

- (11) Patent numeris: **3686** (51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/12**
C12N 15/63
- (21) Paraiškos numeris: **IP1523**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 03**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 01 25**
- (60) SU duomenys: **SU 4895292, 1991 04 19**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **40 12 818.0, 1990 04 21, DE**
- (72) Išradėjas:
Klaus Peter Koller, DE
Guenther Riess, DE
- (73) Patent savininkas:
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, D-65926 Frankfurt am Main, DE
- (74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
**Sujungtų baltymų gavimo būdas, geno struktūra, hibrido ir streptomicetų
ląstelių transformavimo būdas**

- (57) Referatas:

Sujungtų baltymų, geno struktūros, hibrido gavimo būdas ir streptomicetų ląstelių transformavimo būdas.
Genų struktūros, kurios koduoja signalinę seką ir nuo 7-tos iki 10-tos pirmųjų tandemų amino rūgščių, o taip pat pageidaujamas baltymas išsiskiria streptomicetų ląstelėse-šeimininkuose didele išeiga ir sujungti baltymai sekretuojami į terpę.

Išradimas priskiriamas biotechnologijos sričiai ir susijęs su sujungtų baltymų, geno struktūros ir hibrido gavimo būdu bei streptomicetų ląstelių transformavimo būdu.

Žinomas sujungtų baltymų gavimo būdas, kai modifikuoto tandeminio geno būtinumo atveju pageidaujamo baltymo struktūrinį geną prijungia prie koduojančio siūlo 3'-galo, šitą geno struktūrą ekspresuoja į streptomicetų ląsteles-šeimininkus ir iš supernatantinio skysčio išskiria sekretuotą sujungtą baltymą (EP- Nr. A 0289936). Geriausiam variante tandeminis genas sutrumpinamas 3'-gale. Sutrumpinimui panaudojamos restrikcinių fermentų BstEII tripletų 31 ir 32 srityje, StuI tripletų 43 ir 44 srityje, o taip pat Sau3A tripletų 52 ir 53 srityje skaidymo vietos.

Toliau tobulinant šią idėją, buvo pasiūlyta gauti sujungtą baltymą, kurio tandeminėje dalyje yra sutrumpintas proinsulinas, kurio C-grandinė sudaryta tik iš vienos arba dviejų lizino liekanų ("mini-proinsulinas"). Toliau buvo pasiūlyta panašiuose sujungtuose baltymuose taip pat trumpinti tandeminę dalį (EP- Nr. A 367163).

Pastaruoju metu netikėtai surasta, kad sujungti baltymai su labai trumpa tandemine dalimi streptomicetų ląstelėje yra stabilūs ir išsiskiria į terpę. Tokiu būdu gauti sujungti baltymai dėl labai trumpos tandeminės grandinės elgiasi kaip "subrendę" baltymai ir terpėje egzistuoja taisyklingos tretinės struktūros pavidalu.

Iš EP- Nr.A 0177827 žinoma sintetinė signalinė DNR seka baltymų transportui į ekspresijos sistemas, kuri skiriasi tuo, kad ši DNR iš esmės atitinka gamtinę signalinę seką, bet turi vieną arba keletą endonukleazijų skaidymo vietų, kurių nėra gamtinėje DNR. Jeigu transportuojamo baltymo genas prijungiamas prie tokios DNR sekos, šis sujungtas genas įstatomas į vektorių ir tokiu būdu transformuojama ląstelė-šeimininkas, kuri transportuoja išsiskyrusį baltymą iš citoplazmos, ir taip galima gauti eukariotinius, prokariotinius arba virusinius baltymus prokariotinėse ir eukariotinėse ląstelėse. Periplazminio baltymo - šarminės fosfatazės pavyzdžiu parodyta, kad *E.coli* ekspresijoje pageidautina, kad jis būtų įvestas po maždaug 40 pirmųjų šarminės fosfatazės aminorūgščių kodonų sekos prieš pageidaujamo baltymo struktūrinį geną. Tačiau daugeliu atvejų pakanka mažesnio papildomų aminorūgščių skaičiaus, pavyzdžiui 10, dar geriau - apie 5. Atitinkamas sujungtas baltymas su bezdžionių proinsuliniu maždaug iki 90 % transportuojasi į periplazminę erdvę.

