

(19)



(10) **LT 3988 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **3988**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/09**

(21) Paraiškos numeris: **IP2017**

C07K 13/00

C12P 21/04

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 07 29**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1996 02 26**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 06 25**

(31, 32, 33) Prioritetas: **54, 1992 02 17, LT**

(72) Išradėjas:

**Kęstutis Sasnauskas, LT
Jurgis Lebedys, LT
Rasa Jomantienė, LT
Edita Lebedienė, LT
Eugenijus-Arvydas Janulaitis, LT
Vladas-Algirdas Bumelis, LT
Aurimas Vietrinas, LT
Vladas Gervinskas, LT**

(73) Patento savininkas:

Biotechnologijos institutas "FERMENTAS", V. Graičiūno g. 8, 2028 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J. Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

VKPM Y-1831, VKPM Y-1832, VKPM Y-1833, VNIlgnetika, RU

(54) Pavadinimas:

Rekombinantinės plazmidės pFS19, pFpS2-48 ir pJLFdS1, koduojančios žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų HBsAg, HBpreS2Ag ir HBpreS1Ag sintezę, jų konstravimo būdai ir *Saccharomyces cerevisiae* kamienai FH4C[pFS19], FH4C[pFpS2-48] ir FH4C[pJLFdS 1] - žmogaus hepatito B antigenų producentai

(57) Referatas:

Mielės *Saccharomyces cerevisiae*, produkuojančios didelius kiekius žmogaus hepatito B viruso paviršiaus

antigenų HBsAg, HBpreS2Ag ir HBpreS1Ag, sukonstruotos panaudojant genų inžinerijos metodus. Efektyvi antigenų biosintezė mielėse pasiekta panaudojus hibridinį reguliuojamą mielių promotorių, susidedantį iš genų GAL1 ir PYK1 promotorių dalių. Rekombinantinių plazmidžių stabilumui užtikrinti bei produktyvių kamienų atrankai panaudotas mielių *Candida maltosa* genas, apsprendžiantis atsparumą formaldehidui. Šio geno panaudojimas leidžia auginti rekombinantinius kamienus bet kokios sudėties maitinamosiose terpėse.

Išradimas priklauso biotechnologijos sričiai ir apibrėžia žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų producentų gavimo būdą mielese *Saccharomyces cerevisiae*. Hepatito B viruso antigenai gali būti naudojami efektyvių rekombinantinių vakcinų ir diagnostikų kūrimui.

Dauguma iš žinomų žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų gavimo būdų remiasi rekombinantinių mielių kamienų panaudojimu. Mielės naudojamos nes jose vyksta 22nm dalelių, sudarytų iš imunologiškai aktyvaus baltymo, susidarymas. Šios dalelės analogiškos 22 nm dalelėms aptinkamoms žmonių-hepatito B viruso (HBV) nešiotojų kraujo plazmoje.

Žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų sintezė mielese pasiekama panaudojant rekombinantines plazmides, turinčias efektyvius reguliacijos elementus (reguliuojamus promotorius, transkripcijos terminatorius), o taip pat priklauso nuo recipientinio mielių kamieno.

Patentuose aprašyta visa eilė plazmidžių apsprendžiančių žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų HBsAg, HBpreS1Ag ir HBpreS2Ag sintezę:

Pyk1-6, GAP1-6 ir kt.pagal EP 0164556, tarp.kl.C12N 15/00, 1985;
pHBSEGAP 347/33T ir pHBpreSGAP 347/33T pagal EP 0174444, 1986;
pYGAP/pSSA, pYGAP/pSSC, pYGAL/pSSA, pYGAL/pSSC,
pYADH2/pSSA ir pYADH2/pSSC pagal EP 0244924, 1987;
pGG6, pGG61/Tn-1 ir pGG63 pagal EP 0248410, 1987;
pHBpreSGAP 347/19T ir pYGpreS2S1 pagal EP 0312159, 1989;
pTB05A ir pHB6 pagal EP 0339567, 1989 ir EP 0341746, 1989;
pPHO P31-R, pPHO P31-W, pGLD P31-R ir pPKT P31-R pagal
EP 0401941, 1990.

pYeHBs pagal GB 2104902, 1983; pRIT10673 ir pRIT10674 pagal AU-B-16750/83, 1983; pAH201, pAH203 ir pAH205 pagal SU 1387878, 1988 ir pNMVG 39-54 pagal SU 1380207.

Šių plazmidžių panaudojimas neužtikrina labai efektyvaus HBV paviršinių antigenų sintezės lygio. Be to, patentuose neminima visų trijų baltymų HBSAg, HBpreS1Ag ir HBpreS2Ag, aptinkamų žmonių HBV nešiotojų kraujo plazmos 22nm dalelėse, sintezė.

