidridizuoja su nukleotidine seka pagal 3 punktą ir koduoja SAF tipo polipeptidą.

35

5. Vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi DNR seką pagal 2 punktą.

6. Vektorius pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad DNR seka apribota reguliacijos
vienetais.

5

7. Vektorius pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad reguliacijos vienetas prieš srovę ATG
turi tokią polipeptidinę seką:

10 AGATCTCCTCGTCCCACCGGCTGTCTGAAGCTCCGCGCCTACAGCGCCATCGACTT
CGACCGGGCGAAATAGGAAGCGGCCGCGACAAAACGGGGAGGGGCGGGAAACGG
TGGTCCGTTTCCCGCCCCCTGCCCCGTAGGCCGTGCGCGTCCCGCCGGTGC GCGGCG
TTCAGCCCCGCCGCT.

15 8. Streptomyces ląstelė-šeimininkė b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad ji transformuota vektoriumi pagal
5 punktą.

20 9. Polipeptido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad polipeptidą gauna kultivuojant ląstelę-
šeimininkę pagal 8 punktą.

10. Vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
jis turi DNR seką pagal 3 punktą.

25

11. Vektorius pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad DNR seka apribota reguliacijos
vienetais.

30 12. Vektorius pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad reguliacijos vienetas turi tokią
nukleotidinę seką:

35 AGATCTCCTCGTCCCACCGGCTGTCTGAAGCTCCGCGCCTACAGCGCCATCGACTT
CGACCGGGCGAAATAGGAAGCGGCCGCGACAAAACGGGGAGGGGCGGGAAACGG
TGGTCCGTTTCCCGCCCCCTGCCCCGTAGGCCGTGCGCGTCCCGCCGGTGC GCGGCG
TTCAGCCCCGCCGCT.

13. *Streptomyces* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad ji transformuota vektoriumi pagal
10 punkta.
- 5
14. Polipeptido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad polipeptidą gauna, kultivuojant
ląstelę-šeimininkę pagal 13 punkta.
- 10
15. Vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
jis turi DNR seką pagal 4 punkta.
- 15
16. Vektorius pagal 15 punkta, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad DNR seka apribota reguliacijos
vienetais.
- 20
17. Vektorius pagal 16 punkta, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad reguliacijos vienetas prieš srovę ATG
turi tokią nukleotidinę seką:
- 25
- AGATCTCCTCGTCCCACCGGCTGTCGAAGCTCCGCGCCTACAGCGCCATCGACTT
CGACCGGGCGAAATAGGAAGCGGCCGCGACAAAACGGGGAGGGGCGGGAAACGG
TGGTCCGTTTCCCGCCCCTGCCCCTAGGCCGTGCGCGTCCCGCCGGTGCGCGGCG
TTCAGCCCGCCGCT.
- 30
18. *Streptomyces* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i -
r i a n t i tuo, kad ji transformuota vektoriumi pagal
15 punkta.
- 35
19. Polipeptido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad polipeptidą gauna kultivuojant ląstelę-
šeimininkę pagal 18 punkta.
20. Plazmidė pULAD3, deponuota CNCM (Prancūzija) 1989 05 19,
Nr.I-859.

21. Promotorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis turi tokią DNR seką:

5 AGATCTCCTCGTCCCACCGGCTGTCTGAAGCTCCGCGCCTACAGCGCCATCGACTT
CGACCGGGCGAAATAGGAAGCGGCCGCGACAAAACGGGGAGGGGCGGGAAACGG
TGGTCCGTTTCCCGCCCCTGCCCCGTAGGCCGTGCGCGTCCCGCCGGTGCGCGGCG
TTCAGCCCCGCCGCT.

10 22. Klonuojamas vektorius, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi DNR seką, koduojančią polipeptidą arba baltymą, besijungiantį su promotoriumi pagal 21 punktą.

15 23. Klonuojamas vektorius pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka yra viena iš *Streptomyces* kamienų endogeninių sekų.

20 24. Klonuojamas vektorius pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka turi visą arba dalį sekos, koduojančios polipeptidą arba baltymą, endogeniniu *Streptomyces*, prie kurios buvo prijungta tame pačiame skaitymo rėmelyje DNR seka, koduojanti ne *Streptomyces* polipeptidą arba baltymą.

25 25. *Streptomyces* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji transformuota klonuojamu vektoriumi pagal 22 punktą.

30 26. *Streptomyces* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji transformuota klonuojamu vektoriumi pagal 23 punktą.

35 27. *Streptomyces* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad ji transformuota klonuojamu vektoriumi pagal 24 punktą.

28. Svetimos DNR sekos ekspresijos *Streptomyces* kamiene būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis numato

operatyvų nurodytos svetimos DNR sujungimą su *Streptomyces* seka, kontroliuojančia ekspresiją, įjungiančiai promotorių pagal 21 punktą.

- 5 29. Ekspresijos būdas pagal 28 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad svetima DNR seka ir *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seka yra įterpiamos į chromosominę *Streptomyces* DNR.
- 10 30. Ekspresijos būdas pagal 29 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad *Streptomyces* toliau įjungia plazmidę, galinčią išskirti SAF tipo polipeptidą.
- 15 31. Ekspresijos būdas pagal 28 punktą, b e s i s k i r
i a n t i s tuo, kad minėta svetima DNR seka yra operatyviai sujungta su minėta *Streptomyces* ekspresijos kontrolės seka per DNR seką, koduojančią bent dalį baltymo arba polipeptido, sekretuojamo *Streptomyces*, ir minėta DNR seka, koduojanti šią signalinę seką,
20 išskiriama kartu su nurodyta svetima DNR seka, reguliuojant minėtai *Streptomyces* ekspresijos kontrolės sekai, kad įvyktų šio baltymo arba polipeptido, koduojamo šia DNR seka, sekrecija.