Pasiūlytas sujungtų baltymų gavimo būdas, konstruojant mišrų oligonukleotidą, kuris koduoja sujungto baltymo balastinę dalį (PCT Nr. 91/03550). Šis oligonukleotidas įvedamas į vektorių tokiu būdu, kad jis būtų funkcionaliai sujungtas su reguliacijos sritimi ir norimo baltymo struktūriniu genu; taip gauta plazmidės populiacija transformuojamos tinkamos ląstelės-šeimininkai ir selekcionuojami tie klonai, kurie turi didelę koduoto sujungto baltymo išėigą. Šiuo atveju oligonukleotidas susideda daugiausia iš 4-12, ypatingais atvejais - iš 4-8 tripletų.

Bandyta gauti sujungtus baltymus su trumpa balastine dalimi. Pavyzdžiui, buvo gautas genų sujungimas, kuris koduoja sujungtą baltymą iš β -galaktozidazės pirmųjų 10 aminorūgščių ir somatostatino. Tačiau pasirodė, kad šio trumpo β -galaktozidazės fragmento nepakanka, kad sujuntas baltymas būtų apgintas nuo šeimininko proteazių (US-A 4366246, 15. skiltis, 2 pastraipa). Išeinant iš to, EP- Nr.A 0290005 ir EP-Nr.A 0292763 aprašyti sujungti baltymai, kurių balastinė dalis sudaryta iš β -galaktozidazės fragmento, susidedančio iš 250 aminorūgščių.

Vistik dabartiniu metu sujungti baltymai, sudaryti iš tandemio pirmųjų maždaug 10 N-galinių aminorūgščių ir pageidaujamo baltymo, pavyzdžiui, proinsulino, netikėtai pasirodė stabilūs streptomicetų ląstelėse-šeimininkuose ir galintys išsiskirti į terpę, iš kurios jie gali būti išskirti su didele išeiga. Tai turi reikšmės palyginus nedideliems baltymams, tokiems kaip "mini-proinsulinai".

"Maždaug 10 aminorūgščių" reiškia, kad turima galvoje ir mažesnis aminorūgščių skaičius, pavyzdžiui, pirmosios 7 tandemio N-galo aminorūgštys, bet optimaliausia - ne daugiau 10. Optimalus variantas - kai sujungtų baltymų tandeminėje dalyje 7-je ir/arba 9-je padėtyse (kaip ir gamtinėje sekoje) yra prolinas.

Savaime aišku, pagal žinomus ir siūlomus variantus (EP- Nr.A 0367163) galima rinktis didelę tandeminę balastinę dalį, žinoma tuo pačiu vis labiau mažėja nedidelio "balasto" pranašumas.

Galima ir net rekomenduotina varijuoti tandeminės dalies gamtinę 7-10-tos padėties aminorūgščių seką, t.y. pakeisti nesančiomis gamtinėje sekoje aminorūgštimis. Be to, galima varijuoti aminorūgščių seką signaliniame peptide.

Išradimo esmė ta, kad paprastų preliminarinių bandymų dėka gali būti lengvai nustatomos ypatingai tinkamos sujungtos konstrukcijos.

Be to, išradimo idėjos gali būti įgyvendintos kitose gram-teigiamų bakterijų ląstelėse, pavyzdžiui bacilų arba stafilokokų ląstelėse, panaudojant signalines sekas, kurias "atpažįsta" šie šeimininkai.

Sujungti baltymai, gauti pagal šį išradimą, yra ištirpę terpėje, o tai yra labai patogiu toliau apdorojant ir valant. Pavyzdžiui, galima vykdyti fermentinį apdorojimą betarpiškai su sekretinio produkto pagalba, atskiriant balastinę dalį ir išvengiant apdorojimo stadijų, reikalingų netirpių sujungtų baltymų atveju. Prieš tolesnį apdorojimą, galima kondensuoti arba valyti, pavyzdžiui, afininės chromatografijos, o taip pat ultrafiltracijos, nusodinimo, jonų kaitos, adsorbcinės chromatografijos, gelfiltracijos arba aukšto slėgio skysčio chromatografijos būdu.

