

(11) Patent numeris: **3611**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 1/36,**
C12P 19/34,
C12P 21/00

(21) Paraiškos numeris: **IP776**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 07 12**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 01 31**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 12 27**

(60) SU duomenys: **SU 4831114, 1990 07 18**

(31,32,33) Prioritetas: **39 23 866.0, 1989 07 19, DE**

(72) Išradėjas:

Regina Elfriede Brigelius-Flohe, DE
Leopold Flohe, DE
Wolfgang Hillen, DE
Gerd Josef Steffens, DE
Wolfgang Strassburger, DE
Martin R. F. Wilhelm, DE

(73) Patent savininkas:

Gruenenthal GmbH, Zieglerstrasse 6, D-52078 Aachen, DE

(74) Patentinis patikėtinis:

Nijolė Viktorija Mickevičienė, 11, Panerių g. 79a, 3026 Kaunas, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

DSM 5018, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DE

(54) Pavadinimas:

Naujų plazmidžių gavimo būdas ir jų panaudojimas gaunant plazminogeno aktyvatorių

(57) Referatas:

Išradimas priklauso biotechnologijos sričiai ir nagrinėja naujų plazmidžių su sintetine DNR seka gavimą, kurios tinka ekspresuoti išankstinės stadijos rscu-PA baltymą (t.y. viengrandinės prourokinazės baltymo neglikozilintą

dalį) enterobakterijose, dalinai E.coli, tokiais kiekiais, kurių išeiga žymiai viršija išeigą, pasiekiamą naudojant žinomas plazmides.

Patentuojamu būdu gautų plazmidžių operonas pasižymi reguliuojamu sintetiniu promotoriumi, Šain-Dalgarno seka, startiniu kodonu, sintetiniu struktūriniu genu ir esančiu žemiau struktūrinio geno bent vienu terminatoriumi. Naujos plazmidės ir sintetinės DNR sekos gaunamos iš komercinių plazmidžių. Jas naudojant iš dideliu laipsniu ekspresuoto išankstinės stadijos baltymo žinomu būdu grįžtamąją reakciją gaunamas gydymui naudojamas kaip plazminogeno aktyvatorius rscu-PA, kuris po to taip pat žinomu kirpimo būdu gali būti panaudotas gaminant dideliais kiekiais dvigrandį neglikozilintą urokinazbaltymą (rtcu-PA).

Išradimas priklauso biotechnologijos sričiai ir gali būti naudojamas naujų plazmidžių su sintetine DNR seka gavimui.

- 5 Gydot užsikimšusias fibrinu kraujagysles, pvz. širdies infarktą, plaučių emboliją, galūnių arterinių kraujagyslių susirgimus ir kt., plazminogeno aktyvatoriai vaidina svarbų vaidmenį. Jau penktojo dešimtmečio pradžioje buvo žinoma, kad plazminogenas virsta
- 10 plazminu, t.y. fermentu, kuris sąlygoja fibrino skaidymą į tirpius polipeptidus ir, tokiu būdu, fibrino sąlygojamų trombų ištirpinimą. Šis plazminogeno aktyvatorius buvo pavadintas urokinaze ir pasirodė, kad iš tikrųjų egzistuoja skirtingos urokinazės formos. Tačiau
- 15 visos šios formos gaunamos tiesiogiai (betarpiškai) iš vienos molekulės - pirmtako, žinomos maždaug nuo 70-ųjų metų vidurio kaip prourokinazės cimogenas. Tada buvo nustatyta, kad ši prourokinazė pasižymi viengrande struktūra ir ji buvo pavadinta "scu-PA" (viengrandis
- 20 šlapimo plazminogeno aktyvatorius). Ši scu-PA sudaryta iš 411 aminorūgščių ir glikozilinta gamtinėje pirminėje formoje iki 302 aminorūgščių.

- Iš įvairių darbų žinomas genotechnologinis baltymo scu-PA,
- 25 kuris pavadintas kaip "rscu-PA" (rekombinantinis scu-PA) arba turi trivialinį saruplazės pavadinimą, neglikozilintos dalies gavimas. Naudojant rscu-PA gydymui pasirodė, kad stebimas jo veikimas ir suderinamumas viršija naudojamus fibrinolitikus (žr. "Lancet", 1989 m., 863-
- 30 868 psl.).

- Neglikozilinto plazminogeno aktyvatoriaus rscu-PA gavimui naudoja prokariotus, apie ką liudija kai kurie duomenys literatūroje. Žinomi scu-PA gavimo būdai pagrįsti
- 35 struktūrinio geno scu-PA, išskirto iš žmogaus audinių, pasireiškimu. Gaila, tačiau taip pasiekiamas tik nežymus ekspresijos laipsnis, kuris neužtikrina šio pro-

dukto gavimo dideliais kiekiais. Taip, pavyzdžiui, aprašytas Nibino ir kt., rscu-PA gavimas iš E. coli duoda ekspresijos laipsnį tik 2 %, kuris išmatuotas nuo bendro bakterijos baltymo kiekio (Agric. Biol. Chem. 52, 1988 m. psl. 329-336). Iš kitos pusės, paraiškoje Europos patentui Nr. 92 182 A2, o taip pat (Holmes, W.E., Pennica, D., Blaber, M., Rey M.W., Günzler, W.A., Steffens, G.J., Heynecker, H.L.: Biotechnol. 3, 923-929 1985) pasiekiamas ekspresijos laipsnis tiksliai nenurodomas. Tačiau tikrinant šiuos duomenis įvairiuose kamienuose buvo gauta mažiaus nei 2 % bakterijos baltymo rscu-PA.

Daugeliu atveju eukariotinio baltymo ekspresija bakterijose gaunama taip pat ir rscu-PA ląstelėje, kaip denatūruotas įjungtas kūnas, toliau vadinamas "išankstinės stadijos baltymus", kuris po tarpinio išskyrimo turi būti proteinochemiškai grąžintas į teisingą ketvirtinę rscu-PA struktūrą. Tokiu būdu gautą produktą po to galima pervesti susidariusio rscu-PA kiekio nustatymui, pavyzdžiui, pridėdant plazminą, į dvigrandinę neglikozilintą urokinazę ("rtcu-PA), kurios aktyvumas nustatytas ir kuri gali būti susidariusio rscu-PA kiekio matu. Galima nustatyti išankstinės baltymo arba rscu-PA išėigą ir, tokiu būdu, ekspresijos laipsnį, pavyzdžiui, viso baltymo galinės elektroforezės densitometrinio įvertinimo pagalba.

Netikėtai buvo pastebėta, kad bakterijos, transformuotos pagal išradimą gautomis plazmidėmis, duoda daug kartų didesnę ekspresiją, nei kamienas šeimininkas, žinomais būdais identišškai transformuotas plazmidėmis. Todėl atitinkamai pagal išradimą gautos plazmidės tinkamesnės baltymo gavimui negu visos iki šiol žinomos rscu-PA plazmidės arba jų išankstinės stadijos. Žinomu būdu aukščiau minėto analitiniams tikslams rscu-PA skaidymo, pavyzdžiui, plazminu, pagalba gali būti gau-

tas taip pat ir rtcu-PA techniniais kiekiais. Dėka pasiūlyto išradimo rscu-PA tapo labai prieinamas.

5 Plazmidės, naudojamos gaunant plazminogeno aktyvatorių, gautos atitinkamai pagal išradimą, skiriasi tuo, kad jų operonai turi reguliuojamą sintetinį promotorių, aktyvia, kaip ribosomų surišimo vietą, Šain-Dalgarno seką, startinį kodoną, sintetinį struktūrinį geną scu-Pa-ei ir priešingai struktūrinio geno atžvilgiu išsidėsčiusį, 10 bent jau vieną terminatorių. Pirmenybė teikiama vienas paskui kitą einantiems terminatoriams, dalinai kalbant apie trp A terminatorių ir/arba tet A/orf L terminatorių iš Tn 10*.

15 * (Schollmeier, K., Gärtner, D., Hillen, W.: Nucl. Acids Res. 13, 4227 - 4237 1985).

Reguliuojamojo promotoriaus atveju kalba eina, dalinai, apie trp-promotorių arba tac-promotorių.

20 Kontrolinėje zonoje gautos atitinkamai pagal išradimą plazmidės turi atstumą tarp Šain-Dalgarno sekos ir startinio kodono 6-12, geriausiai 8-10, nukleotidų.

25 Konstruojant naudojamą naujose plazmidėse struktūrinį geną, įstatomos, geriausiai, užkoduotos atitinkamoms aminorūgštims bazinės sekos, pateiktos sekančioje lentelėje. Be to, struktūriniame gene visi šie skiriamieji požymiai neturi būti išpildyti vienu metu.

30

<u>Aminorūgštis</u>	<u>Tripletas</u>
Argininas	CGT
Leicinas	CTG
Valinas	GTT
Prolinas	CCG
Glicinas	GGT

Iš kitos pusės, konstruojant struktūrinį geną pagal galimybes tikslinga išvengti sekančio kodono atitinkamoms išvardintoms aminorūgštims naudojimo (tačiau vėl gi nereikia išpildyti vienu metu visų šių skiriamųjų požymių visoms aminorūgštims).

<u>Kodonas, kurio reikėtų vengti</u>	<u>Aminorūgštis</u>
ATA	Izoleicinas
GTC	Valinas
CCC	Prolinas
AAG	Lizinas
AGG, AGA, CGG, CGA	Argininas
GGA, GGG	Glicinas

Atitinkamai pagal išradimą atskiroms aminorūgštims struktūriniame gene pasirenkant kodoną, o taip pat aukščiau išvardintus kontrolinio geno skiriamuosius požymius, pilnai išvengiama stabilų antrinių struktūrų tarp struktūrinio geno ir kontrolinio regiono susidarymo.

Sintetinio struktūrinio geno gavimui iš pradžių sintetuojami turintys 40-80 bazių vienoje grandinėje oligonukleotidai. Juos tikslinga gauti 1 mm/mol masteliu kietų fazių metodu (Adams, S.P., Kavka, K.S., Wykes, E.I., Holder, S.B., Gallupi, G.R.: J. Am. Chem. Soc. 105, 661-663 1983). New Brunswick Scientific Co. firmos "Biosearch 8600" modelio DNR sintezatoriumi. Kaip monomerinis sintomas naudojami esantys pardavime β -ciano-etildiazopropilamino-fosfoamidai atitinkamiems būtiniams dezoksiribonukleozidams. Atskėlus nešikli esančios galuose tritil pakeistos grandinės gelfiltracijos būdu steriliose sąlygose nudruskinamos, o po to dviem stadijomis pirmą kartą atskiriamos atvirkščių fazių didelio efektyvumo skysčių chromatografija - (HPLC). Atitinkamas pagrindinis produktas detritilinamas ir po dviejų papildomų atvirkščių fazių HPLC

valymo stadijų gaunamas labai švarus norimas oligonukleotidas, ką parodo gelelektroforezės analizė (PAGE).

5 Iš 4-9 šių atskirų grandinių gauna apie 200 nukleotidu
ilgio dvigubų grandinių fragmentus, kad negalinius at-
skirus oligonukleotidus 5'-gale fosforilintų ir ati-
tinkamas komplementarias grandines kartu su galiniais
oligonukleotidais renatūruotų ir liguotų. Po ligavimo
10 susidarę tinkami klonavimui dvigubi fragmentai po to
panaudojami tinkamuose linearizuotuose vektoriuose. Pa-
pildomos priemonės išvardintos pateiktuose pavyz-
džiuose.

Paraiškoje naudojami šie sutrumpinimai:

- 15 b.p. - bazių poros
DE 52 - firmos Watman anioninių mainų kolonėlė
EDTA - etilendiamintetraacto rūgštis
IPTG - izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
20 PAGE - poliakrilamidgelektroforezė
PU - Ploug vienetai
SDS - natrio dodecilsulfatas
Š.D. seka - Šain-Dalgarno seka
Tris-HCl - trihidroksimetilaminometano hidrochloridas
25 Tween-80 - polietilenoksido (20) sorbitanmonooleatas

30 Konstruojant atitinkamai pagal išradimą naujas plaz-
mides, pirmenybė teikiama esamai pardavimo plazmidei
pBR 322 (4363 b.p.). Geriausiai iš pradžių eliminuoti
nic/bom sritį ir/arba tetraciklinui atsparų geną. Be
to, nebūtina pilnai pašalinti atsparų tetraciklinui
geną, o dažniausiai pakanka, kad plazmidė neperduotų
tokiu būdu transformuotam bakterijos kamienui atsparumo

tetraciklinui. Šių priemonių (nic/bom srities ir dalies atsparumo tetraciklinui geno pašalinimas) pagalba gaunama taip vadinama "aukšto patikimumo plazmidė".

- 5 Konstruojant naują plazmidę atitinkamai pagal išradimą, remiantis modifikuota kaip buvo minėta aukščiau, plazmide pBR 322 (arba kita žinoma anksčiau plazmide), pirmenybė teikiama būdai, kuriame sekanti stadija yra sintetinės multiklonavimo vietos tarp Eco RI ir Hind
- 10 III kirpimo vietų įstatymas. Ši multiklonavimo vieta (fig. 2) turi nustatytą kirpimo vietų eilę (seką), esančios tarp šių kirpimo vietų bazės yra laisvai pasirinktos, išskyrus sekas tarp Xba I ir Nde I, kurios turi ribosomų surišimo vietas (Šain-Dalgarno seka) iš
- 15 Xyl-operono 5'-AAGGAG-3' B subtilis*, (Wilhelm, M., Hollenberg, C.P.: Nucl. Acids Res. 13. 5717 - 5722 (1985), o taip pat nustatytą atstumą tarp Š.D. sekos ir startinio kodono ATG. Einančios po Š.D. sekos bazės GAAAT perneštos iš minėto straipsnio ir surištos su
- 20 CATATG, Nde I kirpimo vietoje. Tokiu būdu, atstumas tarp Š.D. sekos ir ATG yra 8 bazių poros. Atstumas tarp multiklonavimo vietos atskirų kirpimo vietų pagal klonavimo technologiją turi būti mažiausiai apie 20 nukleotidų, todėl palengvinamas tarpinių fragmentų
- 25 pašalinimas.

- Šios multiklonavimo vietos pagalba į plazmidę įvedamos kirpimo vietos, kurios, tikslingai ištačius transkripcijos terminatorių, įgalina sėkmingai įstatyti sekančią
- 30 viena paskui kitą struktūrinio geno scu-PA dalinę seką, geriausiai, prasidedančią norimo baltymo C-galu, t.y. nuo 3'-DNR galo gaunamo struktūrinio geno, o taip pat įstatyti, pavyzdžiui, sintetinį arba taip pat išskirtą iš kitos plazmidės, arba esantį perdavime trp-promo-
- 35 torių. Fig. 15 pateikta šiuo būdu gauto scu-PA struktūrinio geno pilna nukleotidų seka su atskiram kodonui atitinkančiomis aminorūgštimis.

Iš sukonstruotos, kaip aprašyta išradime, plazmidės gali būti gautos kitos naujos plazmidės. Pavyzdžiui, kerpant Eco RI ir Hind III gaunamas sintetinis scu-PA struktūrinis genas su visais reguliavimo vienetais ir po to jis įstatomas į kitą, į enterobakterijos, dalinai, E.coli, automatiškai besidauginančią plazmidę, kurią po to linearizuoja arba sutrumpina kirpimo Eco RI ir Hind III pagalba. Tokiu būdu, tik naudojant Eco RI ir XBa I kirpimo vietas, gautoje atitinkamai pagal išradimą plazmidėje galima pakeisti taip pat, pavyzdžiui, trp-promotorių tac-promotoriumi (ir atvirkščiai).