FIG. I

PLAZMIDÈS

INTARPAI pIJ702

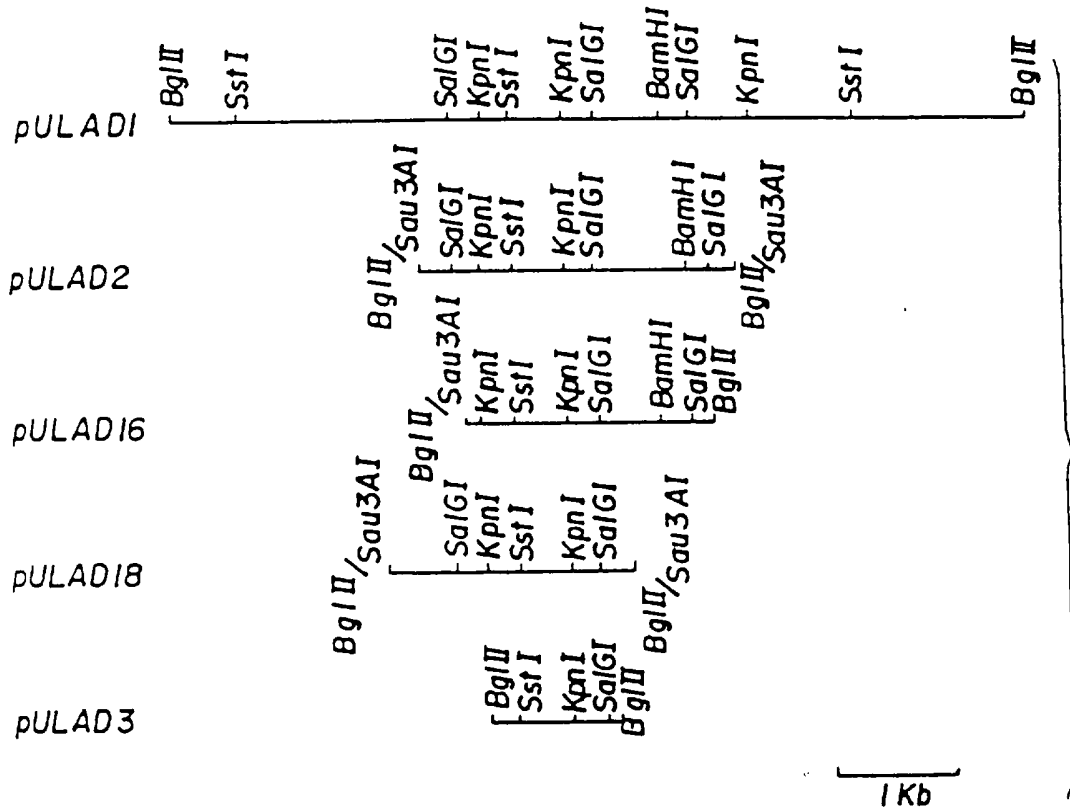
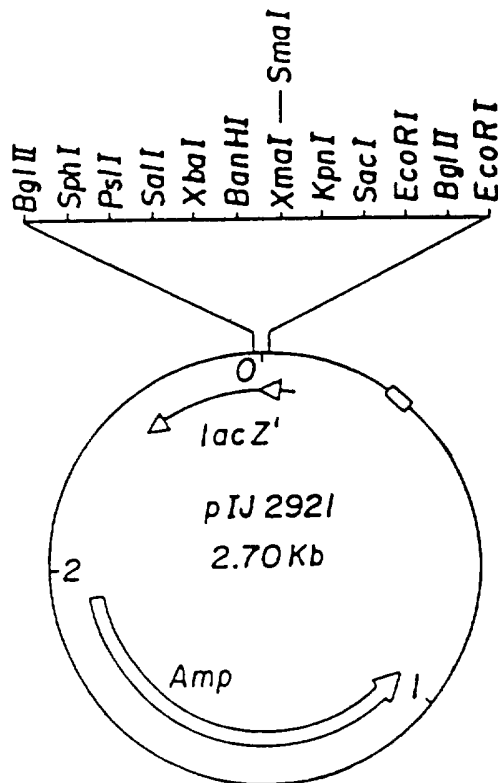