Toliau aprašomi pavyzdžiai išsamiau paaiškina išradimą.

Konstruojant plazmidę, pradine medžiaga imta plazmidė pKK500, pasiūlyta EP-A 0367163. Ši plazmidė skiriasi nuo žinomos iš EP-Nr.A 0289936 plazmidės pKK400 tuo,

kad proinsulino genas yra pakeistas analogišku genu, kuris vietoj C-grandinės koduoja tik aminorūgštį liziną, o taip pat ir tuo, kad po šio “mini-proinsulino” geno yra įvestas terminatorius. Kaip priedas prie aprašymo, duodamos 1 ir 2 lentelės iš EP-A 0367163, kuriose atvaizduotas “mini-proinsulino” genas, atitinkamai, terminatorius.

Plazmidės pKK400 ir pKK500 inhibuojančio α -amilazę geno signalinėje sekoje turi XmaIII skaidymo vietą (tripleto 5-7 srityje).

1 pavyzdys

Plazmidę pKK500 sukarpo restrikciniais fermentais EcoRI ir XmaIII ir gelio elektroforezės būdu ant 0,8 %-nio agarozės gelio išskiria didelį fragmentą, kurį po to atskiria elektroliucijos pagalba. Šį fragmentą liguoja su DNR fragmentu (1), susintetintu fosforamidatiniu būdu (SEQ ID NO:1) ir liguotą mišinį transformuoja į *E.coli*.

	-5					-1	
	Ala	Gly	Pro	Ala	Ser	Ala	
5'	G	GCC	GGG	GGC	GCC	TCC	GCC
3'		CCC	GGC	CGG	AGG	CGG	

(XmaIII)

Asp	Thr	Thr	Val	Ser	Glu	Pro	
GAC	ACG	ACC	GTC	TCC	GAG	CCG	3'
CTG	TGC	TGG	CAG	AGG	CTC	GGC	TTA A 5'

(EcoRI)

Gauna plazmidę pKK510. Ji koduoja pre-proinsuliną, kuriame po signalinės tandem sekos eina pirmosios 7 aminorūgštys ir po to mini-proinsulino grandinė.

2 pavyzdys

Analogiškai aprašytam EP-A 0289936 plazmidės pKK400 pakeitimo į ekspresijos plazmidę pGF1 būdai, plazmidę pKK510 paverčia ekspresijos plazmide pKF1:

izoliuotą DNR-plazmidę pKK510 sukarpo restrikcinių fermentų SphI ir SstI pagalba ir atskiria nedidelį fragmentą su sujungtu genu. Parduodamą ekspresijos plazmidę pIJ 702 (John Innes Foundation, Norwich, Anglija) sukarpo tų pačių fermentų pagalba ir atskiria didelį fragmentą. Šiuos abu izoliuotus fragmentus liguoja, liguotą mišinį transformuoja į *S. lividans* TK24 ir iš tiostrepton-rezistentų, baltų (t.y. nesugebančių gaminti melanino) transformantų išskiria plazmidę. Klonus, kurie turi įvestą intarpą, augina pastoviai purtomoje kultūroje ir tiria sujungtų baltymų susidarymą.

Koduoto sujungto baltymo ekspresija vyksta žinomu būdu. Jeigu transformuotą štamą inkubuoja 4 dienas purtyklėje esančiose kolbose aukštesnėje nei 25 oC