Artimiausias čia aprašytam žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų gavimo būdui yra EP 0164556, tarp. kl. C 12 N 15/00, 1985 aprašytas Pyk5 plazmidės konstravimo būdas. Pyk5 plazmidė sudaryta iš mielių markerinio geno LEU2, 2mkm *Saccharomyces cerevisiae* plazmidės ori srities, geno, koduojančio atsparumą ampicilinui ir S geno, koduojančio žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigeną, kurio ekspresija reguliuojama hibridiniu GAL 1-10-PYK promotoriumi ir ADH1 transkripcijos terminatoriumi.

Toliau pateikiamas Pyk5 konstravimo būdas. pLGSD5 plazmidė buvo suskaldyta XhoI restriktaze, paveikta Klenovo fermentu, liguoti EcoRI linkeriai (GGAATTC), po to pilnai suskaldyta EcoRI ir Sau3A restriktazėmis ir išskirtas 370 b.p. fragmentas. Šis fragmentas buvo klonuotas pBR322 plazmidėje perskeltoje EcoRI ir BamHI restriktazėmis, gauta plazmidė pBRGAL4. pBRGAL4 plazmidė buvo suskaldyta Sau3A restriktaze, paveikta Klenovo fermentu, liguoti SalI linkeriai (CGTCGACG), po to apdorota SalI ir XhoI restriktazėmis, izoliuotas 370 b.p. fragmentas kuris klonuotas į plot5 plazmidės restriktazės SalI skelimo saitą ir gauta plot 5GAL4/370. Gautą plazmidę perskelė BamHI ir SalI, išskirtą fragmentą klonavo į pC1/1 plazmidę apdorotą BamHI ir SalI ir gavo plazmidę pC1/1GAL4/370. Plazmidę plot5 Pyk5Ag57 perskėlė SalI ir XbaI restriktazėmis, išskyrė fragmentą, turintį geno PYK1 promotorių ir geno 3' 5' galą ir ligavo su XbaI-SalI fragmentu gautu iš plot 5s AgtADH plazmidės ir turinčiam S geno 3' galą ir geno ADH1 transkripcijos terminatorių. Gautą produktą skaldė restriktaze SalI ir klonavo į plazmidės pC1/1GAL4/370 SalI saitą ir gavo Pyk5 plazmidę.

Pagrindinis duotos žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų ekspresijos mielėse *Saccharomyces carlsbergensis*

sistemos trūkumas yra būtinumas naudoti leu2 mutaciją turinčius kamienus ir to pasekoje šių kamienų, turinčių rekombinantinę PYK5 plazmidę, kultivavimui panaudoti minimalias mitybines terpes. Mielių kamienai produkujantys žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenus tokiose terpėse auga lėtai, ląstelių biomasės ir rekombinantinio baltymo išeiga yra maža. Maksimali imunologiškai aktyvaus baltymo HBsAg išeiga apsprendžiama Pyk5 plazmidės sudaro 1,4 mg/g tirpaus baltymo. Maksimalus produktyvumas šioje sistemoje naudojant kitus promotorius sudaro 2,1mg/g.

Mūsų išradimo tikslas yra žmogaus hepatito B viruso paviršinių antigenų HBsAg, HBpreS1Ag ir HBpreS2Ag biosintezės padidinimas mielėse S. cerevisiae.

Viruso antigeninių baltymų biosintezės padidėjimas yra pasiekiamas panaudojant naujas rekombinantines plazmides pFS19, pFpS2-48 ir pJLFdS1, koduojančias HBV paviršiaus antigenų sintezę, ir naujus *S.cerevisiae* kamienus (FH4C[pFS19], FH4C[pFpS2-48] ir FH4C[pJLFdS1]) produkujančius 40-80 mg antigeninio baltymo 1l.kultūros (0,4-0,8% imunologiškai aktyvaus baltymo nuo bendro tirpaus ląstelinio baltymo).

Rekombinantinė plazmidė pFS19, koduojanti HBsAg baltymo sintezę, pasižymi šiomis savybėmis:

- yra 10.4 tūkst.b.p. dydžio,
- sudaryta iš:
 - KpnI-XbaI plazmidės pTZ19R fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir *E.coli* ori sritį;
 - XbaI-BamHI *Candida maltosa* DNR fragmento, turinčio geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehidui;
 - Eco147I-HindII fragmento, turinčio geno GAL1-10 transkripcijos aktyvatorių, PYK1 geno promotorių, žmogaus hepatito viruso S geną, PGK1 geno transkripcijos terminatorių;
 - HindIII-Eco91I 2mkm mielių plazmidės fragmento, turinčio mielių ori sritį;
 - atsparumą formaldehidui koduojančio geno FOR-R, reikalingo transformantų atrinkimui;
 - turi unikalias restriktazių BamHI, BglII ir SalI atpažinimo vietas.