FIG. IO



LT 3312 B

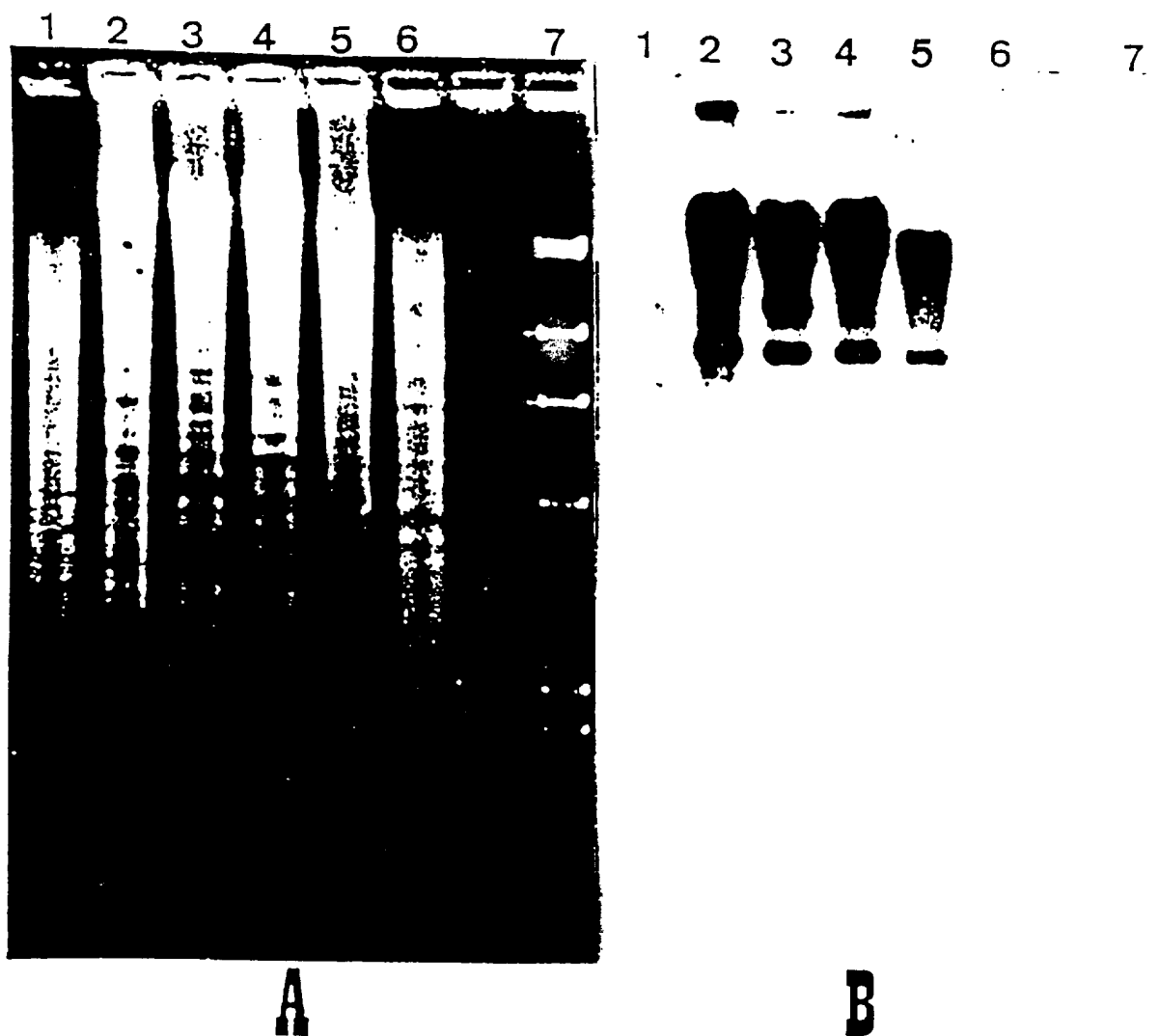


FIG. 2

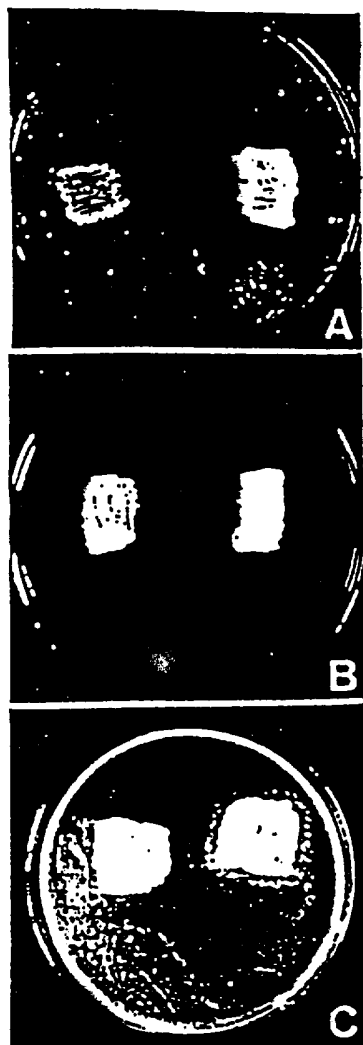


FIG. 3

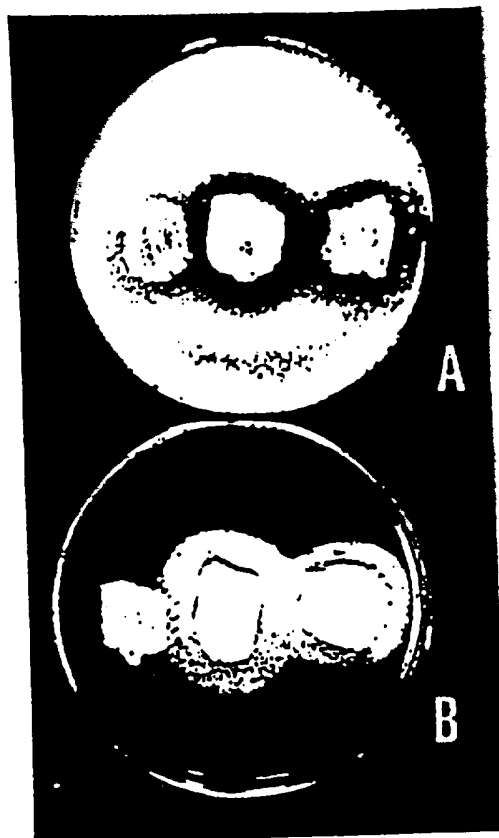


FIG.4

IŠ LAŠTELĖS IŠSKIRIAMO FERMENTO
GAMYBA

INTARPAS | pIJ702

PLAZMIDĖ

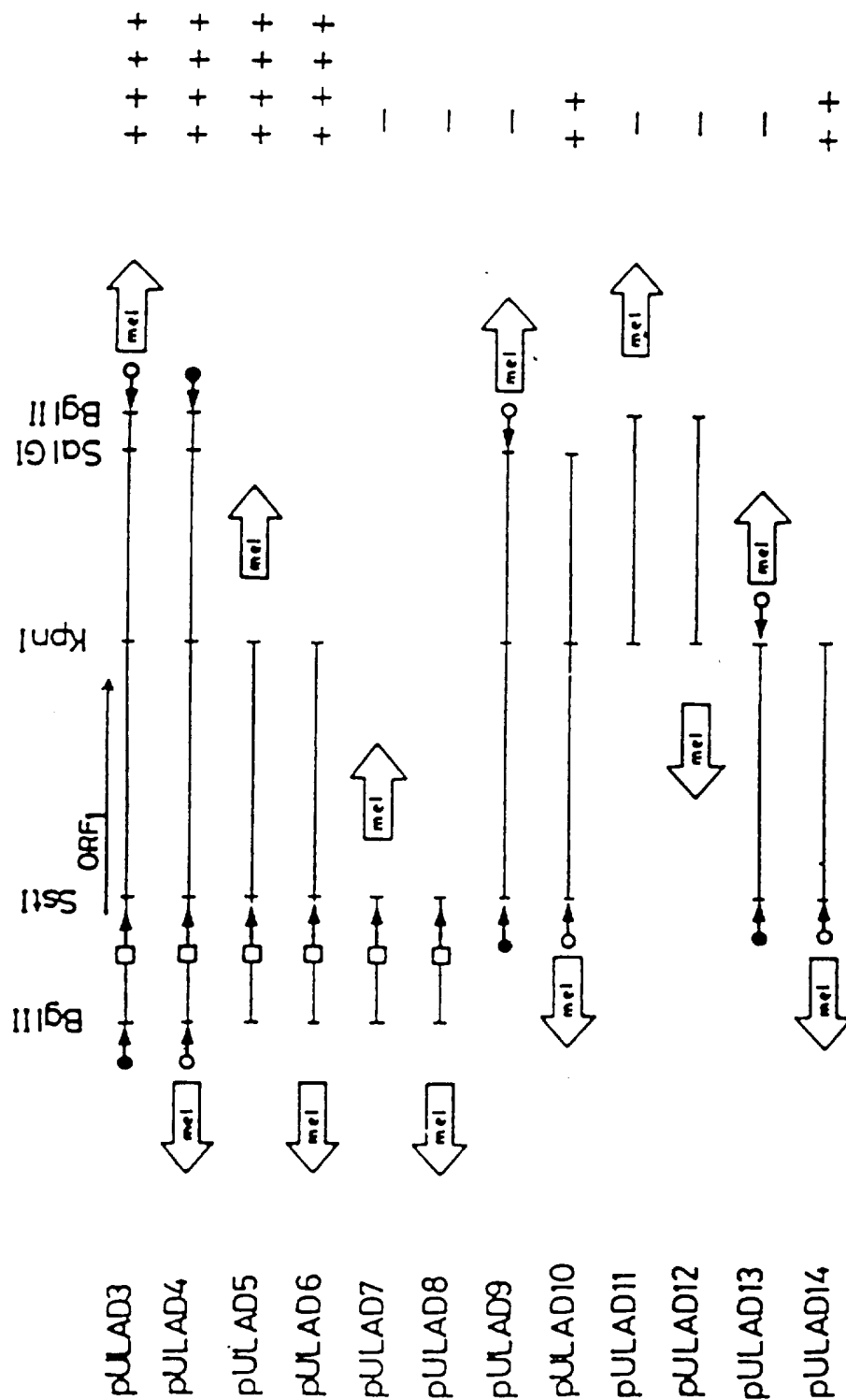


FIG.5

FIG.6

BglII

AGATCTCCTCGTCCACCGGCTGTCGAAGCTCCGGCCTACAGCGCCATCGACTTCGAC 59

CGGGCGAAGTAGGAAGCGGCCGGCGACAAACGGGGAGGGGCGGGAACGGTGGTCCGT 118
 ←

TTCCCGCCCCCTGCCCGTAGGCCGTGCGCGTCCCGCCGGTGCGCGGCGTTCAGCCCGCCG 177

CCGCT ATG TGC TCG GCC GTC GTC GCG GCC GCC GTG AGC 215
 Met Cys Ser Ala Val Val Ala Ala Val Ser

Sst

I TCG ATG TCC CGC CGT CGC CGC GCC AGC GCC ACC CGG CGC TCC 260
 Ser Met Ser Arg Arg Arg Ala Ser Ala Thr Arg Arg Ser

GCT GCG GTG AGC CCG CCC CAC ACT CCG TAC GGC TCG GGC TGC ATC 305