Analogiškai galima naudoti ir kitas žinomas plazmidės, kurios pasižymi vienintele Eco RI ir Hind III kirpimo vieta, pavyzdžiui, pUC 9, pUC 12, pUC 13, pUC 18, pUC 19 ir kt.

Naujas plazmidės su padidintu atstumu tarp Šain-Dalgarno sekos ir startinio kodono ATG galima gauti atitinkamai pagal išradimą taip, kad sukonstruota, kaip aprašyta aukščiau, plazmidė, kurioje minėta atstuma, pavyzdžiui, 8 nukleotidų, kerpa Nde I, kuri užpildo gautą kirpimo vietą ir betarpiškai po to sujungia gautus galus, dėl ko susidaro pageidaujama nauja plazmidė, kurioje atstumas tarp Šain-Dalgarno sekos ir startinio kodono yra, pavyzdžiui, 10 nukleotidų.

Kaip jau buvo minėta, su bakterijomis, transformuotomis plazmidėmis, gautomis pagal išradimą, gali būti pasiektas daug kartų didesnis ekspresijos laipsnis, negu naudojant žinomas plazmidės. Tinkančių kompetentingų organizmų - šeimininkų transformacija vykdoma žinomu būdu. Gautų pagal išradimą plazmidžių pasireiškimui ypatingai tinkami organizmai - šeimininkai yra E. coli tipo kamienai ir giminingos enterobakterijos, pavyz-

džiui, kamienai Pseudomonas, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella arba Serratia.

5 Geriausi organizmai - šeimininkai yra E. coli tipo kamienai, pavyzdžiui, E. coli GRT-1 ir dalinai K 12 progrupio E. coli kamienai kaip, pavyzdžiui, E. coli K 12 JM 101 (ATCC 33876). E. coli K 12 JM 103 (ATCC 39403), E. coli K 12 JM 105 (DSM 4162). E. coli K 12 ATCC 31446 arba E. coli K 12 DH1 (ATCC 33849).

10 Ekspresijos įvedimą į E. coli ekspresinę sistemą, kuri turi tac-promotorių, galima įvykdyti, pavyzdžiui, pridedant laktozės arba atimant gliukozę, bet geriausiai pridedant izopropil- β -D-tiogalaktopiranozido. Tačiau, 15 jei plazmidėje yra trp-promotorius, tai indukciją vykdo geriausiai indolakrilacto arba indolakrilpropiono rūgštimis. Savaime aišku, kad gali būti taip pat panaudoti kiti žinomi induktoriai.

20 Po indukcijos pasiekus tam tikrą aukščiau minėtą ląstelės tankį, ląstelės atskiriamos centrifūguojant, o nuosėdos po centrifūgavimo ir suspendavimo vandeniniame druskų tirpale, sudedamos, pavyzdžiui, į homogenizatorių, kuriame ląstelės dėl slėgio skirtumo atsiduria 25 tam tikroje vietoje. Po naujo centrifūgavimo nuosėdose gaunamas išankstinės stadijos rscu-PA baltymas kartu su vandenyje netirpstančiomis ląstelių nuolaužomis ir kt. Paveikus guanidino hidrochlorido tirpalu, išankstinės stadijos baltymas pereina į tirpalą, po naujo centri- 30 fūgavimo nusistovėjęs tirpalas paveikiamas red-oks sistema (pavyzdžiui, turinčia redukuotą ir oksiduotą glutationą), todėl susidaro natūrali konformacija, t.y. susidaro norimas rscu-PA. Tirpioje formoje jis yra reakcijos mišinyje ir paprastomis valymo stadijomis 35 (pavyzdžiui, chromatografija ir tolesniu džiovinimu užšaldant) gali būti išskirtas grynas.

Analitiniams tikslams tikslinga fermentuoti transformuotą reikalingą ištyrimui plazmide E. coli kamieną ir, pasiekus aukščiau minėtą ląstelių suspensijos optimalų tankį, tinkamu induktoriumi indukuoti išankstinės stadijos rscu-PA-baltymo ekspresiją. Pasibaigus atitinkamam fermentacijos laikui atrenkamos lygios dalys ir išcentrifuguotos iš jų ląstelės ištirpinamos lizocime (1 mg lizocimo 50 mmol trihidrochlorido buferio su pH 8,0, 50 mmol etilendiaminotetraacto rūgšties ir 15 % sacharozės). Lizuotų ląstelių homogenatas soliubilizuojamas 4-5 mol guanidinhidrochlorido tirpale ir praskiedus 1,2 mol guanidinhidrochlorido, pridėjus redukuojančios medžiagos (glutathiono, merkaptoetanolio arba cisteino) po 2-5 valandų veikiamas atvirkštine reakcija (žr. taip pat Winkler, M.E., Blaber, M.: Biochem. 25, 4041-4045, 1986). Tokiu būdu gautas viengrandis rscu-PA, pridėjus plazmidę, paverčiamas į dvigrandinį rscu-PA, kurio aktyvumas nustatomas substrato S 2444 (piro Glu-Glu-Arg-p-nitroanilidas; Kabi diagnostika, Švedija) pagalba, kuris (substratas) skaidomas tik nuo dvigrandinės aktyvios urokinazės. Šis rscu-PA aktyvuojamas plazminu 50 mmol tris-buferyje, 12 mmol natrio chlorido, 0,02 % tvino-80; prie pH - 7,4 ir 37°C. Rscu-PA ir plazmino santykis turi būti apytikriai 100-1500:1, skaičiuojant moliaringumui, arba 8000-36000:1, skaičiuojant fermentiniam vienetui. Testuojamą inkubaciją atlieka 50 mmol tris-buferyje, 38 mmol natrio chlorido prie pH 8,8, esant 0,36 mmol aprotinimo (plazmino stabdymui) ir 0,27 mmol S 2444 prie 37°C. Priklausomai nuo mėginio rscu-PA turinio po 5-60 minučių inkubacijos pridedant 90 % acto rūgšties reakciją sustabdo ir matuoja absorbciją 405 nm ilgio bangoje. Pagal substrato S 2444 gamintojo nurodymus, kai šios išankstinės stadijos atveju ekstinkcijos pokytis yra 0,05 per minutę ties 405 nm, tai testuojamo tirpalo aktyvumas yra 25 PU/ml.

Rscu-PA, gautų iš išankstinės stadijos baltymo išėigos įvairiose bakterijose, naudojant pagal išradimą pagamintas plazmidės, pateiktos fig. 10, 12 ir 14.

5 Išradimą iliustruoja brėžiniai:

Fig. 1a ir 1b. Plazmidės BF 158 konstrukcija iš pavidime esančios pBR 322 plazmidės. Šiuo atveju nuosekliai pašalintos nic/bom sritis ir didelė atsparumo tetraciklinui geno dalis.

Fig. 2. Sintetinės "multiklonavimo vietos" nukleotidų seka.

15 Fig. 3. Plazmidės pBF 158-01 konstrukcija. Parodytas sintetinės multiklonavimo vietos įvedimas į pBF 158 plazmidę tarp EcoR I ir Hind III kirpimo vietų.

20 Fig. 4. Plazmidės pBF 158-01T konstrukcija. Cla I x Hind III fragmentą pakeičia atitinkamu fragmentu "T" iš plazmidės pRT 61 (Jorgensen, R.A., Reznikoff, W.S.: J. Bacteriol. 138, 705 - 714, 1979), kurioje yra tetA/orf L terminatorius iš Tn 10 (Schollmeier, K., Gärtner, D., Hillen, W.: Nucl. Acids Res. 13, 4227 - 4237 1985).

30 Fig. 5a-5g. Sintetinių geno, koduojančio žmogaus scu-PA, fragmentų nukleotidų sekos, jų įvedimas į plazmidę susidarant struktūriniam genui scu-Pa-ei, pagal išradimą, aprašytą 1d-1f pavyzdžiuose ir pavaizduotą fig. 6, 7, 9, plazmidėje pBF 158-01T.

35 Fig. 6a-6c. Plazmidės pBF 158-02T - pBF 158-06T konstrukcija, įvedant oligonukleotidinį fragmentą M4-M8 pradedant plazmidę pBF 158-01T, remiantis norimo baltymo C galu (atitinkamai DNR grandinės 3' galo).

Fig. 7a-7c. Plazmidės pBF 158-08T konstrukcija per pagalbinę konstrukciją plazmidėje pUC 19 (žiūr. fig. 1c).

Fig. 8. Sintetinio trp-promotoriaus nukleotidinė seka.

5

Fig. 9. Ekspresinės plazmidės pBF 160, skirtos išankstinės stadijos žmogaus baltymui rscu-PA, konstrukcija. Scu-PA struktūrinis genas pavaizduotas stora juoda linija tarp Nde I ir Cla I kirpimo vietų.

10

Fig. 10. Išankstinės stadijos žmogaus baltymo rscu-PA ekspresijos laipsnis (nustatytas kaip rscu-PA aktyvumas pagal grįžtamą reakciją ir aktyvavimą) įvairiuose transformuotuose plazmide pBF 160 (o——o) arba plazmide pUK 54 trp 207-1 (Holmes, W.E., Pennica, D., Blaber, M., Rey M.W., Günzler, W.A., Steffens, G.J., Heynecker, H.L.: biotechnol. 3, 923 - 929, 1985) (Δ - - Δ) E. coli kamienuose, kontroliuojant trp-promotoriui, priklausomai nuo laiko po indukcijos su indolakriline rūgštimi iki nulinio (0) laiko momento. Nurodytas substrato S 2444 pagalba nustatytas tcu-PA aktyvumas PU/fermentinės terpės mililitrui, kai optinis tankis esant 578 mm ilgio bangai lygus 1.

25

Fig. 11. SDS-PAGE baltymų, gautų iš transformuotų pBF 161 pagalba E. coli K 12 JM 103 ląstelių, densitograma po jų fermentacijos prieš induktoriaus indolakrilinės rūgšties įvedimą (A) ir praėjus 6 valandoms (B).

30

Fig. 12. Išankstinės stadijos žmogaus rscu-PA baltymo ekspresijos laipsnis (nustatytas kaip rtcu-PA aktyvumas po grįžtamos reakcijos ir aktyvavimo), E. coli K 12 JM 103 ląstelėse, transformuotose pBF 171 pagalba, t.y. kontroliuojant tac-promotoriui. Indukcija buvo vykdoma 0 laiko momentu su izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidu. Nurodytas rtcu-PA - aktyvumas nustatytas pagal substra-

35

ta S 2444 PU fermentinės terpės mililitrui, kai optinis tankis esant 578 nm ilgio bangai lygus 1.

5 Fig. 13. Atstumo tarp Š.D. sekos ir startinio kodono ATG padidėjimas nuo 8 iki 10 bazių papildant Nde 1 kirpimo vieta ir toliau sujungiant atitinkamus bukus galus.

10 Fig. 14. Išankstinės stadijos žmogaus rscu-PA baltymo ekspresijos laipsnis (nustatytas kaip rscu-PA aktyvumas po grįžtamos reakcijos ir aktyvavimo), kontroliuojant trp-promotoriui E. coli GRT-I bakterijose, transformuotose plazmidžių pBF 161 (o—o) arba pBF 163 (Δ—Δ) pagalba. Indukcija vykdoma indolakriline rūgštimi betarpiškai po 0 laiko momento. Nurodyti nustatyti substratu S 2444 tcu-PA aktyvumai PU fermentinės terpės mililitrui, kai optinis tankis esant 578 nm bangos ilgiui lygus 1.

20 Fig. 15a ir 15b. Scu-PA-struktūrinio geno pilna nukleotidinė seka, nurodant aminorūgštis, atitinkančias atskirą kodoną.

25 Reakcijos sistemos, analizuojamos išradimą iliustruojančiuose pavyzdžiuose, yra žinomos (žr. pav. Nachr. Chem. Tech. Lb. 35, 939, 1987).

30 Kultūrinės terpės, naudojamos pavyzdžiuose klonų selekcijai, sudėtis (1 litrui): 7,8 g peptono iš žuvies, 7,8 g peptono iš kazeino, 10 g mielių ekstrakto, 5,6 g natrio chlorido, 10 g gliukozės. Ši terpė šilumoje sumaišoma su 10 g/l agaro ir išpilstoma į lėkšteles.

1 pavyzdys.

5 Ekspresinės plazmidės pBF 160 išankstinės stadijos rscu-PA baltymui su sintetiniu scu-PA-genu, kontroliuojant trp-promotoriui, konstravimas.

a) Plazmidės pBF 158 konstravimas

10 i) Iš plazmidės pBR 322 (Pharmacia, Nr. 27-4902, 4363 b.p.) iškerpama nic/bom sritis, kuri yra tarp 2207 ir 2263 bazių (Winnacker E.L.: "Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 298, 1985), pašalinama (žr. taip pat fig. 1) pBR 322 prie 2298 bazės su Nde I ir tokiu būdu linearizuojama. Išlindę galai užpildomi
15 "užpildymo reakcija" ir, tokiu būdu, gaunami buki galai (Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.: "Molecular Cloning", A A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Po to prie 2068 bazės kerpama Pvu II pagalba ir likusios pBR 322 dalies abu buki galai
20 įprastine technika T4-ligazės pagalba vėl liguojami. Betarpiškai po šio ligavimo intarpas atitinkamose E.coli K 12 JM 103 ląstelėse (ATCC 39403) transformuojasi (Hanahan I.: "DNA cloning", Vol. 1, ed. D.M. Glover, IRL Press, Oxford, S. 109-135, 1985). Trans-
25 formuotos ląstelės kultivuojamos terpėje, pridėjus 150 µg/ml ampicilino. Iš gautų klonų atrenkami tokie, kurie turi plazmidę pBF 157, kuri skiriasi nuo pradinės plazmidės pBF 322 228 nukleotidais a) Pst I x BspM II-, b) Pst I x Bal I-, C) Pst I x Ava I - fragmentais.
30 Abiejų vienintelių kirpimo vietų Pvu II ir Nde I pBR 322 nėra plazmidėje pBF 157.

35 ii) Iš pBF 157 pašalinama didžioji tetraciklino sekos dalis, kerpant EcoRV x Nru I pagalba ir atsiradusius bukus galus toliau liguojant. Po E.coli K 12 JM 103 transformavimo ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, gaunami klonai, iš kurių at-

renkami tie, kurie turi plazmidę pBF 158. Ji 787 nukleotidais trumpesnė nei pBF 157 ir skiriasi tuo, kad neturi Bam H I kirpimo vietos. Bakterijų kamienų transformacija pBF 158 pagalba nesuteikia joms rezistentiškumo tetraciklinui.

b) pBF 158-01 konstravimas, sintetinės multiklonavimo vietos įvedimas.

10 Kerpant Eco R I x Hind III pagalba, iš pBF 158 pašalinamas 31 nukleotido fragmentas ir liguojama sintetinė multiklonavimo vieta, kurios seka pateikta fig. 2. Po ligacijos intarpo transformacijos į E.coli K 12 JM 103 ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml
15 ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi plazmidę pBF 158-01. Jie skiriasi nuo pBF 158 papildomomis vietintelėmis Xba I, Nde I, Sac I, Eag I, Kpn I, Spe I kirpimo vietomis, o taip pat antra Pst I kirpimo vieta (fig. 3).