Rekombinantinė plazmidė pFpS2-48, koduojanti žmogaus hepatito B viruso HBpreS2Ag paviršiaus antigeno sintezę, pasižymi šiomis savybėmis:

- yra 10,8 tūkst.b.p. dydžio;
- sudaryta iš:
 - KpnI-XbaI pTZ19R plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui;
 - XbaI-BamHI Candida maltosa DNR fragmento, turinčio geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehidui;
 - NcoI-HindIII fragmento, turinčio GAL1-10 geno transkripcijos aktyvatorių, geno PYK1 promotorių, žmogaus hepatito B viruso preS2 geną ir PGK1 geno transkripcijos terminatorių;
 - HindIII-Eco91I mielių 2mkm plazmidės DNR fragmento, turinčio mielių ori sritį;
- turi atsparumo formaldehidui geną FOR-R, reikalingą transformantų selekcijai;
- turi unikalias restriktazių BamHI, BglII ir SalI atpažinimo vietas.

Rekombinantinė plazmidė pJLFdS1, koduojanti žmogaus hepatito B viruso HBpreS1Ag paviršiaus antigeno sintezę, pasižymi sekančiomis savybėmis:

- yra 11,4 tūkst.b.p. dydžio,
- susideda iš:
 - XbaI-PstI C. maltosa DNR fragmento, turinčio geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehidui;
 - Eco91I-HindIII mielių 2mkm plazmidės fragmento, turinčio mielių ori sritį;
 - HindIII-EcoRI fragmento, turinčio PGK1 geno transkripcijos terminatorių, PYK1 geno promotorių ir žmogaus hepatito B viruso preS1 geną;
 - EcoRI-Bsp68I fragmento, turinčio geno GAL1-10 transkripcijos aktyvatorių, mielių URA3 geną, atsparumo ampicilinui geną ir E.coli ori sritį;
- turi geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehidui;
- turi unikalias restriktazių BamHI ir BglII atpažinimo vietas.

Pagrindinis plazmidžių pFS19, pFpS2-48 ir pJLFdS1 konstravimo principas yra sujungimas vienoje plazmidėje dominantinio, transformantų atrinkimui skirto FOR-R geno kartu

su pre-S1, preS2 arba S genais, kurių ekspresija reguliuojama hibridiniu, galaktoze indukuojamu GAL1-10 - PYK1 promotoriumi ir PGK1 transkripcijos terminatoriumi, bei su 2mkm mielių plazmidės ori sritimi ir E.coli genu, koduojančiu atsparumą ampicilinui. Dominantinio, transformantų selekcijai skirto FOR-R geno klonavimas apima Candida maltosa genų banko gavimą panaudojant bifunkcinį mielių vektorių, mielių *Saccharomyces cerevisiae* transformaciją šiuo genų banku selekcijai naudojant LEU2 markerį, transformantų, galinčių augti terpėje su formaldehidu, selekciją, plazmidžių išskyrimą iš formaldehidui atsparių transformantų, geno FOR-R subklonavimą ir pirminės sekos nustatymą.

Pagrindiniai žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų producentų konstravimo etapai yra šie:

1. Dominantinio, transformantų selekcijai reikalingo geno FOR-R, apsprendžiančio atsparumą formaldehidui, klonavimas.
2. Piruvatkinazę koduojančio PYK1 ir fosfogliceratkinazę koduojančio PGK1 genų klonavimas.
3. Ekspresijos kasetės, sudarytos iš PYK1 ir GAL1-10 genų promotoriaus ir PGK1 geno terminatoriaus konstravimas.
4. Plazmidžių, koduojančių žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų sintezę mielėse konstravimas.
5. *Saccharomyces cerevisiae* kamienų su sumažintu proteolitinio aktyvumu ir superprodukuojančių žmogaus hepatito B viruso paviršinius antigenus paieška.

Naujų *S.cerevisiae* kamienų, žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų superproducentų gavimas pagrįstas laukinio tipo kamienų transformacija pFS19, pFpS2-48 ir pJLFdS1 plazmidėmis, panaudojant FOR-R markerinį geną, po to atrenkant geriausius producentus tarp jų.

Saccharomyces cerevisiae FH4C[pFS19] (BKPM Y1831) kamienui, produkuojančiam žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigeną, būdingi šie požymiai:

Morfologiniai požymiai. Ląstelės ovalios formos.