 Ala Ala Val Ser Pro Pro His Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Cys Ile

LT 3312 B

FIG.6 (tesinys)

AGC GCG TGC TCC TGG CAC TCC ACC ATC ACC GGA CAC CGG GCA CAG 350
 Ser Ala Cys Ser Trp His Ser Thr Ile Thr Gly His Arg Ala Gln

ACC CGC TTG GCC GCC TCC TCG CGG GCC AGC CGG GCG GTC GGC 395
 Thr Arg Leu Ala Ala Ser Ser Arg Ala Ser Arg Ala Ala Val Gly

TCC TTC GAC GGG GCG AAG AAC AGG CCG GCC TCG TCG CGG CCG CAG 440
 Ser Phe Asp Gly Ala Lys Asn Arg Pro Ala Ser Ser Arg Arg Gln

GCC GCA TCG GAA TGC CAG GGG CCC GCG TCG TCC TCC CGT GCG GGG 485
 Ala Ala Ser Glu Cys Gln Gly Pro Ala Ser Ser Ser Arg Ala Gly

GTC CGC TGG GCC GGA ACG GCG GCG AAC GGC AGA GGC TGA 524
 Val Arg Trp Ala Gly Thr Ala Ala Asn Gly Arg Gly ter

TGCGGGGTTGCAGCACGGTCTACTCCTGACGACGGCTACGGCTTCGCGAGGATGAGTC 583

LT 3312 B

FIG.6 (tesinys)