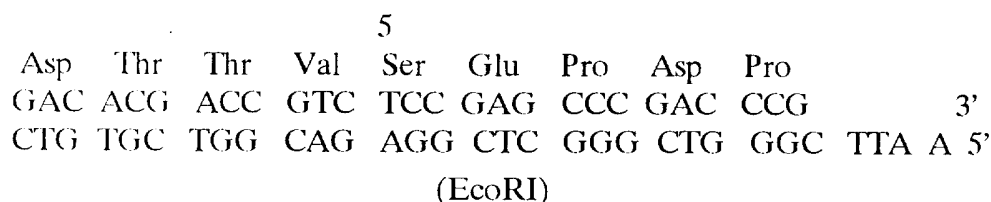
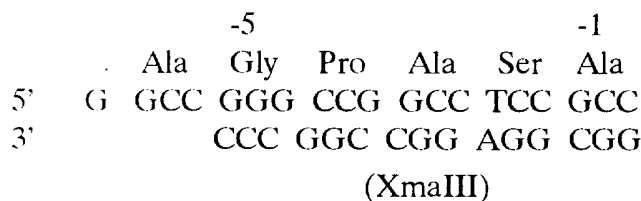
temperatūroje ir centrifugavimu atskiria micelį nuo kultivavimo skysčio, tai dėka nudažymo COOMASSIE-mėliu, gaunant papildomą baltymo juostą, kuri neišryškėja kontroliniame eksperimente, kuriame štamai transformuoti tik pIJ 702 pagalba, susidariusį sujungtą baltymą galima aptikti po elektroforezės 20 µm supernatantiniame skystyje ir kultivavimo skysčio filtrate 15 %-niame poliakrilamido gelyje.

Jei kultivavimo skysčio filtratą paveikia lizilendoproteinaze, tai gelio elektroforezės būdu galima aptikti Des-(B30)-Thr-insuliną, kurį patvirtina autentiška kontrolė.

Toliau, insulino antikūnų pagalba arba imunoblokavimo keliu, arba radioimuninės insulino analizės pagalba kultivavimo skysčio filtrate galima aptikti sujungtą baltymą.

3 pavyzdys

Pagal 1 ir 2 pavyzdžiuose aprašytas metodikas, tik panaudojant sintetinį fragmentą (2) su SEQ ID NO:2



gauna atitinkamai plazmidės pKK320 ir pKF2.

Šios plazmidės koduoja sujungtą baltymą, kuris skiriasi nuo aprašyto 1 ir 2 pavyzdžiuose tuo, kad po pirmųjų 7 tandemų aminorūgščių seka asparaginas (vietoj gamtinės aminorūgšties - alanino), o devintoji aminorūgštis tandeme yra prolinas. Taigi, dėl alanino pakeitimo asparaginu įvedamas papildomas teigiamas krūvis į sujungto baltymo balastinę dalį. Netikėtai, gaunama 20-30 % daugiau norimo produkto negu 2 pavyzdyje.

4 pavyzdys

Pagal 1 ir 2 pavyzdžiuose aprašytas metodikas, bet panaudojant sintetinį fragmentą (3) su SEQ ID NO:3

```

          -5                      -1
          Ala Gly Pro Ala Ser Ala
5'      G GCC GGG CCG GCC TCC GCC
3'                CCC GGC CGG AGG CGG
          (XmaIII)

```

```

          5
Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Ala Pro
GAC ACG ACC GTC TCC GAG CCC GCA CCG      3'
CTG TGC TGG CAG AGG CTG GGG CGT GGC TTA A 5'

```

gauna atitinkamai plazmidės pKK320 ir pKF3. Šios plazmidės skiriasi nuo plazmidžių, gautų 1 ir 2 pavyzdžiuose, tuo, kad jos koduoja tandeme pirmąsias 9 gamtines aminorūgštis. Lyginant su 2 pavyzdžiu, išeiga beveik 10 % didesnė.

5 pavyzdys

Sujungtas baltymas, koduotas pKK500, tarp tandeminės dalies ir proinsulino B-grandinės turi linkerinę seką, kuri koduoja aminorūgštis Asn-Ser-Asn-Gly-Lys. Galinį Lys ir sudarantį C-grandinę Lys pakeičia žemiau aprašytu būdu. Tam tikslui proinsulino sekoje kodono B30 iki A1 srityje naudojama vienintelė kirpimo vieta StyI.