Kultūros požymiai. Ląstelės gerai auga ant YEPD terpės (2% peptono, 2% gliukozės, 1% mielių ekstrakto, 2% agaro). Auginant ant kietos terpės - lygios baltos kolonijos, kurios ilgiau

laikant tampa raukšlėtomis. Gerai auga skystoje YEPD terpėje, turinčioje 2% peptono, 2% gliukozės ir 1% mielių ekstrakto.

Biologiniai-fiziologiniai požymiai: Ląstelės auga nuo 10°C iki 37 °C temperatūroje, pH optimumas nuo 5.0 iki 6.0.

Anglies šaltiniu naudoja gliukozę, galaktozę.

Azoto šaltiniu - amonio druskas, peptoną, triptoną.

Neįsisavina laktozės, celobiozės, citrinos rūgšties, o-ksilozės, L-arabinozės, D-ribozės, L-ramnozės.

Atsparios formaldehidui iki 10mM konc. Pasižymi sumažintu proteolitinio aktyvumu.

S.cerevisiae FH4C[pFpS2-48] (BKPM Y1833) kamienui, produkuojančiam žmogaus hepatito B viruso HBpreS2Ag baltymą, ir FH4C[pJLFdS1] (BKPM Y1832), produkuojančiam HBpreS1 baltymą, būdingos analogiškos kultūrinės-morfologinės ir fiziologinės-biocheminės savybės.

Fig.1 pavaizduota geno, apsprendžiančio atsparumą formaldehidui, klonavimo schema. Fig.2 - FOR-R geno nukleotidinė seka. Fig.3 pateikta pPT plazmidės, turinčios PYK1 promotorių ir PGK1 geno transkripcijos terminatorių, konstravimo schema. Fig.4 plazmidės p37pS2-2 konstravimo schema. Fig. 5,6,7 - pFpS2-48, pFS19 ir pJLFdS1 plazmidžių, koduojančių žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų sintezę, konstravimo schemas.

Išradimas iliustruojamas šiais pavyzdžiais:

1 pavyzdys. Dominantinio FOR-R geno, reikalingo transformantų selekcijai, klonavimas.

Candida maltosa mielės buvo auginamos iki vėlyvosios logaritminės fazės YEPD terpėje ir iš ląstelių buvo išskirta chromosominė DNR. Chromosominę DNR dalinai restriktavome Sau3A restriktaze ir gautus fragmentus ligavome su pL3 plazmide perskelta BamI restriktaze ir paveikta šarmine fosfataze. Liguota DNR buvo panaudota kompetentinių *Escherichia coli* HB101 kamieno ląstelių transformacijai. Rekombinantinės DNR išskyrimė iš *E. coli* ir tokiu būdu gautu C.maltosa genų banku transformavome *S.cerevisiae* DBY746 (his3 leu2 trp1 ura3). Po transformacijos ląstelės išsėjome ant minimalios terpės, turinčios po 50mg/ml histidino, uracilo ir triptofano. Leu⁺ transformantai buvo pernešti ant pilnavertės YEPD terpės,

turinčios 3-10 mM formaldehido. Atrinkti S.cerevisiae transformantai, augantys ant terpės su formaldehidu. Analizuojant plazmidės, išskirtas iš mielių transformantų, atsparių formaldehidui ir retransformuotų į *E.coli*, buvo pastebėta, kad visos plazmidės turi bendrą Candida maltosa DNR fragmentą. Subklonavimo būdu buvo izoliuotas 3.6 tūkst.b.p. XbaI-BamHI C.maltosa DNR fragmentas, koduojantis atsparumo formaldehidui geną FOR-R (pRA1 plazmidė, Fig.1). BamHI-XbaI fragmentas buvo sekvenuotas ir aptiktas 1 ilgas atviras skaitymo rėmelis, turintis introną ir koduojantis baltymą susidedantį iš 381 amino rūgšties (Fig.2). FOR-R genas, klonuotas gaugiakopijinėse plazmidėse, turinčiose 2mkm mielių DNR ori sritį, apsprendžia transformantų atsparumą 3-10 mM formaldehido ir leidžia transformuoti laukinius S.cerevisiae kamienus.

2 pavyzdys. PGK1 ir PYK1 genų klonavimas.