GATGCAGCTCTCCCTACCCGCTGTGCGTACGCTAAGCACGGAGCGCCACCAGCGCGCG 642

KpnI

GGGTACCGGAATGGGCCCCCGGGCCTTTTGGCCGATTACCGGAGGTGCGCGGCCCCGC 701

← - - - - - →

CGTATACCGTGCGCACCCGTATTCAGTGGCCGAGGTGTTTGCAGCGCGCTGCTGGA 760

GGTCCGCCACGAACTTGCCCCGCTTCGGCCTGGCTTCCACGCTGCCGAACACGGAATAG 819

CCGTTGACCACGACCGGTGCTTCCGGGTCCGCCGATTCGAGCGTCCGCACGTCGAA 878

S

GGT⁺GCCGAAGACGCCCGTGCCGCTGCCGCGCAGGGAAATGTTCTCCGGCACCCGGACGT 937

stI

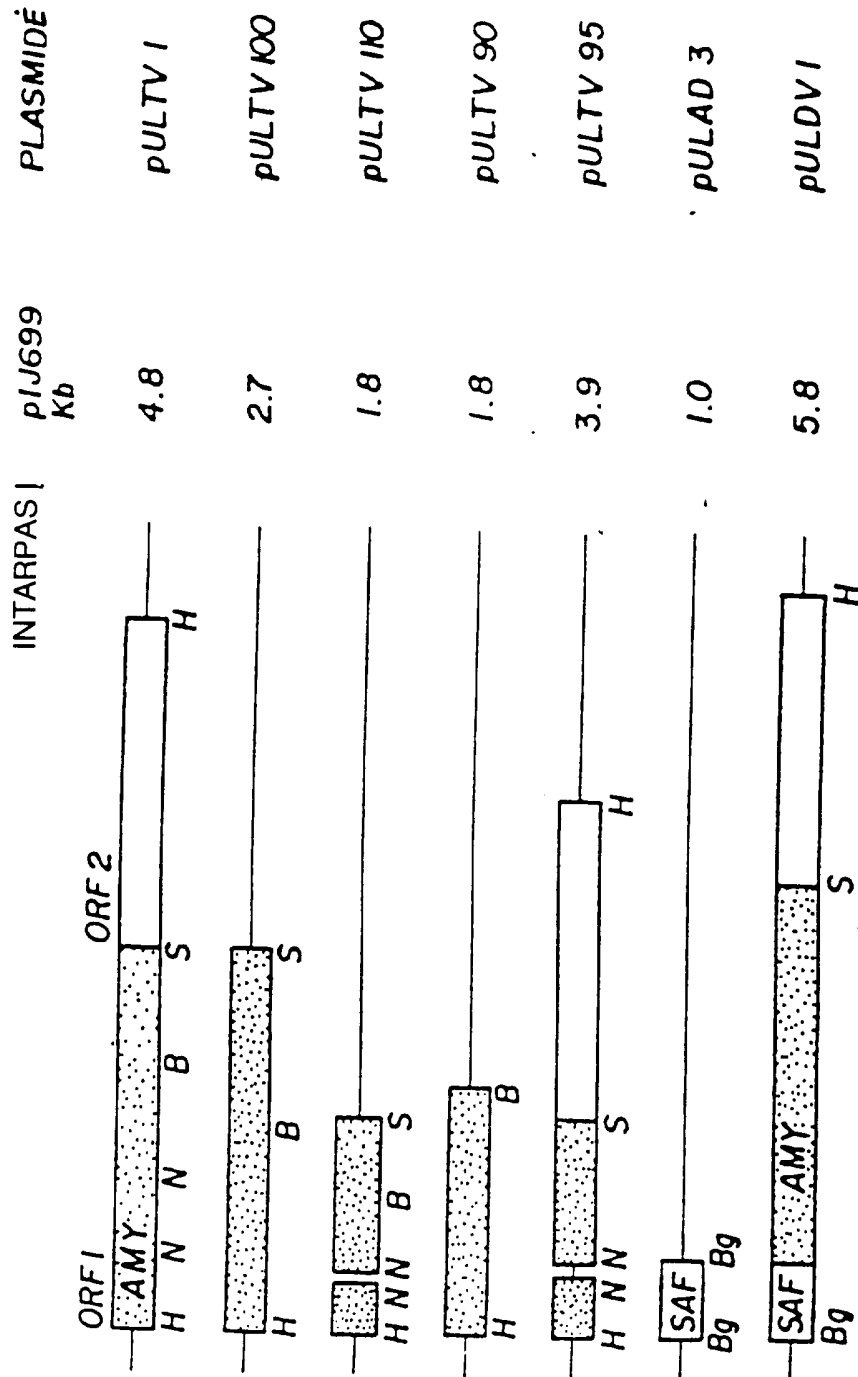
CGACGCTGCCGAAGATGGACGTCGCATTGATAACGGTGAGGCGTTGCCCGAAAGCGCT 996

BglII

TCGGTGAGATCT

1008

LT 3312 B



H = Hind III
 N = Nco I
 B = Bst EI
 S = Sal I
 Bg = Bgl II

FIG. 6 A

λCI	Gln	Glu	Ser	Val	Ala	Asp	Lys	Met	Gly	Met	Gly	Gln	Ser	Gly	Val	Gly	Ala	Leu
λCro	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala
LacI	Leu	Tyr	Asp	Val	Ala	Glu	Tyr	Ala	Gly	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Val	Ser	Arg	Val
Lex	Ala	Ala	Glu	Ile	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Pro	Asn	Ala	Ala	Glu	Glu
Lex R	Arg	Ala	Glu	Ile	Ala	Gln	Arg	Leu	Gly	Phe	Arg	Ser	Pro	Asn	Ala	Ala	Glu	Glu
P22Rep	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Met	Val	Gly	Val	Ser	Asn	Val	Ala	Ile	Ser	Gln	Trp
CAP	Arg	Gln	Glu	Ile	Gly	Asn	Ile	Val	Gly	Cys	Ser	Arg	Glu	Thr	Val	Gly	Arg	Ile
Fnr	Arg	Gly	Asp	Ile	Gly	Asn	Tyr	Leu	Gly	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu
Saf	Arg	Ala	Ala	Val	Gly	Ser	Phe	Asp	Gly	Ala	Lys	Asn	Arg	Pro	Ala	Ser	Ser	Arg
AfsB _a	Gln	Arg	Arg	Tyr	Ala	Glu	Gly	Lys	Gly	Leu	Phe	His	Gln	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe
AfsB _b	Glu	Gln	His	Asp	Ala	Gln	Glu	Val	Gly	Glu	Val	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser

FIG. 7

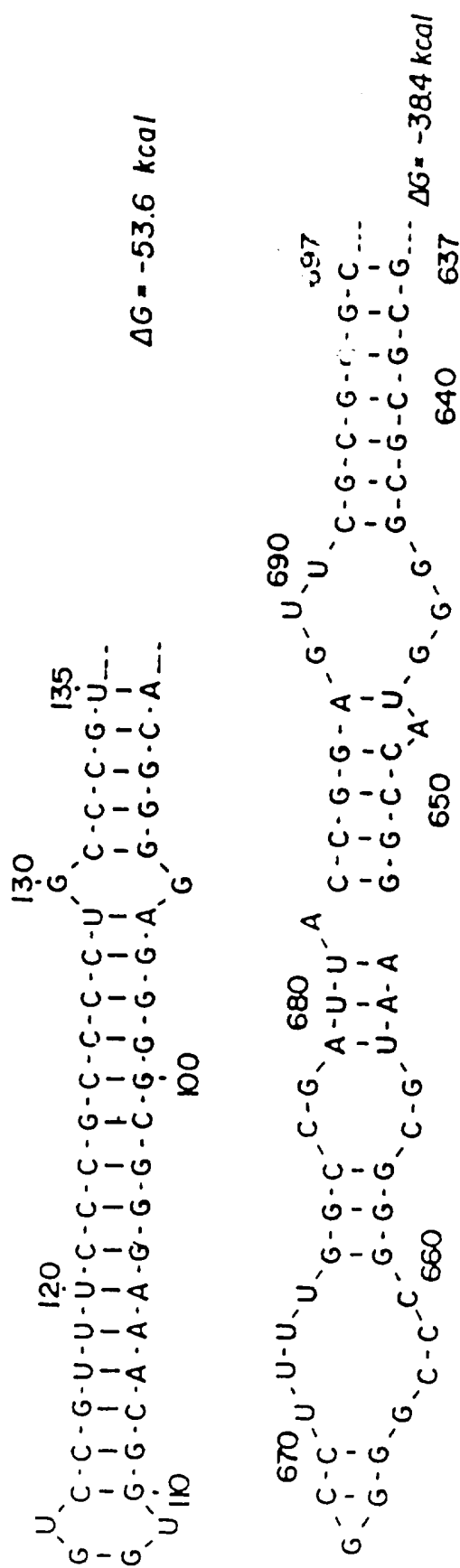


FIG.8

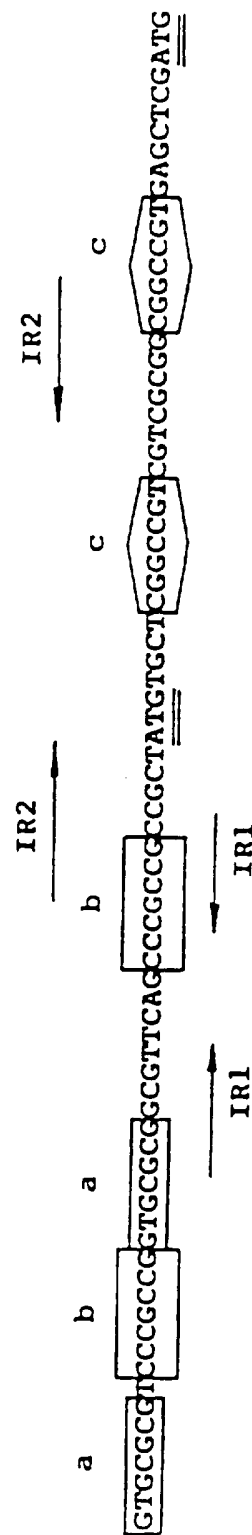


FIG. 11

MboI
 GATCGCCACGACCGTGCAGCGCACCGAGTTCTCCAGCCGGAGCTGGTGGTGGC 60
 i a h q t v q r t e f v f q p e l v v r
 CGGCTCCACCGCCAGTGGGTGCCCGGGCTGAGGGGACGTACGGGGCGCTTCGTCCGG 120
 g s t a q w v p g
Apal
 AGCCGCCGCAATCTCTTGAGAGGCTTGCGGGCCCTGCTGCCCGGGCCCAACCCCTT 180

SacII-KpnI
 GATGTCGGTGTTCGGGTTTCGTGTCCAAGGGTTGACCGGGGTACCGCTCGCTCTA 240

EcoRI
 CGGTCTGCTTCGGGACGCTCCTTGCAGTTTTCGTGCAAGAGAAATTCAGCCCTCCGCCCC 300

BglI
 CGATCAGGAGGCACACATGGCCCGCAGACTCGCCACCGGTCCCTAGCCGTGCTGGCGG 360

 m a r r l a t a s l a v l a a

FIG.11 (tęsinys)

CGGCCGCCACCGCCCTACCGCGCCACACCGCGCTGCCGCCCGCCCGGGGGAAGG 420
 SmaI
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 a a t a l t a p t p a a a p p g a k d
 ACGTCACCGCGTCCTCTTCGAGTGGAAGTTCGCCTCCGTAGCCCGCGCCTGCACCGACA 480
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 v t a v l f e w k f a s v a r a c t d s
 BglI
 GCCTCGGCCCGCGCTACGGATACGTCCAGGTCTCGCCGCCCGAGGAGCACATCCAGG 540
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 l g p a g y g y v q v s p p q e h i q g
 GCAGCCAGTGGTGGACCTCCTACCAGCCCGTCAGCTACAAGATCGCCGGACGGCTCGGCG 600
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 s q w w t s y q p v s y k i a g r l g d
 NcoI-SalI
 ACCGCGCGCCTTCAAGTCCATGGTCGACACCTGCCACGCGCGCGGTCAAGGTCGTCG 660
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 r a a f k s m v d t c h a a g v k v v a

LT 3312 B

FIG. 11 (tęsinys)

SacII

CCGACTCGGTCATCAACCACATGGCCGCGGTTCCGGCACCGGCACCGGGCAGCGCGT 720
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 d s v i n h m a a g s g t g t g s a y

SmaI

ACCAGAAGTACGACTACCCGGGCATCTGGTCCGGCGCGACATGGACGACTGCCGCGAGCG 780
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 q k y d y p g i w s g a d m d d c r s e

AGATCAACGACTACGGCAACCGGCCAACGTCCAGAACTGCGAACTGGTGGCCCTCGCCG 840
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 i n d y g n r a n v q n c e l v g l a d

ACCTCGACACCGGTGAGCCGTACGTCCGGGACCGCATCGCCGCTACCTCAACGACCTGC 900
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 l d t g e p y v r d r i a a y l n d l l