20

c) pBF 158-01 T konstravimas, transkripcijos terminatoriaus įvedimas.

Iš pBF 158-01 pašalinamas multiklonavimo vietos Cla I x
25 Hind III fragmentas ir pakeičiamas Cla I x Hind III fragmentu iš pRT 61 (Jorgensen, R.A., Reznikoff, W.S.: J. Bacteriol. 138, 705 - 714, 1979), kuriame yra tet A/orf L terminatorius iš Th 10 (Schollmeier, K., Gärtner, D., Hillen, W.: Nucl. Acids Res. 13, 4227 -
30 4237, 1985).

Po transformacijos E.coli K 12 Jm 103 kamienne ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, buvo atrinkti tie klonai, kurie turėjo plazmidę pBF 158-01 T.
35 Ji skiriasi nuo pBF 158-01 plazmidės Cla I x Hind III fragmentu, kuris 297 nukleotidais didesnis (fig. 4).

d) Sintetinio fragmento M4-M8 scu-PA-genui įvedimas, plazmidžių pBF 158-02 T - pBF 158-06 T konstrukcija.

Visi sintetiniai fragmentai pavaizduoti fig. 5a-5g. Jie
 5 įvedami į atitinkamus vektorius kaip maždaug dvigubos
 200 nukleotidų ilgio spiralinės fragmentai. Šiam tikslui
 vektoriai kerpami liekamaisiais fermentais, kurie at-
 tinka paminėtas kirpimo vietas, ir elektroforezės aga-
 roziniame gelyje, elektroliuavimo ir valymo pagalba
 10 atskiriami per DE 52 nuo skirtų pašalinimui fragmentų.
 Po to T4-ligazės pagalba liguojama priskirtu jam
 sintetiniu dvigubos grandinės fragmentu, vykdoma trans-
 formacija E.coli K 12 JM 103 (fig. 6a-6c) ir selekcija
 terpėje, turinčioje ampiciliną.

15

i) M 8 fragmento tarp Bam H I ir Cla I ligavimas plaz-
 midėje pBF 158-01 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-02 T.

20

019 oligonukleotidas koduojamas scu-PA C-terminalinei
 sekai. Už stop kodono TAA yra Nhe I kirpimo vieta, kuri
 tęsiasi nuo papildomos trpA-terminatoriaus transkrip-
 cijos sekos (Christie, G.E., Farnham, F.J., Platt, T.:
 25 Proc. Natl. Acad. Sci, USA 78, 4180-4184, 1981) iki Cla I.

ii) M 7 fragmento tarp Spe I ir Bam H1 ligavimas plaz-
 midėje pBF 158-02 T.

30 Gaunama plazmidė pBF 158-03 T.

iii) M 6 fragmento tarp Kpn I ir Spe I ligavimas plaz-
 midėje pBF 158-03 T.

35 Gaunama plazmidė pBF 158-04 T.

iv) M 5 fragmento tarp Eag I ir Kpn I ligavimas plazmidėje pBF 158-04 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-05 T.

5

v) M 4 fragmento tarp Sac I ir Eag I ligavimas plazmidėje pBF 158-05 T.

Gaunama plazmidė pBF 158-06 T.

10

Iš gautų i-v klonų atrenkami atitinkamai tie, kurie skiriasi nuo atitinkamo pirmtako papildomoje patikrintoje teisingoje sekoje įvestu nauju fragmentu.

15

e) Sintetinių M2 ir M 3 fragmentų scu-PA genui įvedimas, pBF 158-08 T konstravimas.

20

Kadangi M 2 ir M 3 fragmentų įvedimui būtinas Pst-I kirpimas ir šiam tikslui naudojamoje pBF 158 plazmidėje yra dar Pst-I kirpimo vieta (ampicilino sekoje), kuri trukdytų tolimesniam klonavimui, todėl elgiamasi fig. 7a-7c pavaizduotu būdu.

25

i) Iš esamos pardavime (pvz. "Pharmacia") pUC 19 plazmidės pašalinama multiklonavimo vieta ir papildomai 212 nukleotidų į viršų nuo Nde I x Hind III fragmento. Po to gautame tarpe liguoja sintetinę multiklonavimo vietą iš pBF 158-04-3 T kaip Nde I x Hind III fragmentą. Ši pBF 158-04-3 T plazmidė gaunama iš pBF 158-02 T (žr.

30

fig. I di), įvedant M 6 oligonukleotidinį fragmentą, ir atitinka plazmidę pBF 158-04 T be M 7 fragmento. Po transformacijos E.coli K 12 JM 103 ląstelėse ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi pUC 19-04-3 plazmidę. Ji

35

skiriasi nuo pUC 19 plazmidės tuo, kad turi Nde I x Hind III 712 nukleotidų ilgio fragmentą.

- ii) iš pUC 19-04-3 plazmidės pašalinamas Pst I x Sac I fragmentas, išskiriamas linearizuotas vektorius, ir liguojamas oligonukleotidinis M 3 fragmentas. Po transformacijos E.coli K 12 JM 103 ląstelėse ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi pUC 19-07 plazmidę. Ji skiriasi nuo pUC 19-04-3 plazmidės Pst I x Sac I 189 nukleotidų ilgio fragmentu, kuris turi M 3 fragmentą su teisinga seka.
- iii) Iš aukščiau aprašytos pUC 19-07 plazmidės pašalinamas Nde I x Pst I fragmentas ir tarpas liguojamas M 2 fragmentu. Po transformacijos E.coli K 12 JM 103 ląstelėse ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi pUC 19-08 plazmidę. Ji skiriasi nuo pUC 19-07 plazmidės Nde I x Pst I 246 b.p. fragmentu, kuris turi M 3 fragmentą su teisinga papildomai patikrinta seka.
- iv) Iš pUC 19-08 plazmidės pašalinami M 2 ir M 3 fragmentai kaip Nde I x Sac I fragmentas ir liguojama gauta po kirpimo Nde I x Sac I pagalba didelė pBF 158-06 T dalis. Po transformacijos E.coli K 12 JM 103 ląstelėse ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi plazmidę pBF 158-08 T. Ji skiriasi nuo pBF 158-06 T Nde I x Sac I 435 nukleotidų ilgio fragmentu.
- f) Plazmidės pBF 160 konstravimas, sintetinio trp-promotoriaus įvedimas.

Aprašyta (De Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21-25, 1983) trp-promotoriaus seka yra iki Xba I kirpimo vietos ir ilginama nuo 5' galo sekos 5'-AATTCTGAAAT-3' pagalba. Taip konstruojama Eco R I kirpimo vieta (fig., M 1 fragmentas). Atskiros grandinės 021 ir 021 A renatūruojamos ir li-

guojamos į pBF 158-08 T plazmidę, kuri kirpta Eco R I x
ba I (fig. 9). Po transformacijos E.coli K 12 JM 103
ląstelėse ir kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml
ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi pBF 160.
Plazmidė pBF 160 skiriasi nuo visų aukščiau aprašytų
pirmtakių tuo, kad, tokiu būdu transformuotų E.coli
bakterijų kamienai, pridėjus indolakrilinės rūgšties,
ekspresuoja išankstinės stadijos rscu-PA baltymą.

g) Ekspresinis testas:

i) Fermentacija

Transformuoti pBF 160 plazmide įvairūs E.coli kamienai,
pavyzdžiui, E.coli GRT-I, E.coli K 12 JM 103, o taip
pat E.coli K 12 ATCC 31446, atitinkamose vienodose
sąlygose fermentuojami terpėje, turinčioje 38 mmolio
amonio sulfato, 56 mmolio fosfatinio buferio su pH 7,0,
1 mmolio magnio sulfato, 1 % mielių ekstrakto, 1 %
gliukozės, 150 mg ampicilino litrui ir 62 mg/l indo-
lakrilinės rūgšties pagalba indukuojama išankstinės
stadijos rscu-PA baltymo ekspresija. Palyginimui išvar-
dinti kamienai transformuojami aukščiau aprašyta plaz-
mide, kuri turi žmogaus prourokinazės geną iš cDNR
banko, gautą iš Detroito 562 mRMR ląstelių (Holmes,
W.E., Pennica, D., Blaber, M., Rey M.W., Günzler, W.A.,
Steffens, G.J., Heynecker, H.L.: Biotechnol.3, 923-929,
1983), pažymėta pUK 54 trp 207-1, po to vienodose
sąlygose fermentuojami ir indukuojami.

Prieš indukciją ir 6 valandas po indukcijos kiekvieną
valandą atitinkamai centrifuguoja 1 ml ląstelių suspen-
sijos, kai optinis tankis lygus 1, 578 nm bangos ilgyje
ir naudoja ekspresijos laipsnio testavimui.

ii) Išankstinės stadijos rscu-PA baltymo grįžtamoji reakcija, jo suskaidymas iki rtcu-PA ir aktyvumo matavimas.

- 5 Ląstelės, atskirtos centrifuguojant aprašytu būdu, sujungiamos su lizocimu ir šis lizuotų ląstelių homogenatas naudojamas aktyvumo aprašytu būdu nustatymui.

Fig. 10 pateikti ekspresijos laipsniai, nustatyti išmatavus rtcu-PA, susidariusios iš rscu-PA, gautos iš išankstinės stadijos baltymo, aktyvumą. Iš čia matyti, kad E.coli kamienai, kurie buvo transformuoti plazmidės pBF 160 pagalba, duoda 10-15 kartų didesnę ekspresijos išėigą, nei pUK 54 trp 207-1 plazmide (Holmes ir kt.) transformuoti tokie pat E.coli kamienai. Pasirodė, kad visuose kamienuose priklausomai nuo transformacijai naudotos plazmidės ekspresijos išėiga yra apytiksliai vienoda, t.y. nepriklausomai nuo atskirų E.coli kamienų, transformuoti pBF plazmide kamienai visada duoda daug didesnę ekspresijos laipsnį nei identiškai kamienai, transformuoti žinoma plazmide pUK 54 trp 207-1.

2 pavyzdys

- 25 Ekspresinių plazmidžių išankstinės stadijos rscu-PA baltymui su sintetiniu scu-PA-genu, kontroliuojant trp-promotoriui, konstravimas.

a) pBF 161 plazmidės konstravimas.

30

Plazmidė pBR 322 kerpama Eco ir Hind III pagalba. Gautas 31 nukleotidų ilgio fragmentas atskiriamas paruošiamosios elektroforezės agaroziniame gelyje pagalba. Likusi pBR 322 dalis eliuojama elektroelijuavimo iš gelio būdu ir valoma DE 52 chromatografijos pagalba.

Plazmidė pBF 160 (fig. 1f) taip pat kerpama Eco R I ir Hind III pagalba, 1684 nukleotidų ilgio Eco RI x Hind III fragmentas, kuris turi sintetinį scv-PA-geną su visais reguliavimo vienetais (trp-promotorius), atskiriamas elektroforezės agaroziniame gelyje pagalba ir, kaip aprašyta aukščiau, eliuojamas bei valomas.

Tokiu būdu gauti fragmentai įprastu būdu T4-ligazės pagalba liguojami ir po to transformuojami į E.coli K 12 JM 103. Po kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi 1684 nukleotidų ilgio Eco R I x Hind III fragmentą ir pridėjus indolakrilinės rūgšties, atrenkamas išankstinės stadijos rscv-PA baltymas. Šie klonai turi plazmidę pBF 161.

15

b) Ekspresinis testas

E.coli GRT-I, E.coli K 12 JM 103 ir E.coli ATCC 31 466 transformuojamos pBF 161 pagalba, fermentuojamos (kaip fig. 1g) ir išmėginamas ekspresijos rezultatas. Išankstinės stadijos rscv-PA baltymo išėiga nustatoma kaip rtcv-PA aktyvumas per 1-6 valandas po indukcijos ir palyginama su pateiktomis fig. 10 išėigos reikšmėmis, naudojamomis plazmidės pBF 160 transformacijai.

25

Centrifiguojant gautos analogiškai fig I gi ląstelių nuosėdos gali būti ištirpintos virinant 0,25 mol tris HCl-buferyje, pH 8,0 su 4 % natriododecilsulfato, 1 % merkaptetanolio ir 20 % glicerino. Tokiu būdu ištirpinti baltymai atskiriami SDS-PAGE pagalba ir išryškinami Coomassie-Blue (Blakesley, R.W., Boezi, J.A.: Anal. Biochem. 82, 580 - 582, 1977). Nudažyti geliai įvertinami densimetriškai ir integruojamos dėmės tarp pikų. Po indolakrilinės rūgšties indukcijos susidaręs išankstinės stadijos rscv-PA baltymo kiekis nustatomas dėmių ekstrakcijos pagalba, identifikuotų kaip išankstinės stadijos baltymo juostų, gautų, prieš ir po

35

indukcijos. Fig. 11 pateikta iš E.coli K 12 JM 103 ląstelių gauto baltymo densitograma. Šiame pavyzdyje išankstinės stadijos rscu-PA baltymo kiekis po indukcijos sudaro 17,9 masės % nuo viso bakterinio baltymo.

5 Kiti pavyzdžiai nurodyti lentelėje.

Išankstinės stadijos baltymo rscu-PA kiekis nuo bendro baltymo kiekio (procentais)

<u>E. coli</u> kamienas	Transformuotas	
	pBF 161	pUK 54 trp 207-1* (žinomas)
K 12 ATCC 31446	14	1,5
K 12 JM 103	17,9	1,9
GRT-1	17,8	1,7

10

* Holmes, W.E., Pennica, D., Blaber, H., Rey M.W., Günzler, W.A. Steffens, G.J., Heynecker, H.L.: Biotechnol. 3, 923-929, 1985.

15

3 pavyzdys

20

Išankstinės stadijos rscu-PA baltymo su sintetiniu scu-A-genu, kontroliuojant trp-promotoriui, ekspresinės plazmidės konstravimas plazmidėje pBR 322 su geno-resistentiškume trūkumu tetraciklinui.

a) Plazmidės pBR 322 del konstravimas

25

Plazmidė pBR 322 kerpama Eco RV ir Nru I pagalba. Gautas 787 nukleotidų ilgio fragmentas pašalinamas agarozgelektroforezės pagalba, likęs pBR 322 kiekis elektroliuavimo pagalba iš gelio eliuojamas ir valomas per DE 52. Likusios pBR 322 Eco RV x Nru I dalies buki galai įprastu būdu liguojami T4-ligazės pagalba. Po transformacijos E.coli K 12 JM 103 ląstelėje ir kulti-

30

vavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, iš kurių lygi dalis po pernešimo į terpę, turinčią 25 µg/ml tetraciklino, neišauga, t.y., nepasižymi tetraciklinine rezistencija. Klonai turi plazmidę pBR 322 del, kuri skiriasi nuo pBR 322 tuo, kad yra 787 nukleotidais trumpesnė, todėl daugiau negali būti kerpama Eco RV ir Nru I pagalba.

b) Plazmidės pBF 162 konstravimas

10

Plazmidė pBR 322 del kerpama Eco RI ir Hind III pagalba. Tokiu būdu gautas 31 nukleotido ilgio fragmentas atskiriamas preparatyvinės agarozgelelektroforezės pagalba, o likusi pBR 322 del dalis eliuojama elektroeliuavimo iš gelio pagalba ir valoma DE 52.

Tokiu būdu iš pBF 160 gaunamas 1684 nukleotidų ilgio Eco R I x Hind III fragmentas, kuris turi sintetinį scv-PA-geną su visais reguliavimo vienetais (trp-promotorius).