Norint klonuoti PYK1 (piruvatkinazės) ir PGK1 (fosfogliceratkinazės) genus, S.cerevisiae genų banku, sukonstruotu pL3 plazmidės pagrindu, buvo transformuoti DFY331 (leu2 pgk1) ir Pyk1-5(ade1 leu1 met14 ura3 pyk1-5) S.cerevisiae kamienai ir išsėti ant sintetinių terpių be leucino su gliukoze kaip anglies šaltiniu. Kamienai su mutacijomis pyk1 ir pgk1 negali augti terpėje su gliukoze. Iš išaugusių transformantų buvo išskirtos plazmidinės DNR ir subklonavimo būdu buvo izoliuoti PYK1 ir PGK1 genai (Fig.3 pL3-pyk ir pL3-pgk plazmidės).

3 pavyzdys. Ekspresijos kasetės, susidedančios iš PYK1 promotoriaus ir PGK1 terminatoriaus, konstravimas.

Klonuoti PGK1 ir PYK1 genai panaudoti reguliatorinių elementų šaltiniais konstruojant ekspresijos vektorius. pL3-PGK plazmidę restriktavome BglII ir HindIII restriktazėmis. Išskirtą 0.38 tūkst.b.p. fragmentą, turintį PGK1 geno transkripcijos terminatorių, klonavome į pIC19R plazmidę (March ir kt., Gene, 1984, t32, 481-485p.) perskeltą BglII ir HindIII restriktazėmis. Naujai gautą plazmidę pavadino pPGKT. pL3-PYK plazmidę restriktavome EcoRI ir BglII, išskyrėme 1.0 tūkst.b.p. fragmentą, turintį PYK1 geno promotorių ir ligavome su pPGKT plazmide, perskeltą EcoRI ir BglII restriktazėmis. Gavome pPT

plazmidę (Fig.4). pPT plazmidė turi ekspresijos kasetę susidedančią iš PYK1 geno promotoriaus (EcoRI-XbaI) ir PGK1 transkripcijos terminatoriaus (BglII-HindIII).

4 pavyzdys. pFpS2-48 plazmidės konstravimas.

50 mkg plazmidės pH320 (Пумпен и др. ДАН СССР, 1983, T.271 c.230-235) restriktavome DraI restriktaze (100 vnt.) 200mkl buferio B (10mM tris-HCl, 10mM MgCl, 1mM DTT; pH 7.50) 2val. 37°C, po to restriktazę inaktyvavome inkubuodami 70°C 20min. DNR išsodinome pridėję 2 tūrius etanolio, centrifugavome 3min. 15000 aps/min, DNR ištirpinome 200 mkl ligavimo buferio (50mM tris-HCl, 10mM MgCl, 10 mM DTT; pH 7.5) pridėjome adenozintrifosfato (ATP) 0.01 opt. vnt. BglII linkerių ir 50 vnt. T4 DNR ligazės, ligavome 16 val. 12° temperatūroje.

Gautą DNR mišinį išsodinome etanolio, ištirpinome 200 mkl buferio O (50mM tris-HCl, 10 mM MgCl, 100 mM NaCl, 1mM DTT; pH 7.5) ir paveikėme 50 vnt. BamHI restriktazės ir 100 vnt. BglII restriktazės 2 val. 37° temperatūroje.

Po elektroforezės 1% agarozės gelyje išskyrėme 1.68 tūkst.b.p. dydžio BamHI-BglII fragmentą ir ligavimo buferyje ligavome su 3mkg pIC19R plazmidės, perskeltos BglII restriktaze.

DNR mišiniu po ligavimo transformavome kompetentines E.coli HB101 kamieno ląsteles, transformaciją vykdėme inkubuodami 1 val. 0°C ir 5 min. 42° C temperatūroje. Po to ląstelių mišinį 10 kartu atskiedėme LB terpe (1% triptono, 0.5% mielių ekstrakto, 1% NaCl) ir inkubavome 37° C 1 val., po to išsėjome ant agarizuotos LB terpės su ampicilinu (100 mkg/ml). Tarp transformantų restrikcinės analizės būdu buvo atrinkti klonai, turintys pIC19RS plazmidę. 50mkg pIC19RS plazmidės skaldėme Eco147I restriktaze (100vnt.) 2 val. 37° C 200 mkl buferio B. Gautą reakcijos mišinį veikėme fenolo-chloroformo 1:1 mišiniu, centrifugavome, DNR persodinome etanolio, tirpinome 200 mkl ligavimo buferio su ATP ir pridėjome 0.1 opt.vnt. sintetinio oligonukleotido iš 53 b.p., homologiško 5' preS2 geno galui:

5' CT AGA CAA TGG AAC TCC ACT TTC CAC CAA ACT TTG CAA
3' T GTT ACC TTG AGG TGA AAG GTG GTT TGA AAC GTT

GAC CCA AGA GTT AGA GG-3'
CTG GGT TCT CAA TCT CC-5'

Ligavome 16 val. 12° C temperatūroje. Reakcijos mišinį po ligavimo 20 min. kaitinome 70° C temperatūroje. DNR persodinome etanoliu, ištirpinome 200 ml buferio O, pridėjome 10 vnt. restriktazės BglII ir 200 vnt. restriktazės XbaI ir inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje.