Išskirtą DNR-plazmidę pKK500 sukarpo StyI pagalba, išsikišusių galų pašalinimui paveikia S1 nukleaze, kurios perteklių išekstrahuoja fenolio ir chloroformo mišiniu. Gautą linijinę plazmidę vėl karmo EcoRI, elektroforezės būdu atskiria didų fragmentą ir elektroliucijos keliu jį išskiria. Šį fragmentą liguoja su sintetiniu fragmentu (4) (SEQ ID NO:4)

```

          B1                      10
Asn Ser Asn Gly Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
ATT TCG AAC GGC CGC TTC GCT AAC CAG CAC CTG TGC GGCTCG CAC
      GCTTG CCG GCG AAG CAG TTG GTC CTG GAC ACG CCG AGC GTC
(EcoRI)

```

```

          20                      30
Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
CTC GTG GAG GCC CTC TAC CTG GTG TGC GGG GAG CGC GGC TTC TTC
GAG CAC CTC CGG GAG ATG GAC CAC ACG CCC CTC GCG CCG AAG AAG

```

```

          B30 C(B31)
Tyr Thr Pro Lys Thr Arg
TAC ACC CCC AAG ACC CGC
ATG TGG GGG TTC TGG GCG

```

ir po ligavimo mišinį transformuoja į *E.coli*. Pageidaujamus klonus tikrina turimos plazmidės restriktinės analizės būdu ir panaudojama naujai susidariusi SstI kirpimo vieta. Toliau sekvenuojamas visas SphI-SstI-fragmentas.

Koduoto sujungto baltymo ekspresijai fragmentas, ištyrus jo seką, liguojamas į vektorių pIJ 702, sukarpytą tų pačių fermentų ir gaunamas ekspresijos vektorius pGF4.

Koduotą pGF4 ir sekretuotą sujungtą baltymą galima nustatyti, pirma, testo ant plokštelių su α -amilazės inhibitoriumi pagalba (EP-A 0161629, 3 pavyzdys) ir, antra, analogiškai 2 pavyzdžiui, iš auginamos pastoviai purtant kultūros supernatantino skysčio.

6 pavyzdys

Jeigu pagal 5 pavyzdyje aprašytą metodiką fragmentas (4) įvedamas į vektorius pKK510, 520 ir 530, tai gaunami vektoriai pKK610, 620 ir 630. Sujungtus baltymus koduojančios sekos pagalba įmontuoti atitinkamai SphI-SstI-fragmentai į vektorių pIJ 702 duoda ekspresijos vektorius pKF11, 12 ir 13. Sekretuotų sujungtų baltymų ekspresija patikrinama pagal 2 pavyzdį.

7 pavyzdys

Plazmidės pIJ 702 produktų ekspresijos padidinimui, iš jos PstI ir SphI pagalba pašalinamas melanininis promotorius ir pakeičiamas fragmentu (5) (SEQ ID NO:5)

PstI BeII

```

      10      20      30      40      50
CTGCAGTGTATCAGGGGGACCCCTGTGCGAATTTCCGTTACGGGTTTGGGTGGTAGGG
GACGTCATCAGTCCCCCTGGGAACACGCTTAAAGGCAATGCCCAAACCCACCATCCC

```

SphI

```

      60      70      80
ACGCACCCGAAGACGAGGCCCCAGCATGC
TGGGTGGGCTTC TCCTCC GGGGTGCTACG

```

Taip iš sintetinio ir tandeminio promotorių gaunama tandeminė konstrukcija. Plazmidė pavadinta pGR110.

Jeigu į pGR110 po kirpimo su SphI ir SstI įstatomi sintetiniai fragmentai (1), (2) ir (3), gaunami ekspresijos vektoriai pGR200, 210 ir 220. Analogišku būdu fragmento (4) pagalba gaunami ekspresijos vektoriai pGR250, 260 ir 270.

8 pavyzdys

Jeigu tripsino arba panašiai veikiančio fermento ir karboksipeptidazės B kombinacijos keliu iš insulino pirmtakų reikia gauti žmogaus insuliną, tai geriau atskyrimo reakcijos eigoje greitai atskirti balastinę dalį su amino galais, kad būtų paskatinamos skaidymo reakcijos B31 (Arg)-insulino kryptimi. Tam tikslui siūloma aminorūgščių prieš aminorūgštį B1 (Phe) modifikacija.