20

Abu fragmentai įprastu būdu liguojami T4-ligaze ir po to transformuojami į E.coli K 12 JM 103 ląsteles. Po kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi 1684 nukleotidų ilgio Eco RI x Hind III fragmentą ir, pridėjus 62 µg/ml indolakrilinės rūgšties, gaunamas išankstinės stadijos rscv-PA baltymas. Šie klonai turi plazmidę pBF 162.

25

30 c) Ekspresinis testas

E.coli GRT-1 transformuojama pBF 162 pagalba, po to fermentuojama, kaip aprašyta lg pav., ir išmėginamas ekspresijos rezultatas. Išankstinės stadijos rscv-PA baltymo išėiga nustatoma kaip rtcv-PA aktyvumas per 6 valandas po indukcijos, kuri sudaro 1300 PU/ml ląstelių suspensijos, kai optinis tankis 1, ir palyginama su

35

fig. 10 pateiktomis ekspresijos išeigos reikšmėmis po E.coli GRT-1 transformacijos pBF 160 plazmide.

4 pavyzdys

5

Išankstinės stadijos rscu-PA baltymo su sintetiniu scu-PA-genu, kontroliuojant tac-promotoriui, ekspresinės plazmidės konstravimas

10 a) Plazmidės pBF 171 konstravimas

Plazmidė pBF 162 kerpama Eco RI ir Xba I pagalba. Gautas 74 nukleotidų ilgio fragmentas atskiriamas preparatyvinės agarozgelelektroforezės pagalba, likusi plazmidės dalis eliuojama elektroeliuavimo pagalba ir po to valoma DE 52.

Iš plazmidės p tac SDT (DSM 5018) išskiriamos Eco RI x Xba I fragmentas, kuris turi tac-promotorių. Šiam tikslui Eco RI x Xba I pagalba kerpama p tac SDT ir fragmentas atskiriamas preparatyvinės PAGE pagalba. Pašildžius iki 65°C amonio acetato/SDS buferyje prie pH 8,0 iš mechaniškai susmulkinto poliakrilamido fragmentas eliuojamas ir valomas daug kartų ekstraguojant fenolu, prisotintu 1 mol tris-buferiu, pH 8,0.

Tokiu būdu gauti abu fragmentai įprastu būdu liguojami T4-ligaze ir transformuojami į E.coli K 12 JM 103. Po kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkant tokie klonai, kurie pridėjus IPTG, produkcija išankstinės stadijos rscu-PA baltymą. Šie klonai turi plazmidę pBF 171.

b) Ekspresinis testas

35

E.coli K 12 JM 103 transformuojama pBF 171 pagalba, fermentuojama, kaip aprašyta I g pavyzdyje ir ištiriamas

ekspresijos rezultatas. Indukcija vykdoma su IPTG (galutinė koncentracija 0,5 mmol).

5 Išankstinės stadijos rscu-PA-baltymo išeiga nustatyta kaip rtcu-PA aktyvumas per 1-6 valandas po indukcijos ir pateikta fig. 12. Ją galima lyginti su fig. 10 pateiktomis išeišos reikšmėmis, gautomis vienoduose E.coli kamienuose panaudojus plazmidę pBF 160.

10 5 pavyzdys

Išankstinės stadijos rscu-PA baltymo su sintetiniu scu-PA-genu, kontroliuojant tac-promotoriui, ekspresinės plazmidės konstravimas plazmidėje pBR 322 su rezistentiškumo tatracklinui trūkumu gene.

a) Plazmidės pBF 172 konstravimas.

20 Plazmidė pBR 322 del (žr. fig. 3a) kerpama Eco RI x Hind III pagalba. Gautas 31 nukleotido ilgio fragmentas atskiriamas preparatyvinės agarozgelinės elektroforezės pagalba, likusi pBR 322 del dalis eliuojama elektroliuavimo iš gelio pagalba ir po to valoma DE 52.

25 Tokiu pat būdu iš pBF 171 (fig. 4a) gaunamas Eco RI x Hind III fragmentas, kuris turi sintetinį scu-PA geną su visais reguliavimo vienetais (tac-promotorius).

30 Abu fragmentai liguojami įprastu būdu T4-ligaze ir po to transformuojami į E.coli K 12 JM 103 ląsteles. Po kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie esant 0,5 mmol IPTG produkcija išankstinės stadijos rscu-PA baltymą. Šie klonai turi plazmidę pBF 172.

b) Eskpresinis testas

5 E.coli K 12 JM 103 transformuojama pBF 172 pagalba, fermentuojama, kaip aprašyta Ig pav. ir ištiriamas ekspresijos rezultatas. Indukcija, tačiau vykdoma su IPTG (galutinė koncentracija 0,5 mmol). Išankstinės stadijos rscu-PA-baltymo išėiga nustatoma kaip rtcu-PA aktyvumas per 1-6 val. po indukcijos ir tai sudaro apytiksliai 1100 PU/ml ląstelės suspensijos, kai optinis tankis 1. Šį rezultatą palygina su fig. 10 pateiktomis išėigos reikšmėmis, gautomis tame pačiame E.coli kamiene panaudojus plazmidę pBF 160.

6 pavyzdys

15 Atstumo tarp Š.D. sekos ir startinio kodono išankstinės stadijos rscu-PA baltymo ekspresinėje plazmidėje pakeitimas.

20 Visose 1-5 pavyzdžių konstrukcijose aprašytas startinis kodonas ATG yra Nde I kirpimo vietos - CATATG - sudėtinė dalis. Nde I kerpa už pirmojo A heksonukleotidinę seką ir duoda 5' galus, kurie perkloja 2 bases. Užpildomi 3' galai, t.y., konstruojami buki galai, ir po to vėl liguojama taip, kad atitinkama seka pailginama bazių poromis. Tuo pat metu pašalinama Nde I kirpimo vieta. Kaip matyti fig. 13 pateiktame pavyzdyje atstumas nuo Š.D. sekos iki startinio kodono pailgėja nuo 8 iki 10 bazių porų. Tolimesni eksperimentai aiškinami pavyzdyje.

a) Plazmidės pBF 163 konstrukcija

35 Plazmidė pBF 161 kerpama Nde I pagalba, po to išsikišę galai užpildomi I DNR polimerazės Klionovo fragmentu (Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: "Molecular Cloning", A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory, 1982). Po to DNR įprastu būdu liguojama T4-ligaze ir transformuojama į E.coli K 12 JM 103. Po kultivavimo terpėje, turinčioje 150 µg/ml ampicilino, atrenkami tie klonai, kurie turi plazmidę pBF 163. Ji skiriasi nuo pBF 161, nes neturi vienos Nde I kirpimo vietos ir ankstesnės Nde I (vietos srityje turi papildomas-TA-bazes (fig. 13).

b) Ekspresinis testas

10

E.coli GRT-I transformuojama plazmide pBF 163, fermentuojama, kaip aprašyta Ig pav. ir ištiriamas ekspresijos rezultatas. Išankstinės stadijos rscu-PA baltymo išeigos, nustatytos po grįžtamos reakcijos ir aktyvavimo, kaip rtcu-PA aktyvumas mililitrui ląstelės suspensijos, kai optinis tankis 1, per 1-6 valandas po indukcijos su 62 mg/l indolakrilinės rūgšties, pateiktos fig. 14. Rezultatus galima palyginti su fig. 10 pateiktomis išeigos reikšmėmis, gautomis tame pačiame

20

E.coli kamiene panaudojus plazmidę pBF 160.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Naujų plazmidžių, naudojamų gaunant plazminogeno
aktyvatorių, gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s
5 tuo, kad į plazmidę pBR 322, iš kurios pašalinta
nic/bom sritis ir/arba bent rezistentiškumo tet-
raciklinui dalis, tarp multiklonavimo vietos Xba I ir
Nde I kirpimo vietų įveda nurodytą fig. 2 nukleotidų
seka (fig. 2 yra šio apibrėžties punkto dalis), kuri
10 tarp Xba I ir Nde I kirpimo vietų turi Šain-Dalgarno
seka, ir 6-12, geriausiai 8-10, nukleotidų atstumu
startinį kodoną ATG ir jo pagalba žinomu būdu į vieną
arba du transkripcijos terminatorius įstato scu-PA
struktūrinio geno sintetinę dalinę seką, geriausiai
15 prasidedančią nuo struktūrinio geno 3' galo, o taip pat
reguliuojamą promotorių, ir tokiu būdu gauna plazmides,
kurios pasižymi šiais skiriamaisias požymias:

a) plazmidės operonas turi reguliuojamą promotorių, kaip
20 ribosomų surišimo vietą - Šain-Dalgarno seką, star-
tinį kodoną, viengrandžio uroplazminogeno "scu-PA"
sintetinį struktūrinį geną, turintį 411 aminorūgščių
liekanų ir žemiau nuo struktūrinio geno vieną-du
terminatorius;

25 b) plazmidės tinka išankstinės stadijos rscu-PA baltymo
ekspresijai su ekspresijos laipsniu, mažiausiai 10
nuo viso susidariusio enterobakterijos baltymo, ge-
riausiai Escherichia coli kamienuose.

30 2. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad reguliuojama
promotorių multiklonavimo vietos pagalba įstato trp
arba tac- promotorius.

35 3. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 ir 2 punktus,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kaip reguliuojama

promotorių įstato sintetinį trp-promotorių, kurio nukleotidų seka pateikta fig.8, o fig. 8 yra šios apibrėžties punkto dalis.

5 4. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 ir 2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kaip reguliuojama promotorių įstato tac- promotorių iš plazmidės ptac SDT (DSM 5018).

10 5. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad į naujų plazmidžių operoną kaip einančius vienas paskui kitą transkripcijos terminatorius įstato trp A terminatorių ir/arba tet A/orf L terminatorių iš Tn 10.

15 6. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad multiplikavimo vietos pagalba tarpinėje stadijoje įstato struktūrinį geną, kurio nukleotidų seka nurodyta fig. 15, o fig 15 yra
20 šios apibrėžties punkto dalis.

7. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad Eco RI Hind III fragmentą iš gautos atitinkamai pagal 1-6 punktus
25 plazmidės panaudoja kaip ekspresinę kasetę kitoje, enterobakterinėje, geriausiai galinčioje automatiškai daugintis Escherichia coli plazmidėje.

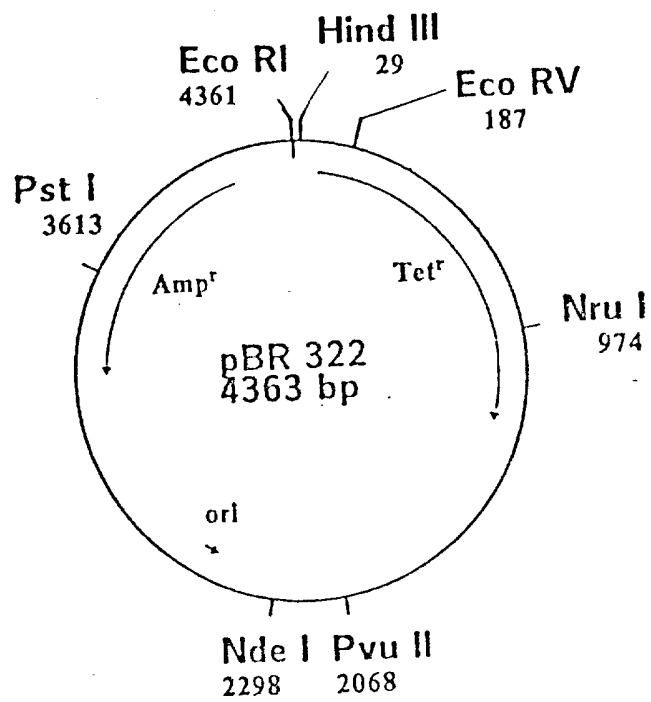
8. Naujų plazmidžių gavimo būdas pagal 1 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad gautoje atitinkamai
30 pagal 1-7 punktus plazmidėje atstumą tarp Šain-Dalgarno sekos ir startinio kodono padidina kerpant Nde I pagalba, užpildant gautas kirpimo vietas ir sujungiant bukus galus.

35 9. Plazmidės, gautos pagal 1-8 punktus panaudojimas plazminogeno aktyvatoriaus gavimui, b e s i s k i -

7
r i a n t i s tuo, kad šia plazmide žinomu būdu transformuoja enterobakterinį, geriausiai, Escherichia coli kamieną, indukuoja scu-PA struktūrinio geno ekspresiją, susidariusi tarpinės stadijos rscu-PA baltymą atskiria nuo terpės, ir lizuotas bakterines ląsteles, išankstinės stadijos baltymą soliubilizuoja ir po to paveikiant red-oks sistema, atlieka grįžtamąją reakciją iki rscu-PA.

10 10. Plazmidės, gautos pagal 1-8 punktus panaudojimas pagal 9 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad prieš įgyvendinant 9 punktą, šia plazmide transformuoja Escherichia coli tipo, geriausiai, Escherichia coli K 12 kamieną.

15



Nde I, fill in, x Pvu II (228bp)
4135 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas

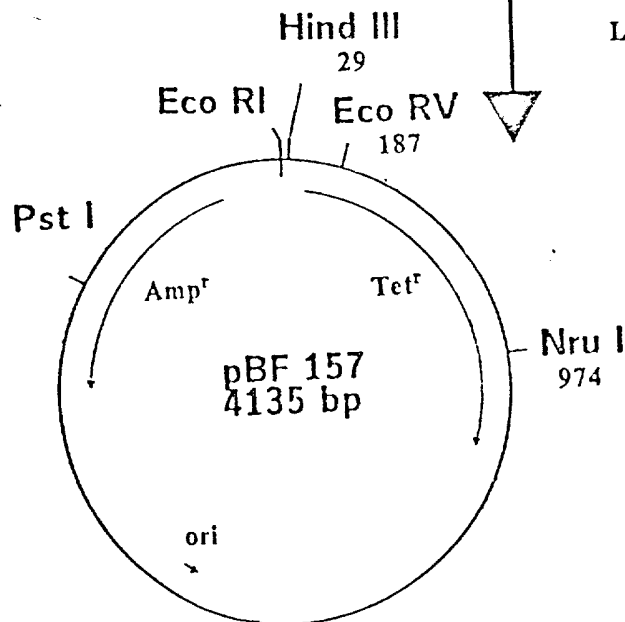


Fig. 1a

pBF 157



Eco RV x Nru I (787bp)
3348 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas

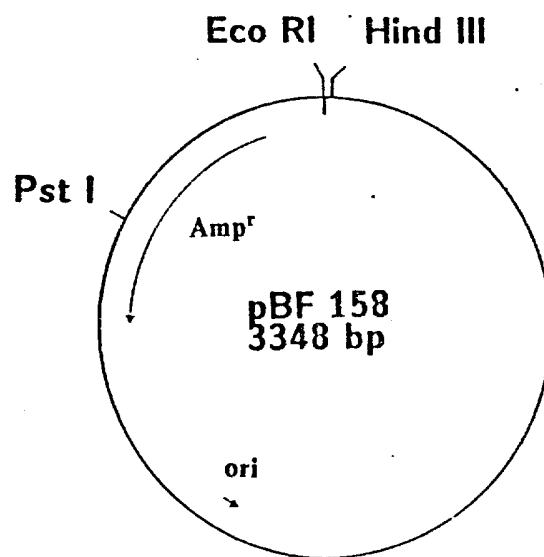


Fig. Ib

Sintetinė multiklonavimo vieta

EcoRI

```

-----B1-----
<-----
AATTCATTCTGGTCTGCGATGCTAGTCTAGATAAGGAGGAAATCATATGAGCAATGAACT
  GTAAGACCAGACGCTACGATCAGATCTATTCCTCCTTTAGTATACTCGTTACTTGA
  <-----B1A-----
  