Šį mišinį frakcionavome 1% agarozės gelyje, išskyrėme 0.85 tūkst.b.p. XbaI-BglII fragmentą, kurį ligavome su 3 mkg pP-T plazmidės, perskeltos XbaI ir BglII restriktazėmis.

Po ligavimo gautu mišiniu transformavome E.coli HB101 kamieno kompetentines ląsteles ir išsėjome ant LB terpės su ampicilinu. Atrinkti klonai, turintys plazmidę p37-pS2-1.

50mkg p37-pS2-1 ištirpinome 200 ml buferio G (10mM tris-HCl, 10mM MgCl, 50mM NaCl, 1mM DTT; pH 7.5) pridėjome po 100 vnt. KpnI ir HindIII restriktazių ir inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje. Gautą mišinį frakcionavome 1% agarozės gelyje ir išskyrėme 1.5 tūkst.b.p. KpnI - HindIII fragmentą, kurį ligavome su 3 mkg pTZ19R plazmidės (Pharmacia, Švedija), suskaldytos KpnI - HindIII restriktazėmis.

Gautu mišiniu transformavome E.coli DH5a kamieno kompetentines ląsteles ir išsėjome ant LB terpės su ampicilinu. Tarp transformantų buvo atrinkti klonai, turintys p37-pS2-2 plazmidę (Fig. 4).

50mkg p37-pS2-2 ištirpinome 200 ml buferio R (10mM tris-HCl, 10mM MgCl, 100mM KCl, 1mM DTT; pH 8.5), pridėjome 100 vnt. EcoRI restriktazės ir inkubavome 2val. 37° C temperatūroje. DNR persodinome etanoliu ir ištirpinome 200 ml Klenovo fermento buferio (50 mM tris-HCl, 6 mM MgCl₂ ,1mM merkaptetoetanolio; pH 7.6) pridėjome iki 0.1 mM koncentracijos dezoksinukleotidtrifosfatų, 3 vnt. Klenovo fermento ir inkubavome 30 min. 20° C temperatūroje. Po to reakcijos mišinį 20 min. inkubavome 70° C, DNR persodinome etanoliu, ištirpinome 200 ml buferio R, pridėjome 100 vnt. restriktazės ir inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje.

Gautą mišinį frakcionavome 1% agarozės gelyje ir išskyrėme 1.5 tūkst.b.p. EcoRI-HindIII fragmentą , kurį ligavome su 3mkg YepSec1 plazmidės (Baldari ir kt., EMBO J.,1987, t.6, p 229-234) restriktuotos HindIII ir XhoI restriktazėmis ir paveiktos Klenovo fermentu.

Po ligavimo gautu mišiniu transformavome *E.coli* HB101 kamieno kompetentines ląsteles ir išsėjome ant LB terpės su ampicilinu. Atrinkti klonai, turintys p6pS2 plazmidę.

50 mkg p6pS2 plazmidės ištirpinome 200 ml buferio O, pridėjome po 50 vnt. NcoI ir Eco91I restriktazių ir inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje, po to inaktyvavome fermentus 20min. 70° C. DNR persodinome etanoliu, ištirpinome 200 ml Klenovo fermento buferio, pridėjome dezoksinukleotidtrifosfatų, 3 vnt. Klenovo fermento ir inkubavome 1 val. 20°C temperatūroje. Gautą mišinį frakcionavome agarozės gelyje, išskyrėme 4.3 tūkst.b.p. NcoI-Eco91I fragmentą ir jį ligavome su 3 mkg pRA1 plazmidės, perskeltos SmaI restriktaze.

Po ligavimo gautu mišiniu transformavome *E.coli* HB101 kamieno kompetentines ląsteles ir išsėjome ant LB terpės su ampicilinu. Tarp gautų klonų buvo atrinkti turintys pFpS2-48 plazmidę (Fig. 5).