TCTTGCTCGGCGTGACGGCTTCCGCATCGACGCGGCCAAGCACATGCCCGCCGCGGACC 960
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 l l g v d g f r i d a a k h m p a a d l

FIG. II (tęsinys)

BglI
 TCACCGCCATCAAGGCCAAGGTCGGCAACGGGAGCAGTACTGGAAGCAGGAGGCCATCC 1020
 .-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+
 t a i k a k v g n g s t y w k q e a i h
 ACGGCGGGGCGAGGCCGTCCAGCCAGCGAGTACCTCGGCACCGGCGACGTCCAGGAGT 1080
 .-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+
 g a g e a v q p s e y l g t g d v q e f
 TCCGCTACGCCCGGACCTCAAGCGGGTCTTCCAGAACGAGAACCTGGCCCCACCTGAAGA 1140
 .-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+
 r y a r d l k r v f q n e n l a h l k n
SalI
 ACTTCGGCGAGGACTGGGGCTACATGGCGAGCGGCAAGTCCGCCGTCTTCGTCGACAACC 1200
 .-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+
 f g e d w g y m a s g k s a v f v d n h
 ACGACACGAGGGGCGGACACCCCTCAACTACAAGACGGCTCCGCCCTACACCCTCG 1260
 .-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+.-.-.-.-.-+
 d t e r g g d t l n y k n g s a y t l a

FIG.11 (təşinys)

CCGGGCTCTTCATGCTGGCCCTACGGCTCCCGGACGTCCACTCCGGCTACGAGT 1320
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 g v f m l a w p y g s p d v h s g y e f

 TCACCGACCACGACGGCCCGCCCAACGGGGAACCGTCAACGCCCTGTACAGCGACG 1380
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 t d h d a g p p n g g t v n a c y s d g

 GCTGGAAGTGCCAGCACGCCCTGGCCCGAGCTCTCCTCCATGGTCGGCCTGGCGAACACCG 1440
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 w k c q h a w p e l s s m v g l r n t a

 CCTCCGGGAGCCCGTCACCAACTGGTGGGACAACGGCGGACAGATCGCCTTCGGCC 1500
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 s g q p v t n w w d n g g d q i a f g r

SacII
 GCGGCGACAAGGCGTACGTGCGCCATCAACCACGAGGGCTCCGGGCTGAACCGCACCTTCC 1560
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 g d k a y v a i n h e g s a l n r t f q

FIG.11 (tęsinys)

BglI
 AGAGCGGCTGCCCGGGCGCCTACTGCGACGTCCAGAGCGGCAGGTCCGTCACGGTCG 1620
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 s g l p g a y c d v q s g r s v t v g

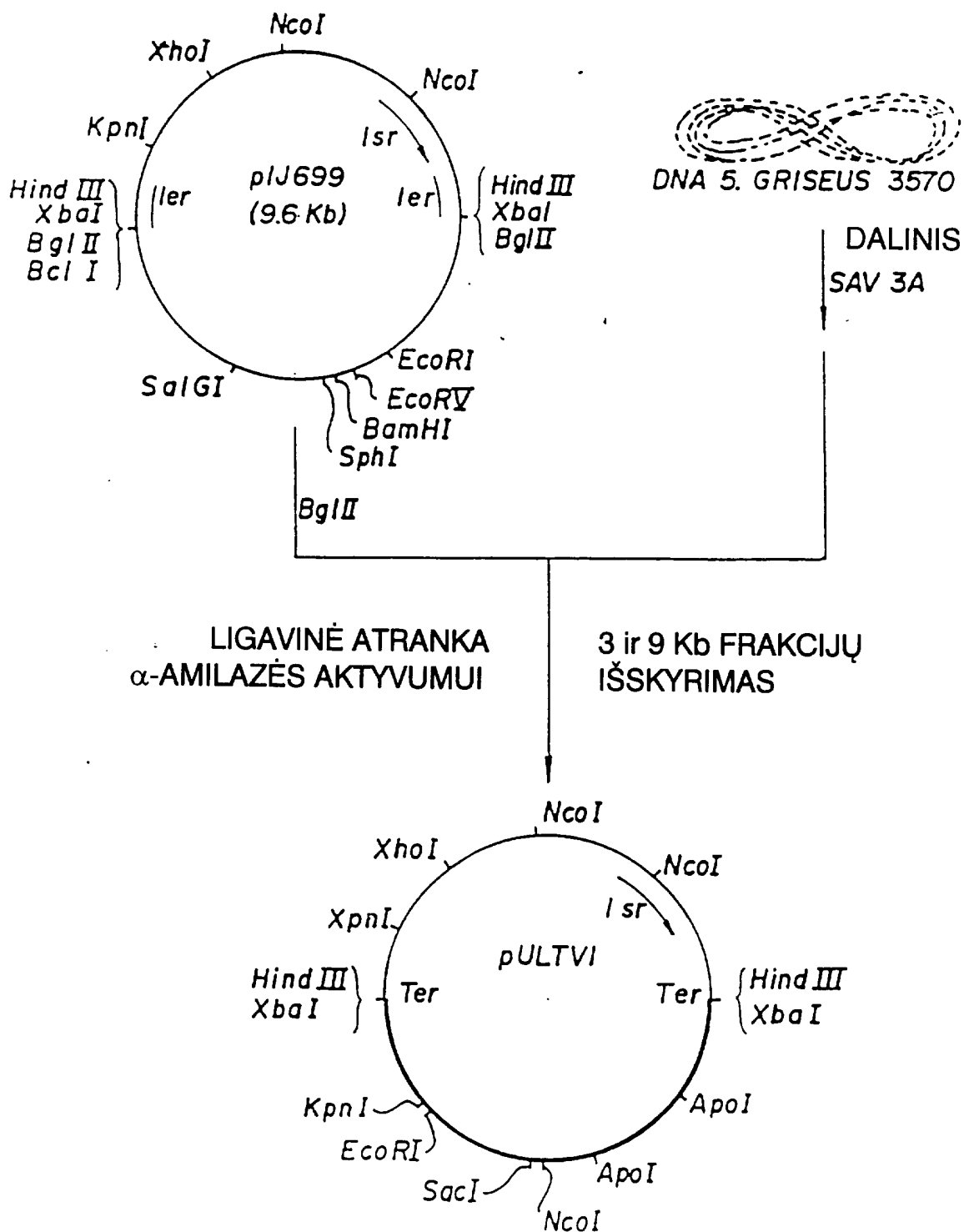
 GCTCCGACGGCACCTTCACCGCCACCGTCGCCGCGGCACCGCCCTGGCCCTGCACACCG 1680
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 s d g t f t a t v a a g t a l a l h t g
Apal
 GGGCCCGTACCTGCTCCGGCGGGAACCGGCCCGGCACCGGCAGACCTCCGCCCTCCT 1740
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 a r t c s g g g t g p g t g q t s a s f
BstEII
 TCCACGTCAACGCCACCGCCTGGGGCGGAGAACATCTACGTACCGGTGACCAGGCCG 1800
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 h v n a t t a w g e n i y v t g d q a a