```

```

-----B2-----
-----><-----
TCATCTGCAGCAAGTTCCATCGAACGAGCTCAAATTCAGTGCGGTCAGCGGCCGTTCTC
AGTAGACGTCGTTCAAGGTAGCTTGCTCGAGTTTAAGGTCACGCCAGTCGCCGGCAAGAG
-----B2A-----
-----><-----
  
```

```

-----><-----
GTCTCAACTCTGGTACCTCTTGCGATTTACAGGTACTAGTTTGCTCTCGCCAGCGTGGA
CAGAGTTGAGACCATGGAGAACGCTAAAGTGTCCATGATCAAACGAGAGCGGTGCGACCT
-----><-----
  
```

```

----->
B3-----
TCCGTTCTCACACCAAAGAAATCGATGACCTTCAAGTTCTGCA
AGGCAAGAGTGTGGTTTCTTTAGCTACTGGAAGTTCAAGACGTTCGA
B3A----->
  
```

HindIII

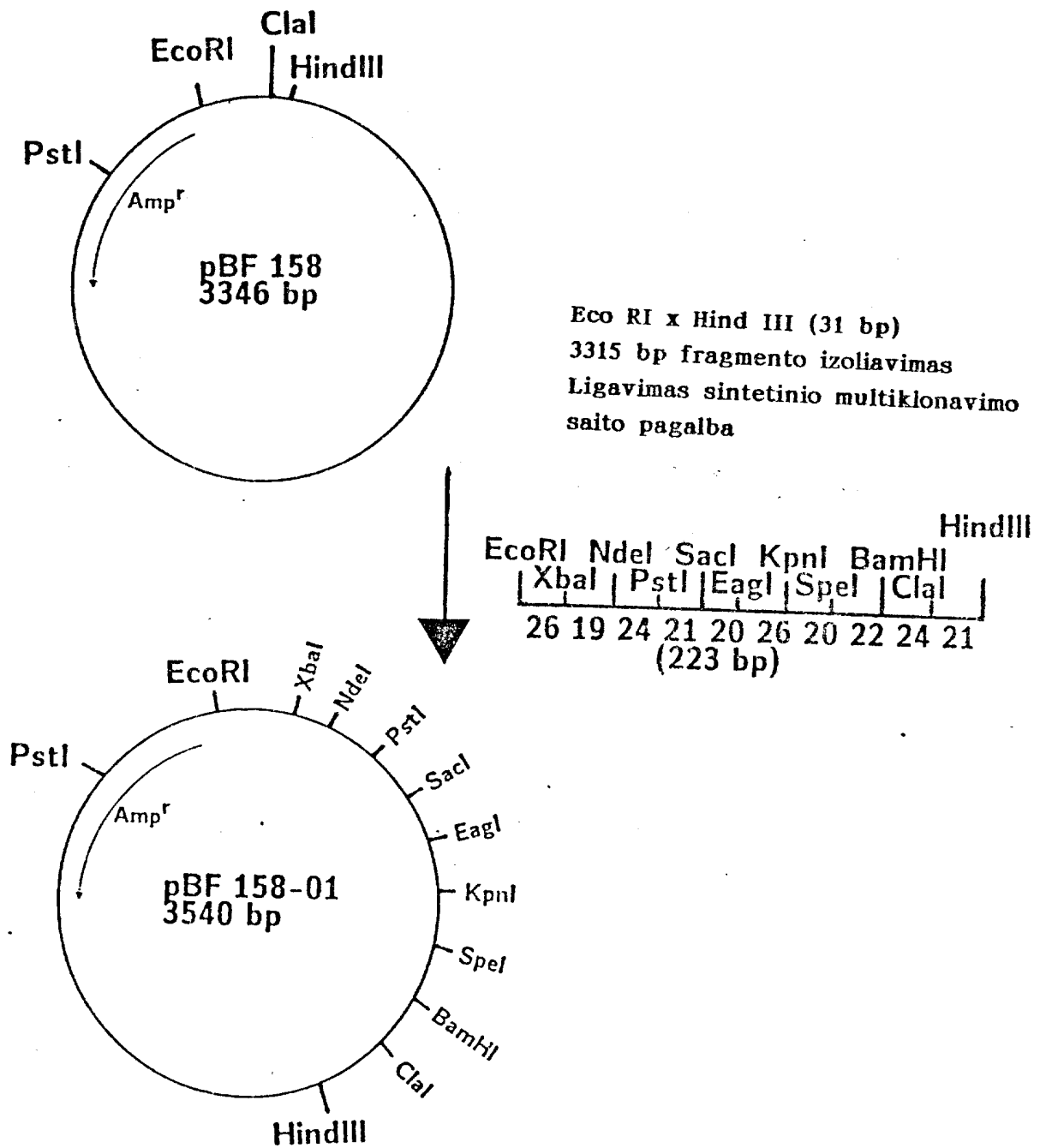


Fig. 3

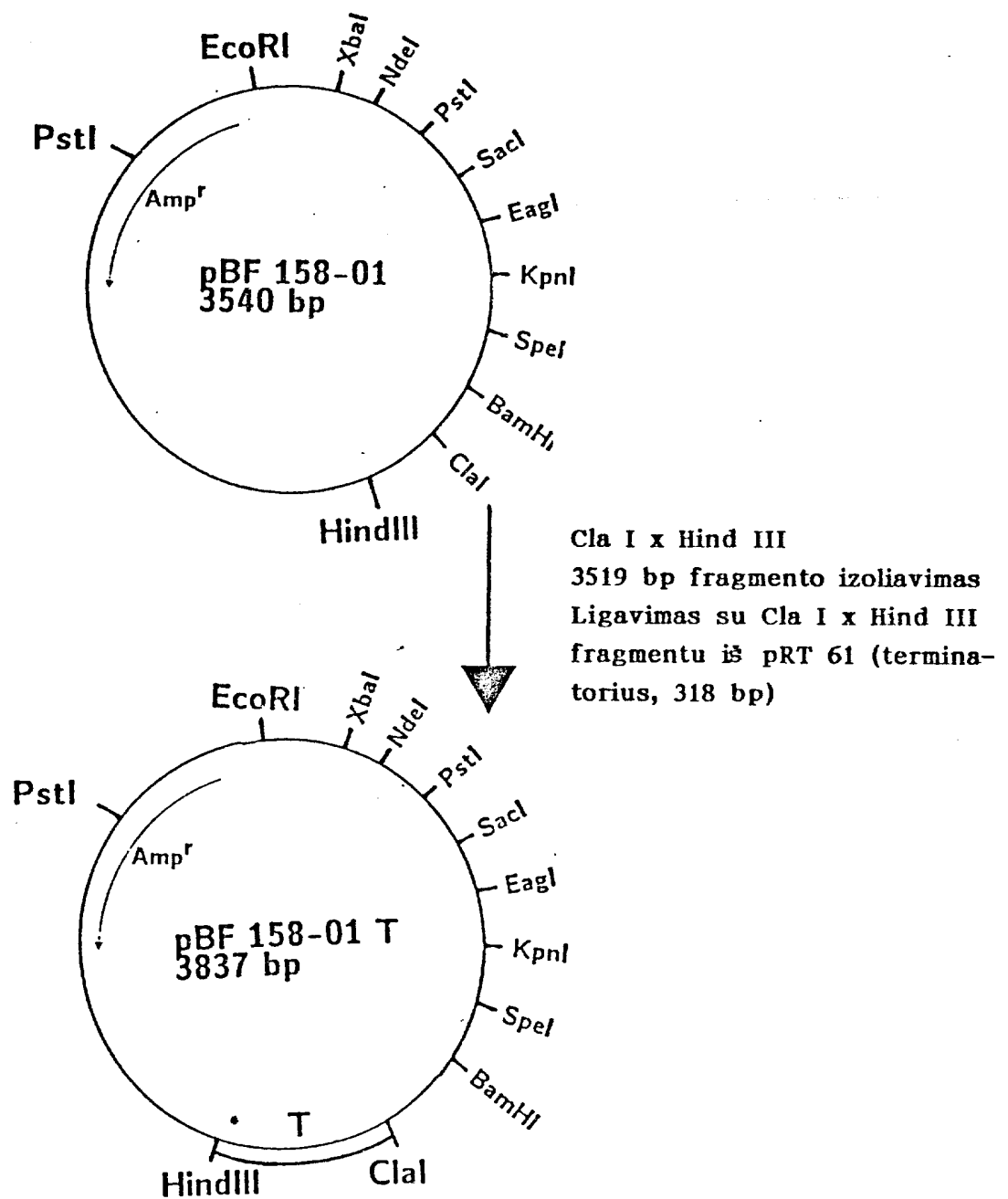


Fig. 4

Oligonukleotidų 01-019; 01A-019A bazių seka

M2 (01-04; 01A-04A):

NdeI

```

<-----01----->
TATGAGCAATGAACTTCATCAAGTCCATCGAACTGTGACTGTCTAAATGGCGGAACCTG
  ACTCGT TACTTGAAGTAGTTCAAGGTAGCTTGACACTGACAGATTTACCGCCTTGGAC
<-----01A----->
  
```

```

-----02----->
CGTTTCTAACAAATATTTCTCTAACATCCACTGGTGTAAGTGCCTCGAAAAAATTCGGTGG
GCAAAGATTGTTTATAAAGAGATTGTAGGTGACCACATTGACGGGCTTTTTTAAGCCACC
-----02A-----
  
```

```

-----03-----
TCAGCACTGCGAAATCGACAAATCTAAAACCTGCTACGAAGGTAACGGTCACTTCTACCG
AGTCGTGACGCTTTAGCTGTTTAGATTTTGGACGATGCTTCCATTGCCAGTGAAGATGGC
-----03A----->
  
```

```

----->-----04-----
TGGTAAGGCTTCTACCGACACCATGGGTCGTCCGTGCCTGCCGTGGAACCTCTGCTACCGT
ACCATTCGGAAGATGGCTGTGGTACCCAGCAGGCACGGACGGCACCTTGAGACGATGGCA
-----04A-----
  
```

```

----->
TCTGCA
AG
->
  
```

Pst I

Fig. 5 a

M3 (O5-O7; O5A-O7A):

PstI <-----05-----
 GCAGACCTACCAACGCTCACCATTCTGATGCATTGCAGCTGGGTCTGG
 ACGTCGTCTGGATGGTGCGAGTGGCAAGACTACGTAACGTCGACCCAGACC
 <-----05A-----><

-----><-----06-----
 GTAAACACAACACTACTGCCGTAACCCGGACAACCGTCGTTCGTCCGTGGTGCTACGTTTCAGG
 CATTGTTGTTGATGACGGCATTGGGCCTGTTGGCAGCAGCAGGCACCACGATGCAAGTCC
 -----06A-----><-----

-----><-----07-----
 TTGGTCTGAAACCGCTAGTTCAGGAATGCATGGTTCACGACTGCGCTGACGGTAAAAAAC
 AACCAGACTTTGGCGATCAAGTCCTTACGTACCAAGTGCTGACGCGACTGCCATTTTTCG
 -----07A-----

----->
 CGTCTTCTCCGCCGGAAGAGCT SacI
 GCAGAAGAGGCGGCCTTC
 ----->

Fig. 5b

M4 (O8-O10; O8A-O10A):

SacI

```

<-----O8--
CAAATTCCAGTGCAGTCAAAAAACCCTACGTCCGCGTT
TCGAGTTTAAGGTCACGCCAGTTTTTTGGGATGCAGGCGCAA
<-----O8A-----

```

```

-----><-----
TTAAAATCATCGGTGGTGGTTCACCACTCGAAAACCAGCCGTGGTTCGCTGCTATCT
AATTTTAGTAGCCACCACTCAAGTGGTGGTAGCTTTTGGTCGGCACCAAGCGACGATAGA
-----><-----O8B-----

```

```

-----O9-----><-----
ACCGTCGTCACCGTGGTGGTTCGTTACCTACGTTTGCGGTGGTTCCTCTGATCTCTCCGT
TGGCAGCAGTGGCACCAAGACAATGGATGCAAACGCCACCAAGAGACTAGAGAGGCA
-----><-----O9A-----

```

```

-----O10-----
GCTGGGTTATCTCTGCTACCACTGCTTCATCGACTACCCGAAAAAAGAAGACTACATCG
CGACCCAATAGAGACGATGGGTGACGAAGTAGCTGATGGGCTTTTTCTTCTGATGTAGC
-----><-----O10A-----

```

```

----->
TTTACCTC
AAATGGAGCCGG
----->

```

EagI

Fig. 5c

M5 (O11-O13; O11A-O13A):

```

<-----O11-----
GGCCGTTCTCGTTTAAACTCTAACACCCAGGGTGAAATGAAATTCGAAGTTG
EagI      CAAGAGCAAATTTGAGATTGTGGGTCCCACTTTACTTTAAGCTTCAAC
<-----O11A-----

-----><-----O12-----
AAAACCTGATCCTGCACAAAGACTACTCTGCTGACACCCTGGCTCACCACAACGACATCG
TTTTGGACTAGGACGTGTTTCTGATGAGACGACTGTGGGACCGAGTGGTGTGCTGTAGC
-----><-----

-----><-----
CTCTGCTAAAAATCCGTTCTAAAGAAGGTCGTTGCGCTCAGCCGTCTCGTACCATCCAGA
GAGACGATTTTTAGGCAAGATTTCTTCCAGCAACGCGAGTCGGCAGAGCATGGTAGGTCT
---O12A-----><-----

-----O13----->
CCATCTGCCTGCCGTCTATGTACAACGACCCGCAGTTCGGTAC
GGTAGACGGACGGCAGATACATGTTGCTGGGCGTCAAGC
-----O13A----->

```

KpnI

Fig. 5 d

M6 (O14-O16; O14A-O16A,B):

KpnI

```

<-----
CTCTTGCGAAATCACCG
CATGGAGAACGCTTTAGTGGC
<-----

```

```

-O14I-----><-----O14II-----><-----
GTTTCGGTAAAGAAACTCTACCGACTACCTGTACCCGGAACAGCTGAAAATGACCGTTG
CAAAGCCATTTCTTTTGAGATGGCTGATGGACATGGGCCTTGTCGACTTTTACTGGCAAC
-----O14A-----><-----

```

```

-----O15-----><-----
TTAAACTGATCTCTCACCGTGAATGCCAGCAGCCGCACTACTACGGTTCTGAAGTTACCA
AATTTGACTAGAGAGTGGCACTTACGGTCGTCGGCGTGATGATGCCAAGACTTCAATGGT
-O15A-----><-----O16A-----

```

```

-O16I-----><-----O16II-----
CCAAAATGCTGTGCGCTGCTGACCCGCAGTGGAAAACCGACTCTTGCCAAGGTGACTCTG
GGTTTTACGACACGCGACGACTGGGCGTCACCTTTTGGCTGAGAACGGTTCCACTGAGAC
-----><-----O16B-----

```

```

----->
GTGGTCCA
CACCAGGTGATC
----->

```

SpeI

Fig. 5 e

M7 (O17/O18; O17A/O18A):

<-----O17----->
 Spel CTAGTTTGCTCTCTCCAGGGTCGTATGACCCTGACCGGTATTGTTTCTTGGG
 AAACGAGAGAGGTCCCAGCATACTGGGACTGGCCATAACAAAGAACCC
 <-----O17A----->