Plazmidę analizuojame šiuo būdu:

1. Atsparumo ampicilinui geno buvimas įrodomas *E.coli* kamieno, turinčio plazmidę pFpS2-48, sugebėjimų augti agarizuotose terpėse, turinčiose nuo 50 iki 100 mkg/ml ampicilino.
2. Atsparumo formaldehidui geno FOR-R buvimas įrodomas *S.cerevisiae* kamieno, turinčio plazmidę su FOR-R genų, sugebėjimu augti agarizuotose terpėse, turinčiose 3-10 mM formaldehido.
3. Plazmidės pFpS2-48 sugebėjimas koduoti žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigeno HBpreS2Ag sintezę įrodomas transformuojant šia plazmide *S.cerevisiae* FH4C kamieną, atrenkant atsparius formaldehidui transformantus, po to tikrinant antigeno produkciją gautuose transformantuose radioimunologiniu metodu. Duomenys pateikti šio kamieno aprašyme.
4. Skaldant pFpS2-48 plazmidę EcoRI restriktaze gauname 1.0, 4.8 ir 4.9 tūkst.b.p. dydžio fragmentus. Skaldant BamHI ir BglII restriktazėmis - 2.1 ir 8.7 tūkst.b.p. dydžio fragmentus. Skaldant PstI restriktaze - 0.5, 2.2 ir 8.1 tūkst.b.p. dydžio fragmentus.

5 pavyzdys. Plazmidės pFS19 konstravimas.

50 mkg p37pS2-2 plazmidės, gautos kaip aprašyta 4 pavyzdyje, ištirpiname 200 ml buferio R, pridėjome 100 vnt. Hin6I restriktazės, inkubavome 2 val 37° C.

DNR persodinome etanolio, ištirpinome 200 ml Klenovo fermento buferio, pridėjome dezoksinukleotidtrifosfatų, 3 vnt. Klenovo fermento ir 30 min inkubavome 20°C, po to inaktyvavome 20 min. 70° C.

DNR persodinome etanolio, ištirpinome 200 ml buferio O, pridėjome 100 vnt. BglII restriktazės ir inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje.

Po elektroforezės 1% agarozės gelyje išskyrėme 0.68 tūkst. b.p. dydžio fragmentą, kurį ligavome su 3 mkg p6pS2 plazmidės, paeiliui apdorotos XbaI restriktaze, Mung Bean nukleaze ir restriktaze BglII. Naujai gautą plazmidę pavadiname p6-6S.

50 mkg p6-6S plazmidės ištirpinome 200 ml buferio Y (33 mM tris-acetato, 10 mM magnio acetato, 66 mM kalio acetato, 0.5 mM DTT; pH 7.9), pridėjome po 100 vnt. Eco147I ir Eco91I, inkubavome 2 val. 37° C temperatūroje.

DNR išsodinome etanolio ir ištirpinome 200 ml Klenovo fermento buferio, pridėjome nukleotidtrifosfatų, 3 vnt. Klenovo fermento ir inkubavome 30 min. 20° C temperatūroje.

Po elektroforezės išskyrėme 3.9 tūkst.b.p.dydžio Eco147I-Eco91I fragmentą ir ligavome jį su 3 mkg pRA1 plazmidės perskeltos SmaI restriktaze.

Po ligavimo gautu mišiniu transformavome E.coli HB101 kamieno kompetentines ląsteles ir išsėjome ant LB terpės su ampicilinu. Tarp transformantų buvo atrinkti klonai, turintys pFS19 plazmidę (Fig.6).

Plazmidės analizę atliekame 4 pavyzdyje aprašytu būdu.

Skaldant pFS19 plazmidę EcoRI restriktaze gauname 4.9 ir 5.5 tūkst.b.p. dydžio fragmentus. Skaldant BglII ir BamHI restriktazėmis - 1.8 ir 8.6 tūkst.b.p., o skaldant PstI-0.5, 2.2 ir 7.7 tūkst. b.p.

6 pavyzdys. pJLFdS1 plazmidės konstravimas.

50 mkg pHB 320 plazmidės ištirpinome 200 ml buferio G, pridėjome po 100 vnt. BamHI ir XbaI restriktazių ir inkubavome 2 val. prie 37° C.

Po elektroforezės agaroziniame gelyje išskyrėme 0.53 tūkst.b.p. dydžio fragmentą, turintį virusinės DNR preS1 ir preS2 rajonus ir ligavome jį su 3 mkg pTZ19R plazmidės perskeltos BamHI ir XbaI restriktazėmis.

Gautu mišiniu transformavome kompetentines HB101 *E.coli* ląsteles. Tarp transformantų atrinkome klonus, turinčius pTZS1 plazmidę.

0.001 mkg pTZS1 plazmidės ištirpinome 100 mkl amplifikacijos buferio (67 mM tris-HCl, 6.7 mM MgCl, 1 mM merkaptoetanolio, 50 mM KCl, 0.17 mg/ml jaučio serumo albumino; pH 8.8 prie 25° C), pridėjome dezoksinukleotidtrifosfatų iki 0.2 mM koncentracijos, 5 vnt. TaqI DNR polimerazės ir po 0.01 opt.vnt. sintetinių oligonukleotidų 5' -ATGGAGAACATCACATCAG-3' ir 5' - GCCACCAGCAGGGAAATAC-3'.