Pagal 1 pavyzdyje aprašytą metodiką plazmidę pKK500 sukarpo restrikcinių fermentų EcoRI ir DraIII pagalba. Po to pirminį fragmentą fosforamiditiniu metodu pakeičia į sintetinį DNR-fragmentą (6) (SEQ ID NO:6)

	B1															
	Asn	Ser	Ala	Arg	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	
5'	AAT	TCG	GCC	CGC	TTC	GTC	AAC	CAG	CAC	CGT	TGC	GGC	TCG	CAC	CTC	3'
3'		GC	CGG	GCG	AAG	CAG	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGC	GTG	5'	
	(EcoRI) (DraIII)															

Klonavimą *E.coli* ląstelėse ir ekspresiją *Streptomyces lividans* ląstelėse atlieka pagal atitinkamai 1 ir 2 pavyzdžius. Gauna atitinkamai plazmides pKK640 ir pKF14.

Analogiškai galima elgtis su plazmide, kurią gauna pagal 5 pavyzdį (įstačius fragmentą (4)). Taip gaunamos atitinkamai plazmidės pKK650 ir pKF15.

PRIEDAS

(iš EP-A 0367163)

1 lentelė

B1														10	
Asn	Ser	Asn	Gly	Lys	Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	
AATTCG	AAC	GGC	AAG	TTC	GTC	AAC	CAG	CAC	CTG	TGC	GGC	TCG	CAC		
GC	TTG	CCG	TTC	AAG	CAG	TTG	GTC	GTG	GAC	ACG	CCG	AGC	GTG		
(EcoRI)															
20														30	
Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	
CTC	GTG	GAG	GCC	CTC	TAC	CTG	GTG	TGC	GGG	GAG	CGC	GGC	TTC	TTC	
GAG	CAC	CTC	CGG	GAG	ATG	GAC	CAC	ACG	CCC	CTC	GCG	CCG	AAG	AAG	
C Al														40	
Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Lys	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	
TAC	ACC	CCC	AAG	ACC	AAG	GGC	ATC	GTG	GAG	CAG	TGC	TGT	ACG	TCC	
ATG	TGG	GGG	TTC	TGG	TTC	CCG	TAG	CAC	CTC	GTC	ACG	ACA	TGC	AGG	
50															
Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Stp	Stp		
ATC	TGC	TCC	CTC	TAC	CAG	CTC	GAG	AAC	TAC	TGC	AAC	TAG	TAA		
TAG	ACG	AGG	GAG	ATG	GTC	GAG	CTC	TTG	ATG	ACG	TTG	ATC	ATT		
GTC GAC CTG CAG CCA															
CAG CTG GAC CTG GGT TCG A															

SaII (HindIII)

2 lentelė

5'-CGATAAACCGATACAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTTGGAGA
 GCTATTGCGCTATGTTAATTTCCGAGGAAAACCTCGGAAAAAAAAAACCTCT
 TTITCAACGTGGATC
 AAAAGTTGCACCTAG-5'

SEQ ID NO:1

SEKOS TIPAS:

nukleotidas su atitinkamu baltymu

SEKOS ILGIS:

44 bazės

GRANDINĖS FORMA:

dviguba grandinė su išsilaikančia atpažinimo seka

TOPOLOGIJA:

linijinė

FRAGMENTO TIPAS:

vidinis fragmentas

KILMĖ: sintetinė DNR

G GCC GGG CCG GCC TCC GCC GAC ACG ACC GTC TCC GAG CCG
 CCC GCG CGG AGG CGG CTG TGC TGG CAG AGG CTC GGC TTA A
 Ala Gly Pro Ala Ser Ala Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Asn

SEQ ID NO:2
 SEKOS TIPAS: nukleotidas su atitinkamu baltymu
 SEKOS ILGIS: 50 bazių
 GRANDINĖS FORMA: dviguba grandinė su išsilaikančia atpažinimo seka
 TOPOLOGIJA: linijinė
 FRAGMENTO TIPAS: vidinis fragmentas
 KILMĖ: sintetinė DNR

G GCC GGG CCG GCC TCC GCC GAC ACG ACC GTC TCC GAG CCC GAC
 CCC GGC CGG AGG CGG CTG TGC TGG CAG AGG CTC GGG CTG
 Ala Gly Pro Ala Ser Ala Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Asp
 -5 1 5
 CCG TTT A
 GCC
 Pro Asn
 10