-----><-----O18----->
 GTCGTGGTTGCGCTCTGAAAGACAAACCGGGTGTTTACACCCGTGTTTCTCACTTCCTGC
 CAGCACCAACGCGAGACTTTCTGTTTGGCCCACAAATGTGGGCACAAAGAGTGAAGGACG
 -----><-----O18A----->

--->
 CGTG BamHI
 GCACCTAG
 ----->

Fig. 5 f

M8 (O19; O19A):

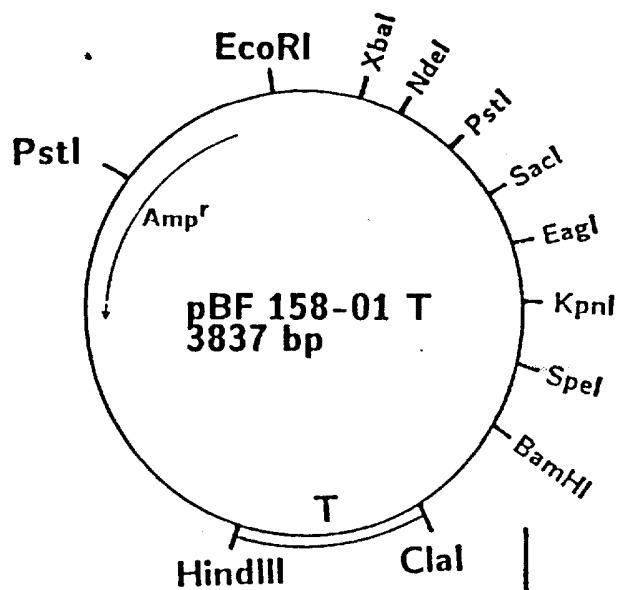
BamHI

```
<-----O19----->
GATCCGTTCTCACACCAAAGAAGAAAACGGTCTGGCTCTGTAAGCTAGCCCGCCTA
GCAAGAGTGTGGTTTCTTCTTTGCCAGACCGAGACATTCGATCGGGCGGAT
<-----O19A----->
```

```
----->
ATGAGCGGGCTTTTTTTTAT
TACTCGCCCCGAAAAAAATAGC
----->
```

Clal

Fg. 5g



Bam HI x Cla I
3813 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M8 (76 bp)

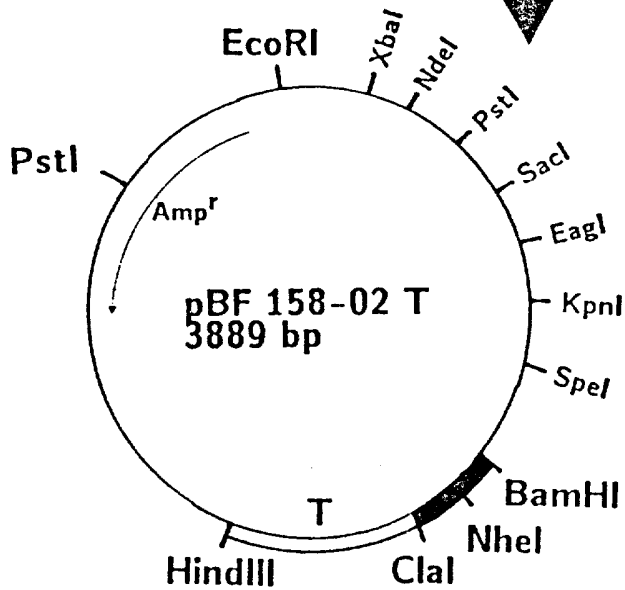
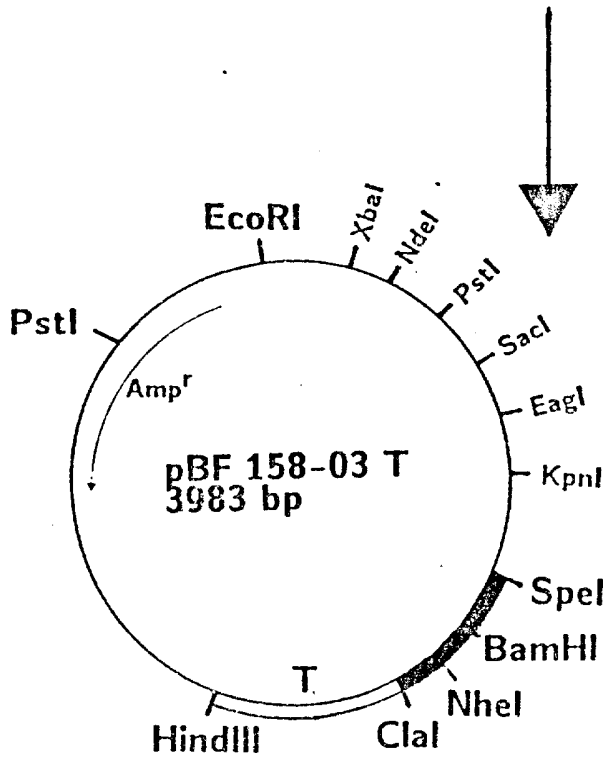


Fig. 6 a

pBF 158-02 T

Spe I x Bam HI
3867 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M7 (116bp)



Kpn I x Spe I
3962 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M6 (205 bp)

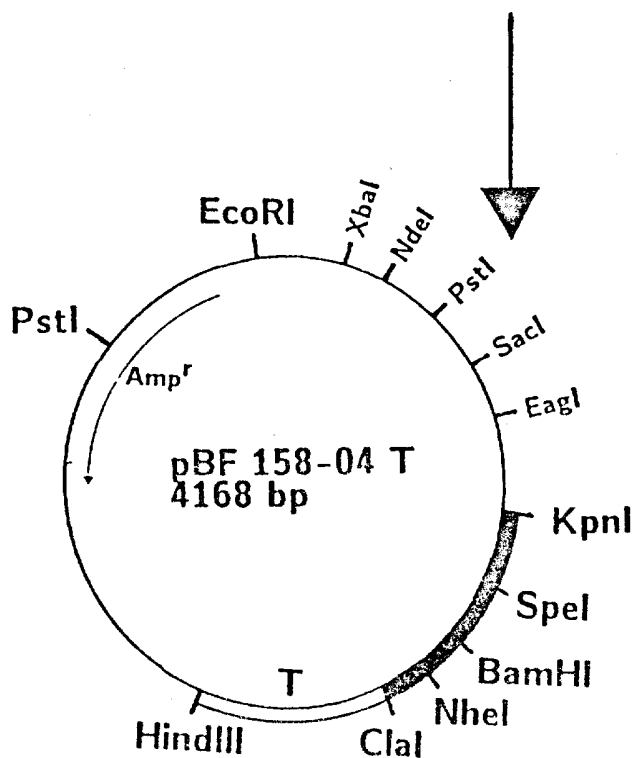
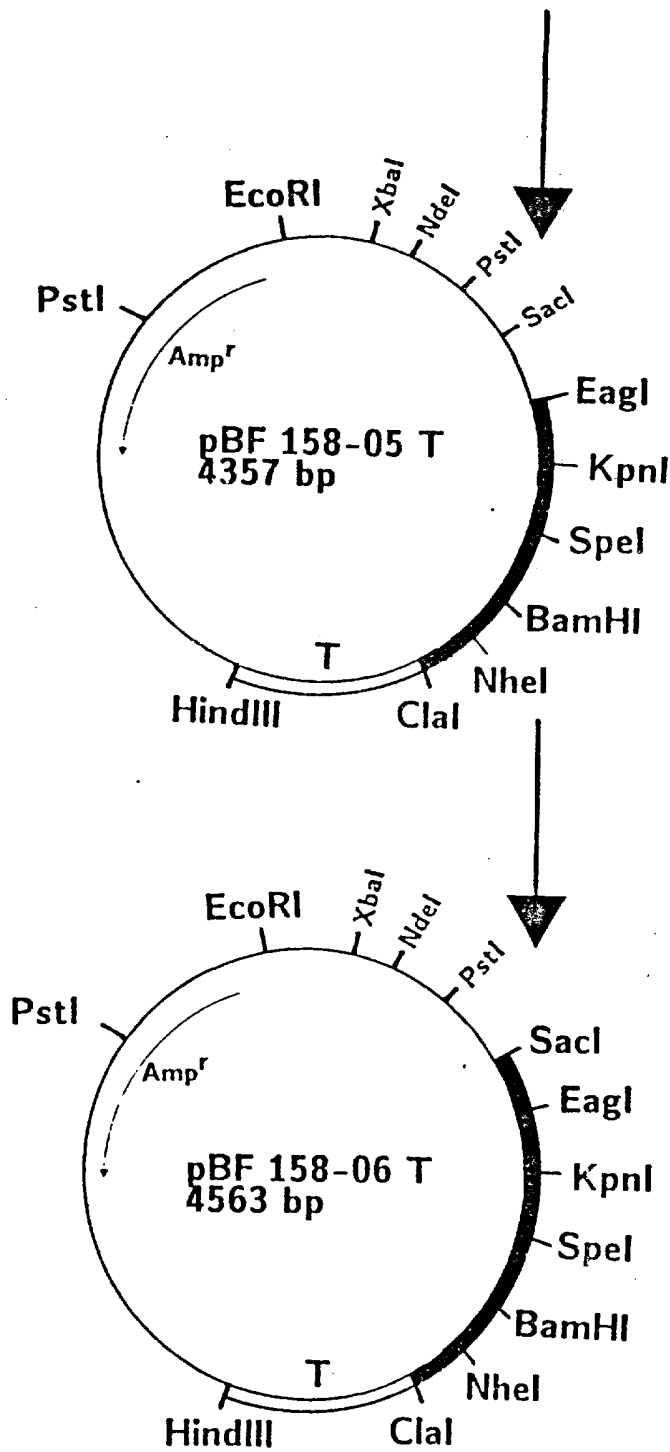


Fig. 6 b

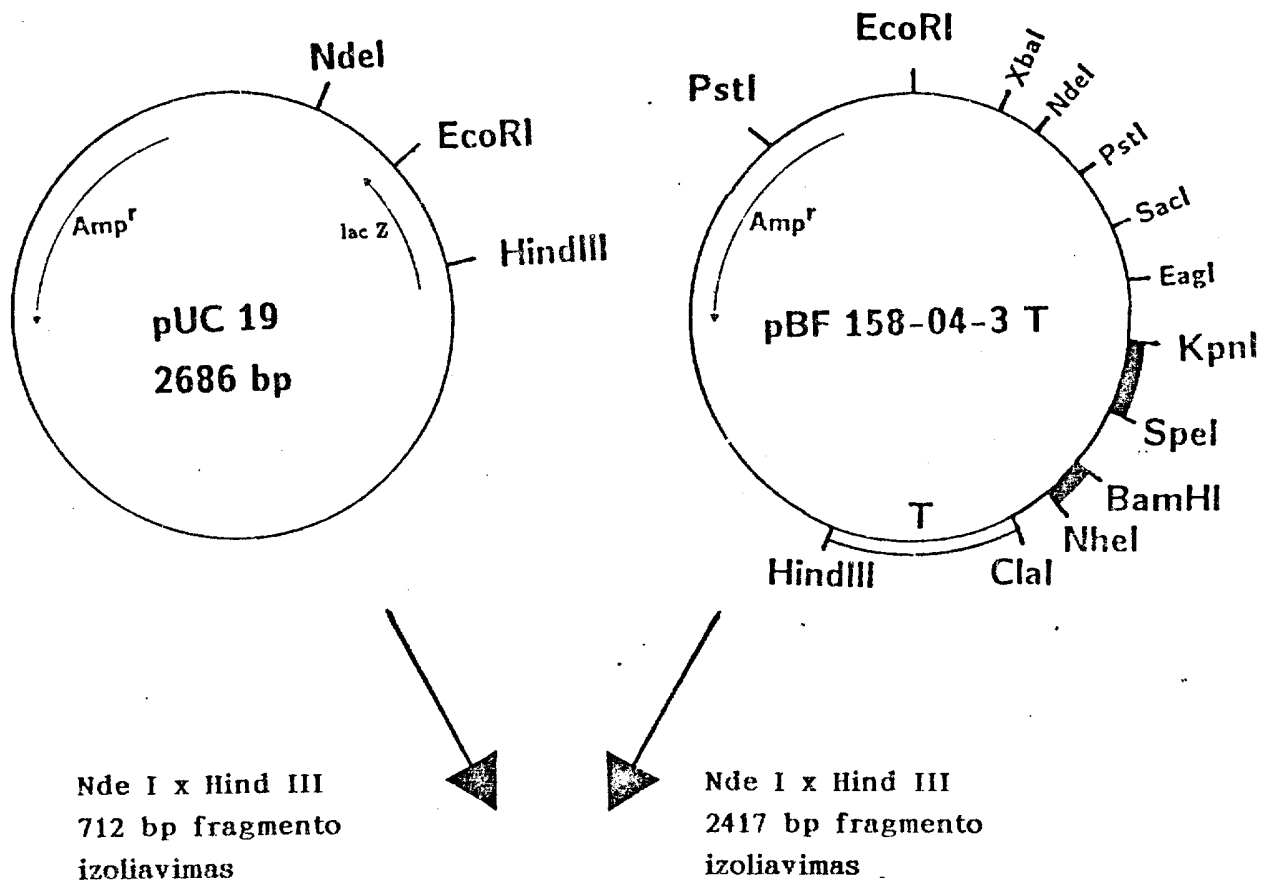
pBF 158-04 T



Eag I x Kpn I
4142 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M5 (215 bp)

Sac I x Eag I
4337 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M4 (226 bp)