 CCCTCGGCAACTGGGACCGCGCCCTCAAGCTCGACCGCGCCCTACCCGGTGT 1860
 ---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+---+
 l g n w d p a r a l k l d p a a y p v w

FIG.II (tesinys)

GGAAGCTCGACGTGCCGCTGGCCGCGGAACCCCTTCCAGTACAAGTACCTGCGCAAGG 1920
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 k l d v p l a a g t p f q y k y l r k d
SacII
 ACGCCGCGGGAAGCCGTCTGGGAGTCCGGGCCCAACCGCACGGGACCGTCGGCACCA 1980
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 a a g k a v w e s g a n r t a t v g t t
 CCGGCGCCCTCACCTCAACGACACCTGGCGGGCTGACCCCGCCCCCATCGGCCCGGCG 2040
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 g a l t l n d t w r g
SacII
 CCGCCTCCCCGCGGACGCCGGCGCTGCCGCACCCCGCCCGGAACCCCGCCGCGGG 2100
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCCCGCCCCGAAGGAGACCCGTCCCCGTGCGACGGACCACTCCTCGCGGTGAGTCT 2160
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 m r r t t i l a v s l

FIG.12



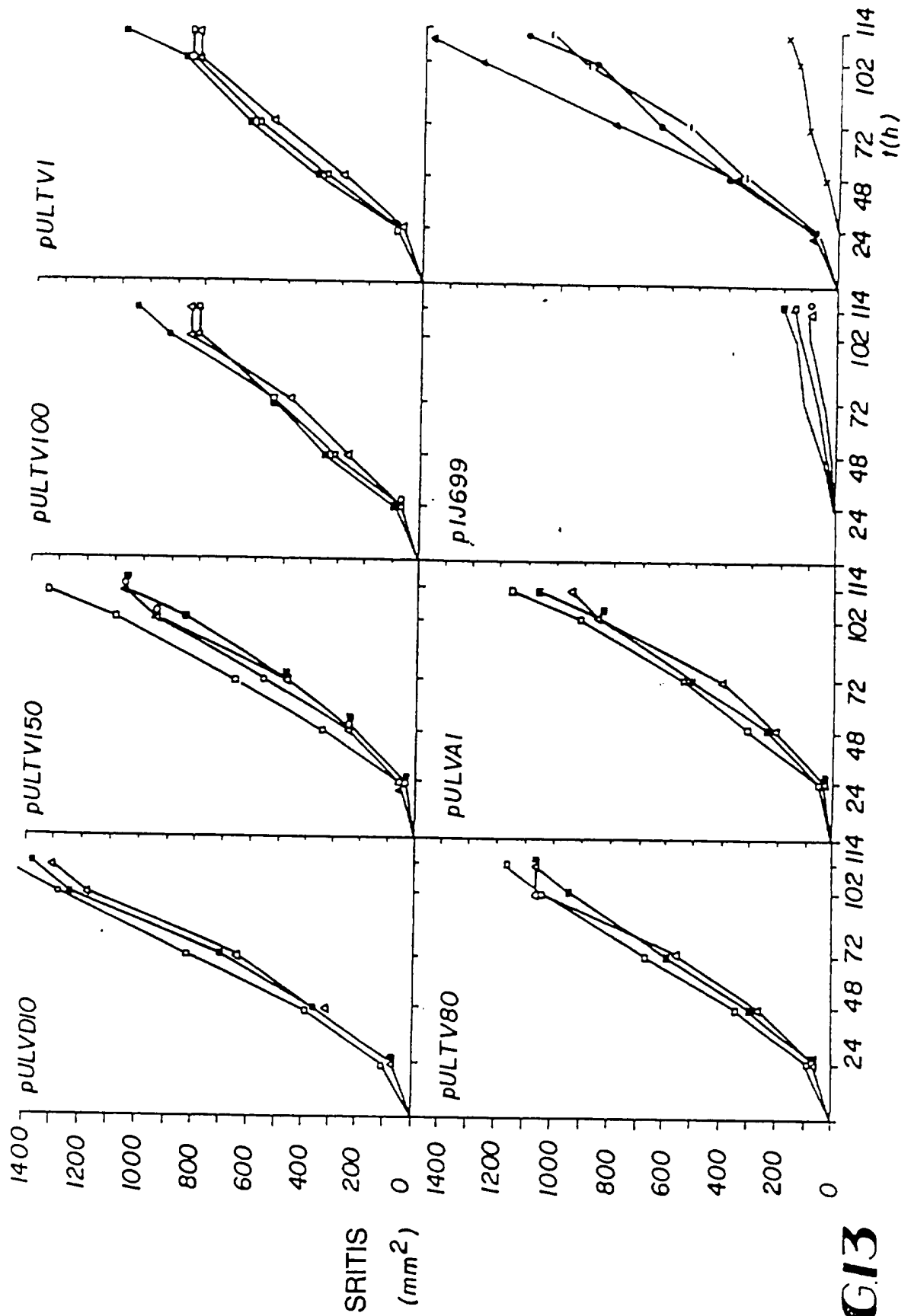


FIG13

FIG. 14