SEQ ID NO:3
 SEKOS TIPAS: nukleotidas su atitinkamu baltymu
 SEKOS ILGIS: 50 bazių
 GRANDINĖS FORMA: dviguba grandinė su išsilaikančia atpažinimo seka
 TOPOLOGIJA: linijinė
 FRAGMENTO TIPAS: vidinis fragmentas
 KILMĖ: sintetinė DNR

G GCC GGG CCG GCC TCC GCC GAC ACG ACC GTC TCC GAG CCC GCA
 CCC GGC CGG AGG CGG CTG TGC TGG CAG AGG CTC GGG CGT
 Ala Gly Pro Ala Ser Ala Asp Thr Thr Val Ser Glu Pro Ala
 -5 1 5
 CCG-
 GGC TTA A
 Pro Asn

SEQ ID NO:4
 SEKOS TIPAS: nukleotidas su atitinkamu baltymu
 SEKOS ILGIS: 108 bazės
 GRANDINĖS FORMA: dviguba grandinė su išsilaikančia atpažinimo seka
 TOPOLOGIJA: linijinė
 FRAGMENTO TIPAS: vidinis fragmentas

KILMĖ: sintetinė DNR

ATT TCG AAC GGC CGC TTC GTC AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCG CAC
 GC TTG CCG GCG AAG CAG TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGC GTG
 Asn Ser Asn Gly Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His
 5 10 15

CTC GTG GAG GCC CTC TAC CTG GTG TGC GGG GAG CGC GGC TTC TTC
 GAG CAC CTC CCG GAG ATG GAC CAC AGG CCC CTC GCG CCG AAG AAG
 Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe
 20 25 30

TAC ACC CCC AAG ACC CGC
 ATG TGG GGG TTC TGG GCG
 Tyr Thr Pro Lys Thr Arg
 35

SEQ ID NO:5

SEKOS TIPAS: nukleotidas su
 SEKOS ILGIS: 86 bazėm
 GRANDINĖS FORMA: dviguba grandinė
 TOPOLOGIJA: linijinė
 FRAGMENTO TIPAS: vidinis fragmentas
 KILMĖ: sintetinė DNR

CTGCAGTGAT CAGGGGGACC CTTGTGCGAA TTTCCGTTAC GGGTTTGGGT 50
 GGTAGGGACG CACCCGAAGA GGAGGCCCCA GCATGC 86

SEQ ID NO:6

SEKOS TIPAS: nukleotidas su atitinkamu baltymu
 SEKOS ILGIS: 45 bazės
 GRANDINĖS FORMA: dviguba grandinė su išsilaikančia atpažinimo seka
 TOPOLOGIJA: linijinė
 FRAGMENTO TIPAS: vidinis fragmentas
 KILMĖ: sintetinė DNR

AAT TCG GCC CGC TTC GTC AAC CAG CAC CTG TGC GGC TCG CAC CTC
 GC CCG GCG AAG CAG TTG GTC GTG GAC ACG CCG AGC GTG
 Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu
 5 10 15

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Sujungtų baltymų gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pageidaujamo baltymo struktūrinį geną suriša su signalinės sekos kodonu ir tandemio pirmomis maždaug dešimtimi aminorūgštimis, šią geno struktūrą įveda į streptomicetų ląsteles-šeimininkus ekspresijai ir sekretuotą sujungtą baltymą išskiria iš supernatantinio skysčio, ir tandeminio geno sekos gali būti modifikuotos.

2. Geno struktūros gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad signalinę seką ir ir maždaug dešimt pirmų tandemio kodonų suriša su kito baltymo struktūriniu genu.

3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tandeminėje dalyje praleidžia, pakeičia arba įveda į ją aminorūgščių kodonus.

4. Būdas pagal 2 arba 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tarp tandeminio geno ir pageidaujamo baltymo struktūrinio geno įvesda linkerinę seką.

5. Hibrido gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad geno struktūrą pagal 2, 3 arba 4 punktą įveda į streptomicetinį vektorių.

6. Streptomicetų ląstelių transformavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad į šias ląsteles vektorių įveda pagal 5 punktą.