Fig. 6 c



Abiejų fragmentų ligavimas

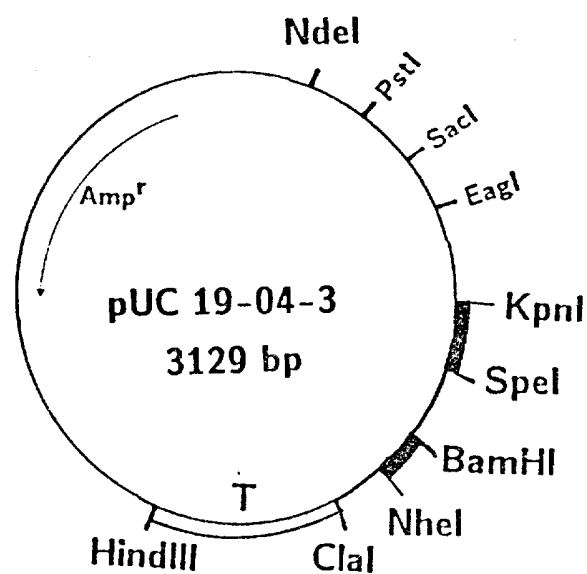


Fig. 7 a

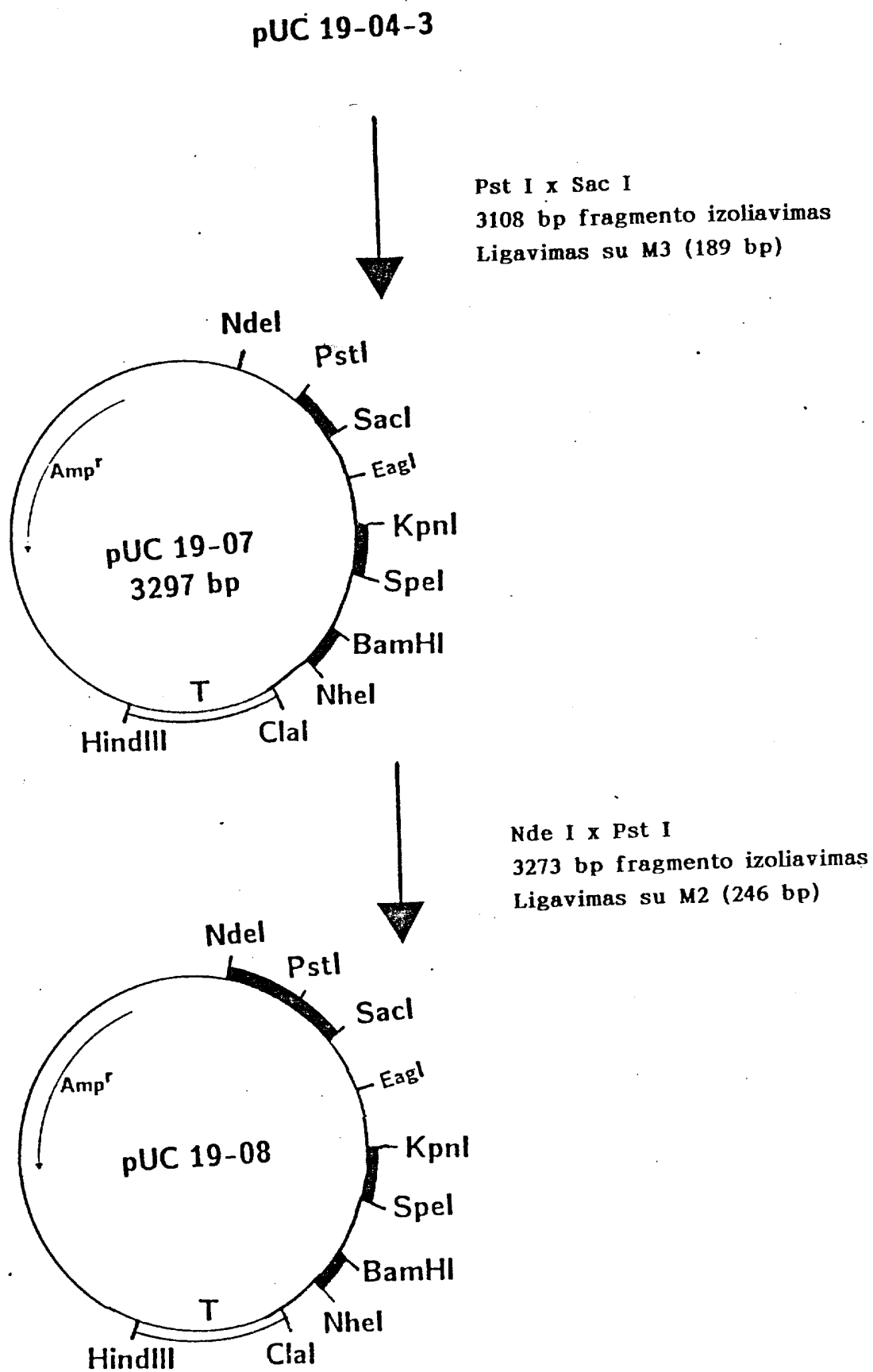


Fig. 7 b

pBF 158-06 T
(žr. 6c brėž.)

pUC 19-08
(žr. 7b brėž.)

Nde I x Sac I
4518 bp fragmento
izoliavimas

Nde I x Sac I
435 bp fragmento
izoliavimas

Abiejų fragmentų ligavimas

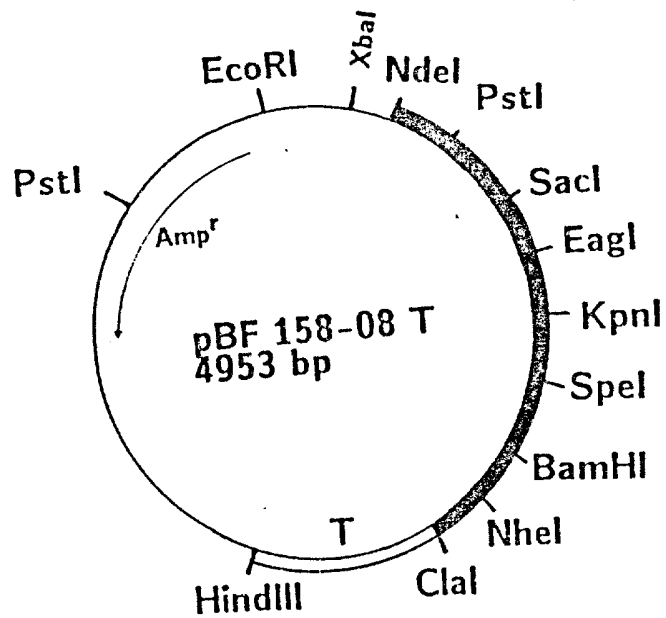


Fig. 7 c

M1 (O21; O21A):

	<-----O21-----	
EcoRI	AATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGC	
	GACTTTACTCGACAACCTGTTAATTAGTAGCTTGATCAATTGATCATGCG	
	<-----O21A-----	
	----->	
	AAGTTCACGTAAAAAGGGTAT	XbaI
	TTCAAGTGCATTTTCCCATAGATC	
	----->	

Fig. 8

pBF 158-08 T
(žr. 7c brėž.)



Eco RI x Xba I
4927 bp fragmento izoliavimas
Ligavimas su M1 (74 bp)

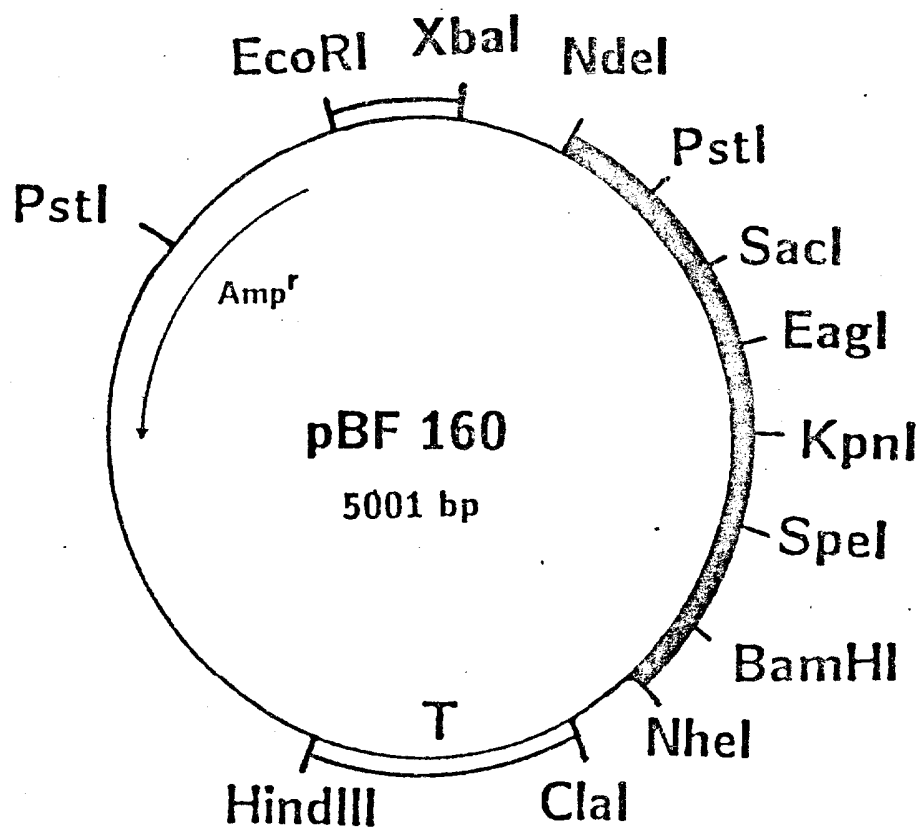


Fig. 9

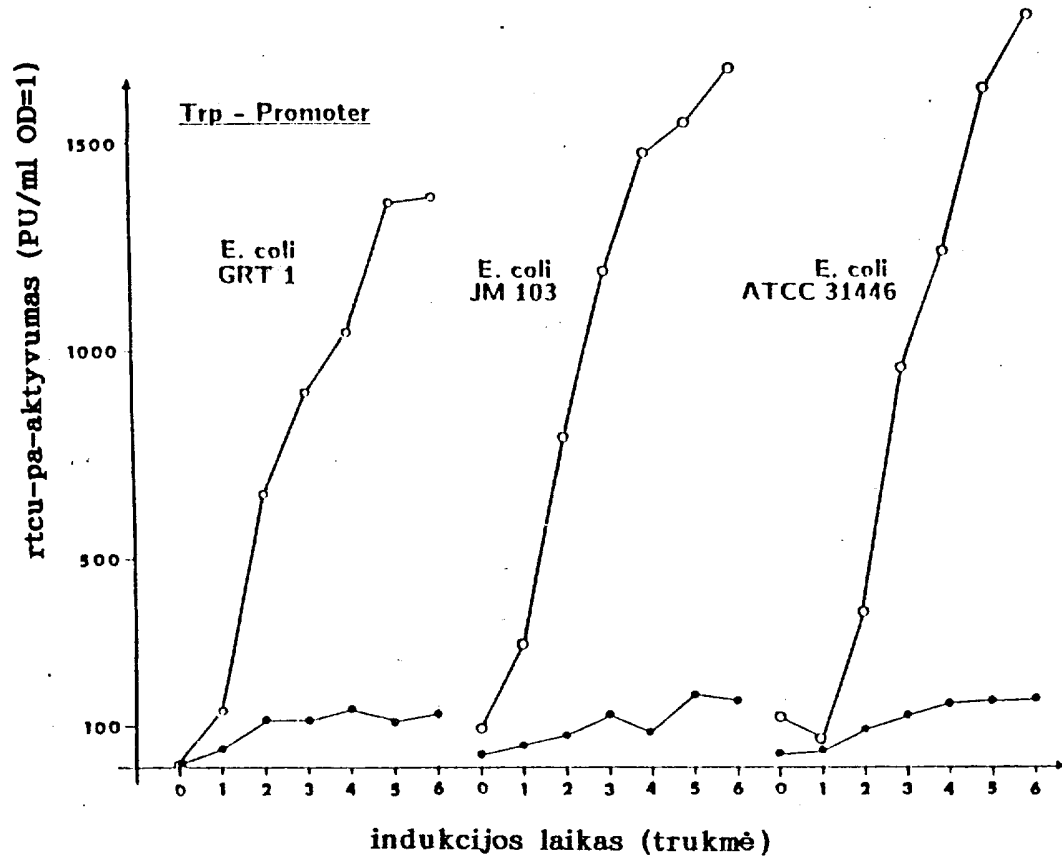


Fig. 10

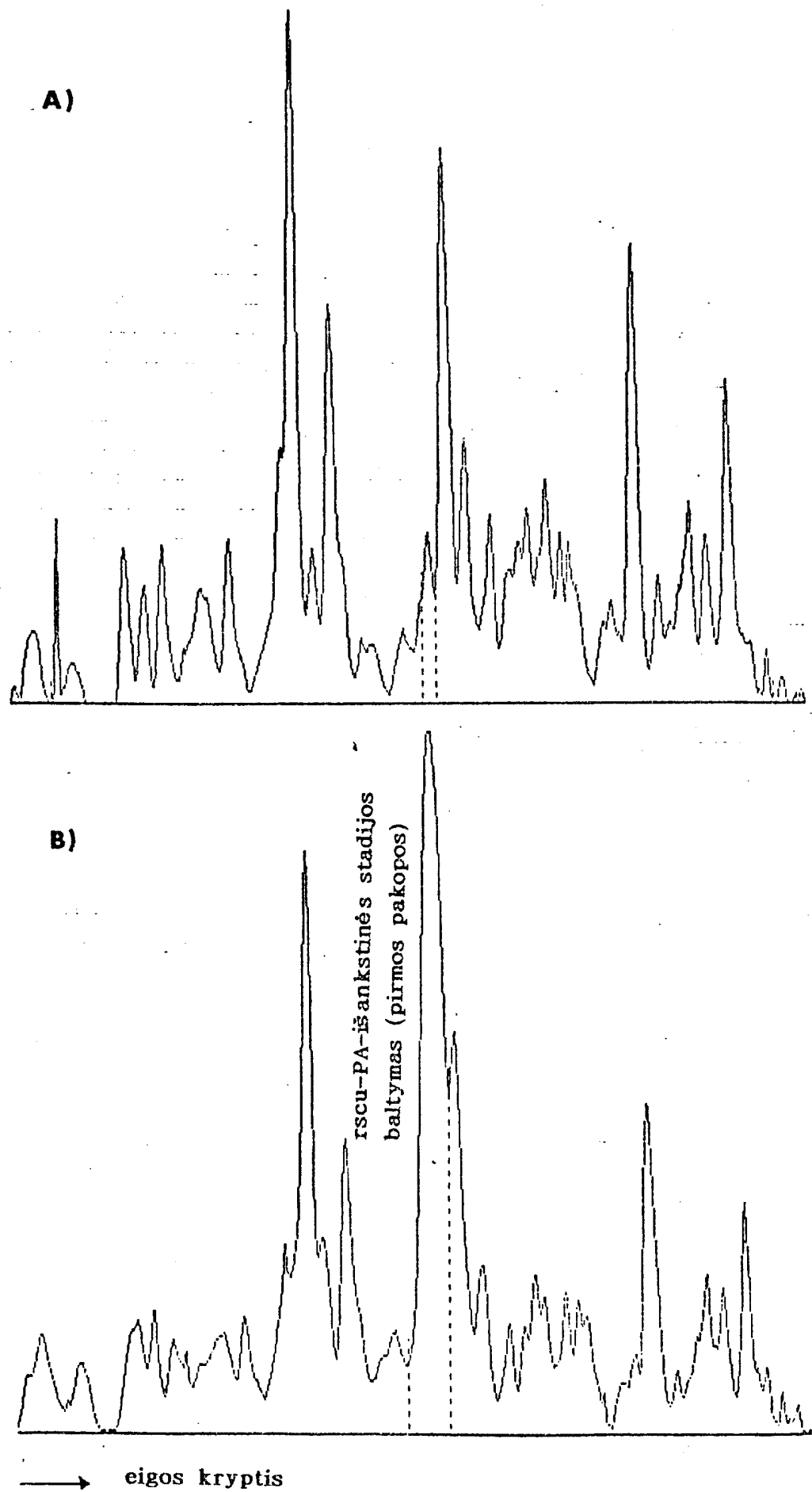


Fig. II

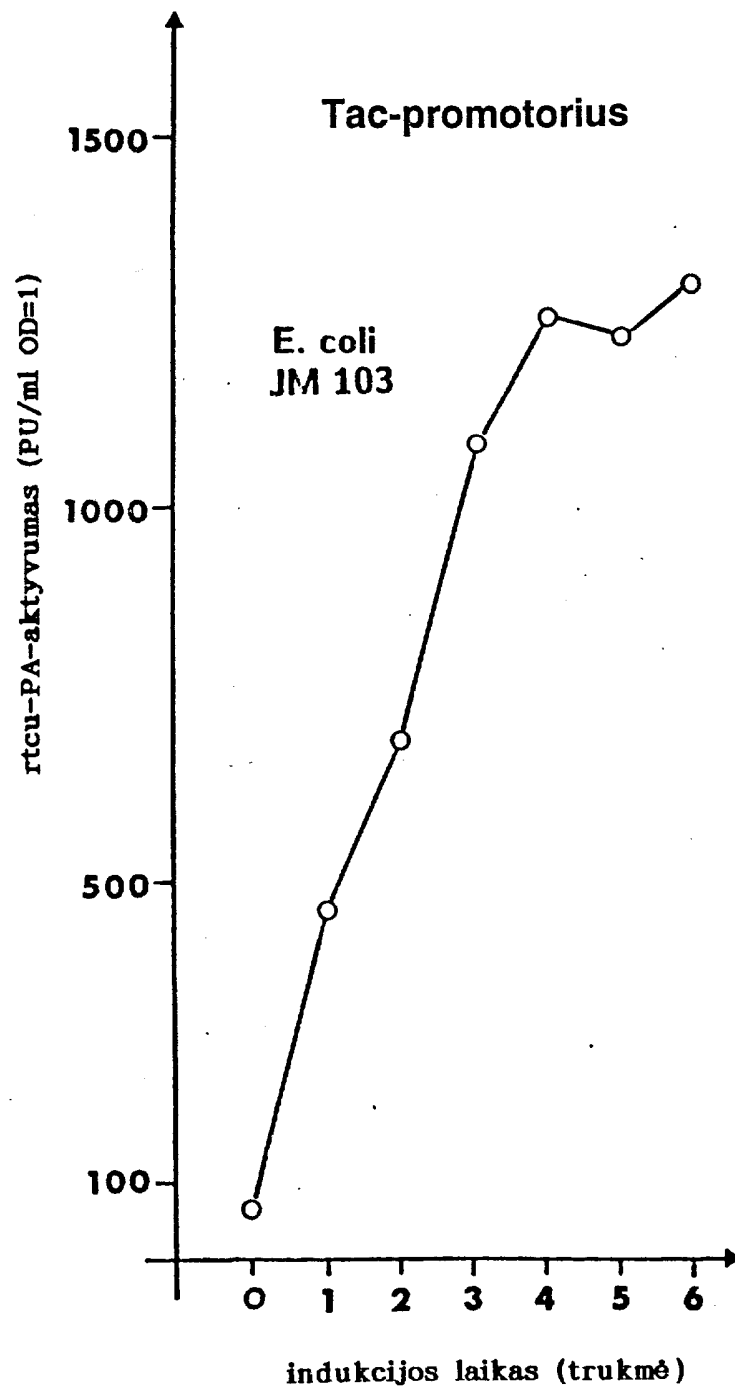


Fig. 12

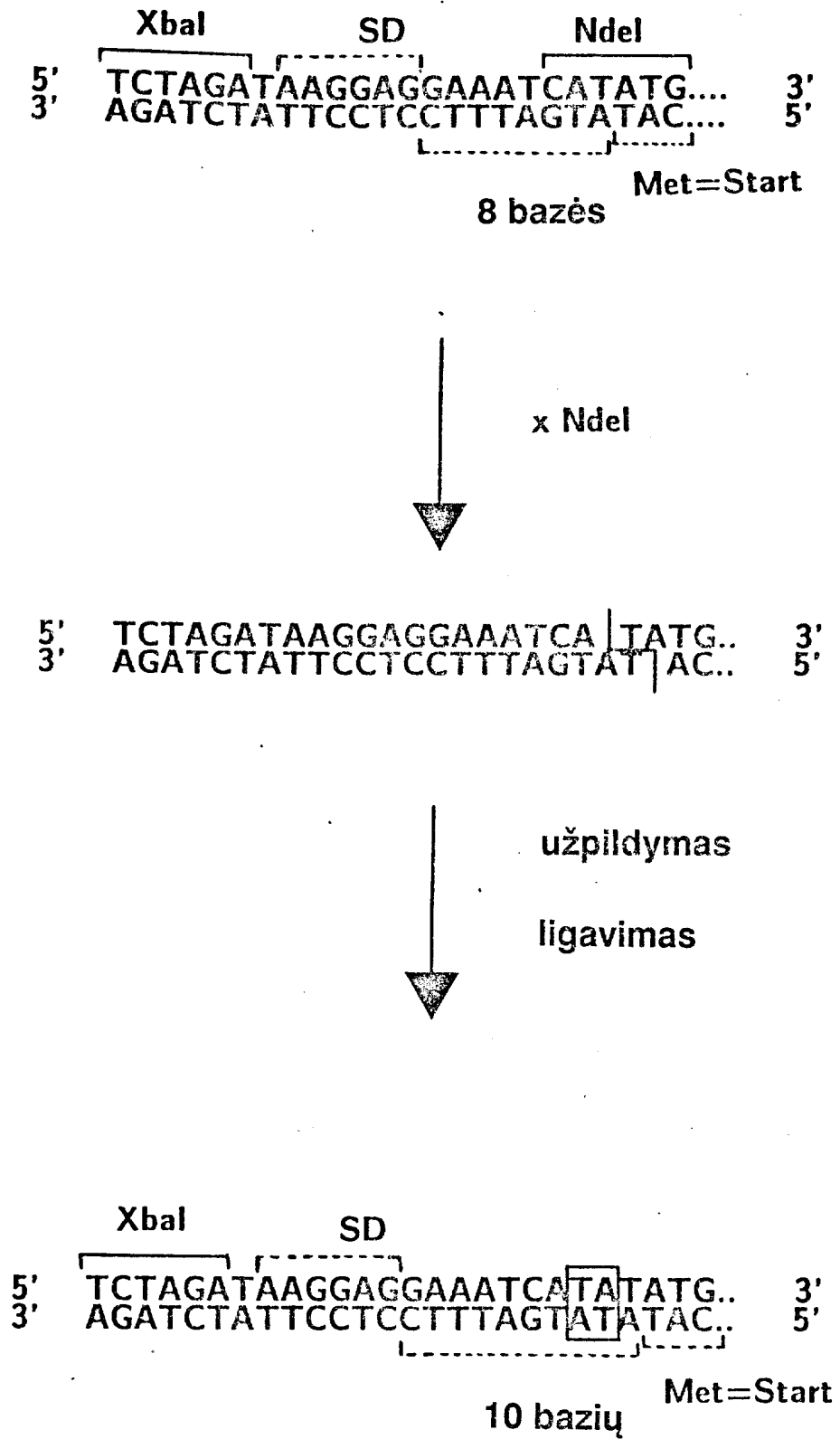


Fig. 13

Trp-promotorius

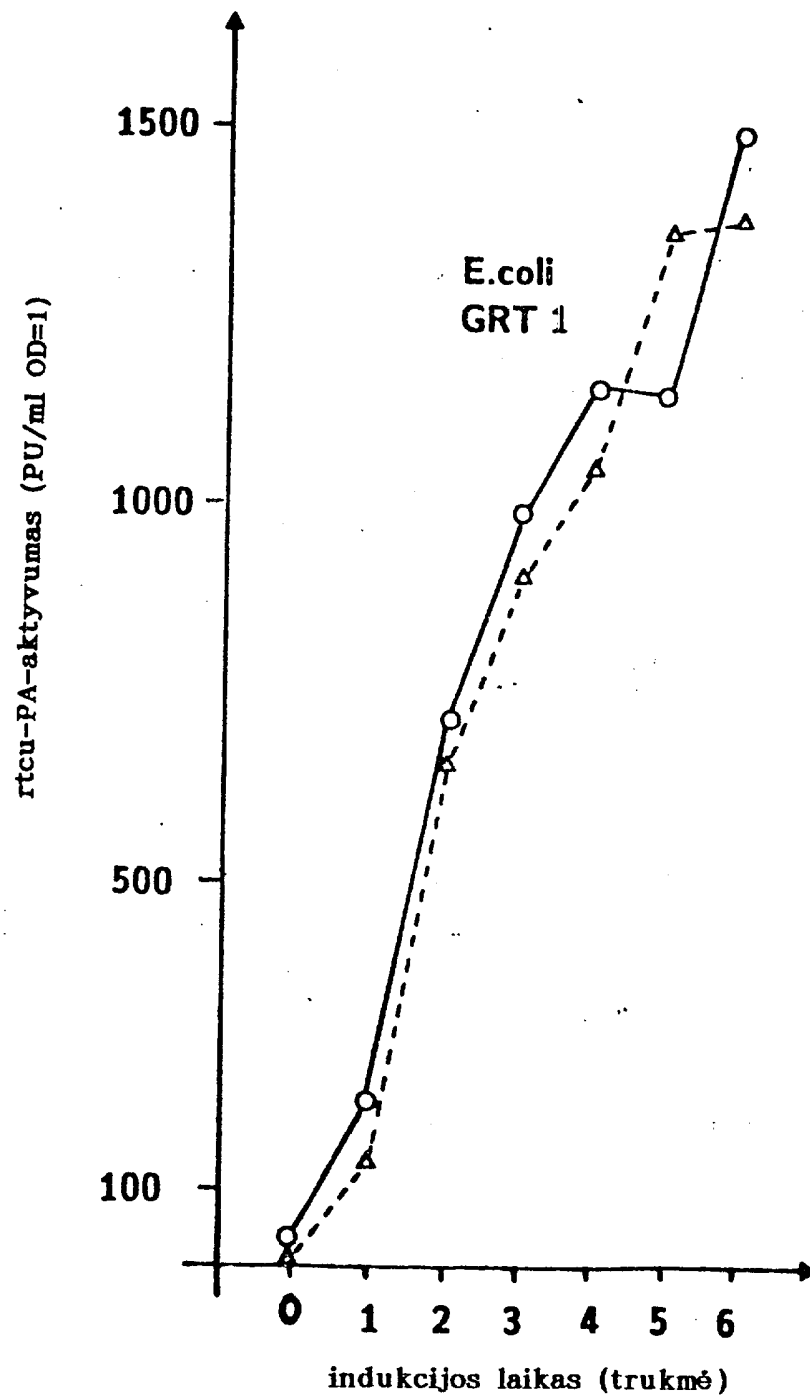


Fig. I4

AGTTCACGTA	AAAAAGGGTATCTAGATAAGGAGGAAATCATATG	Ser	Asn	Glu	Leu	His	5
CAA	GTT	CCA	TCG	AAC	TGT	GAC	58
Gln	Val	Pro	Ser	Asn	Cys	Asp	21
CAA	GTT	CCA	TCG	AAC	TGT	GAC	106
Asn	Lys	Tyr	Phe	Ser	Asn	Ile	37
AAC	AAA	TAT	TTC	TCT	AAC	ATC	154
Gly	Gly	Gln	His	Cys	Glu	Ile	53
GGT	GGT	CAG	CAC	TGC	GAA	ATC	202
Asn	Gly	His	Phe	Tyr	Arg	Gly	69
AAC	GGT	CAC	TTC	TAC	CGT	GGT	250
Pro	Cys	Leu	Pro	Trp	Asn	Ser	85
CCG	TGC	CTG	CCG	TGG	AAC	TCT	298
Ala	His	Arg	Ser	Asp	Ala	Leu	101
GCT	CAC	CGT	TCT	GAT	GCA	TTC	346
Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Arg	117
TGC	CGT	AAC	CCG	GAC	AAC	CGT	394
Gly	Leu	Lys	Pro	Leu	Val	Gln	133
GGT	CTG	AAA	CCG	CTA	GTT	CAG	442
Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	149
GGT	AAA	AAA	CCG	TCT	TCT	CCG	490
Gln	Lys	Thr	Leu	Arg	Pro	Arg	165
CAA	AAA	ACC	CTA	CGT	CCG	CGT	538
Thr	Ile	Glu	Asn	Gln	Pro	Trp	181
ACC	ATC	GAA	AAC	CAG	CCG	TGG	586
Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Tyr	Val	197
GGT	GGT	TCT	GTT	ACC	TAC	GTT	634
Trp	Val	Ile	Ser	Ala	Thr	His	213
TGG	GTT	ATC	TCT	GCT	ACC	CAC	682

Fig. 15 a

Asp	Tyr	Ile	Val	Tyr	Leu	Gly	Arg	Ser	Arg	Leu	Asn	Ser	Asn	Thr	Gln	229
GAC	TAC	ATC	GTT	TAC	CTC	GGC	CGT	TCT	CGT	TTA	AAC	TCT	AAC	ACC	CAG	730
Gly	Glu	Met	Lys	Phe	Glu	Val	Glu	Asn	Leu	Ile	Leu	His	Lys	Asp	Tyr	245
GGT	GAA	ATG	AAA	TTC	GAA	GTT	GAA	AAC	CTG	ATC	CTG	CAC	AAA	GAC	TAC	778
Ser	Ala	Asp	Thr	Leu	Ala	His	His	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys	Ile	261
TCT	GCT	GAC	ACC	CTG	GCT	CAC	CAC	AAC	GAC	ATC	GCT	CTG	CTA	AAA	ATC	826
Arg	Ser	Lys	Glu	Gly	Arg	Cys	Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Thr	Ile	Gln	Thr	277
CGT	TCT	AAA	GAA	GGT	CGT	TGC	GCT	CAG	CCG	TCT	CGT	ACC	ATC	CAG	ACC	874
Ile	Cys	Leu	Pro	Ser	Met	Tyr	Asn	Asp	Pro	Gln	Phe	Gly	Thr	Ser	Cys	293
ATC	TGC	CTG	CCG	TCT	ATG	TAC	AAC	GAC	CCG	CAG	TTC	GGT	ACC	TCT	TGC	922
Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Gly	Lys	Glu	Asn	Ser	Thr	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Pro	309
GAA	ATC	ACC	GGT	TTC	GGT	AAA	GAA	AAC	TCT	ACC	GAC	TAC	CTG	TAC	CCG	970
Glu	Gln	Leu	Lys	Met	Thr	Val	Val	Lys	Leu	Ile	Ser	His	Arg	Glu	Cys	325
GAA	CAG	CTG	AAA	ATG	ACC	GTT	GTT	AAA	CTG	ATC	TCT	CAC	CGT	GAA	TGC	1018
Gln	Gln	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Glu	Val	Thr	Thr	Lys	Met	Leu	Cys	341
CAG	CAG	CCG	CAC	TAC	TAC	GGT	TCT	GAA	GTT	ACC	ACC	AAA	ATG	CTG	TGC	1066
Ala	Ala	Asp	Pro	Gln	Trp	Lys	Thr	Asp	Ser	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	357
GCT	GCT	GAC	CCG	CAG	TGG	AAA	ACC	GAC	TCT	TGC	CAA	GGT	GAC	TCT	GGT	1114
Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Ser	Leu	Gln	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Thr	Gly	Ile	373
GGT	CCA	CTA	GTT	TGC	TCT	CTC	CAG	GGT	CGT	ATG	ACC	CTG	ACC	GGT	ATT	1162
Val	Ser	Trp	Gly	Arg	Gly	Cys	Ala	Leu	Lys	Asp	Lys	Pro	Gly	Val	Tyr	389
GTT	TCT	TGG	GGT	CGT	GGT	TGC	GCT	CTG	AAA	GAC	AAA	CCG	GGT	GTT	TAC	1210
Thr	Arg	Val	Ser	His	Phe	Leu	Pro	Trp	Ile	Arg	Ser	His	Thr	Lys	Glu	405
ACC	CGT	GTT	TCT	CAC	TTC	CTG	CCG	TGG	ATC	CGT	TCT	CAC	ACC	AAA	GAA	1258
Glu	Asn	Gly	Leu	Ala	Leu											411
GAA	AAC	GGT	CTG	GCT	CTG	TAAGCTAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTATCGAT										1316

Fig. 15 b