Su gautu mišiniu atlikome 35 amplifikacijos ciklus (1 min. 95° C, 2 min. 50° C, 3 min. 72° C). Gautą po polimerazinės grandininės reakcijos 3.4 tūkst.b.p. dydžio fragmentą apdorojome fenolo-chloroformo mišiniu ir persodinome etanolio.

DNR ištirpinome 200 mkl ligavimo buferio, pridėjome ATP, 5 vnt. T4 fago polinukleotidkinazės ir 50 vnt. T4 fago DNR ligazės. Gautą mišinį inkubavome 1 val. prie 37° C. Gautu mišiniu transformavome HB101 *E.coli* ir tarp transformantų atrinkome turinčius pTZdS1 plazmidę.

50 mkg pTZdS1 plazmidės ištirpinome 200 mkl buferio R, pridėjome po 100 vnt. BamHI ir EcoRI restriktazių ir inkubavome 2 val 37° C temperatūroje. Gautą mišinį apdorojome fenolo-chloroformo mišiniu ir DNR persodinome etanolio.

10 mkg pTZdS1 plazmidės, suskaldytos BamHI ir EcoRI restriktazėmis ištirpinome 100 mkl ligavimo buferio, pridėjome ATP, 0.01 opt. vnt. sintetinio DNR fragmento, turinčio preS1 geno 5' dalį:

```

5' -AA TTC TCT AGA GGT CAA AAC TTA TCT ACC TCT AAC CCA
3' -      G AGT TCT CCA GTT TTG AAT AGA TGG AGA TTG GGT
TTA GGT TTC TTC CCA CAC CAC CAA TTG          - 3'
AAT CCA AAG AAG GGT GTG GTG GTT AAC CTAG - 5'
    
```

50 vnt. T4 fago DNR ligazės inkubavome 16 val. 12° C. Gautu mišiniu transformavome HB101 *E.coli* ir atrinkome klonus, turinčius pdS1s plazmidę.

50 mkg pds1s plazmidės ištirpinome 200 mkl buferio Y, pridėjome 100 vnt. XbaI restriktazės ir inkubavome 2 val 37°C temperatūroje.

Po elektroforezės 1% agarozės gelyje išskyreme 0.49 tūkst.b.p. dydžio XbaI-XbaI DNR fragmentą ir ligavome jį su 8.9 tūkst.b.p. dydžio fragmentu, gautu iš p6-pS2 plazmidės, suskaldytos XbaI restriktaze.

Gautu mišiniu transformavome HB101 E.coli ir tarp transformantų atrinkome turinčius pJLdS1 plazmidę.

50 mkg pJLdS1 plazmidės ištirpinome 200 mkl buferio O, pridėjome po 100 vnt. Bsp68I ir Eco91I restriktazių ir inkubavome 2 val. 37° C. DNR persodinome etanolio, ištirpinome 200 mkl Klenovo fermento buferio, pridėjome NTP, 3 vnt. Klenovo fermento ir inkubavome 30 min. 20° C. DNR persodinome etanolio, ištirpinome 100 mkl ligavimo buferio su ATP, pridėjome 50 vnt. T4 fago DNR ligazės ir ligavome su 2.2 tūkst.b.p. dydžio XbaI - PstI pRAI plazmidės fragmentu, apdorotu Mung Bean nukleaze. Gautu mišiniu transformavome HB101 E.coli ir tarp transformantų atrinkome turinčius pJLFdS1 plazmidę (Fig.7).

pJLFdS1 plazmidės analizė atliekama kaip nurodyta 4 pavyzdyje.

URA3 markerinio geno buvimas įrodomas šios plazmidės sugebėjimu kompensuoti ura3 mutaciją.

Skaldant pJLFdS1 plazmidę EcoRI restriktaze gauname 3.8 ir 7.6 tūkst.b.p. dydžio DNR fragmentus. Skaldant BglII ir BamHI restriktazėmis gauname 1.0 ir 10.4 tūkst.b.p. dydžio DNR fragmentus. Skaldant HindIII restriktaze - 0.25, 0.35, 2.0, ir 8.8 tūkst.b.p. dydžio fragmentus.

Siekiant padidinti HBsAg, HBpreS2Ag antigeninių baltymų produkciją buvo patikrintas didelis skaičius laukinio tipo S.cerevisiae kamienų. Pasirodė, kad geriausiu produktyvumu pasižymi greitai augantys, poliploidiniai kamieniai, turintys sumažintą proteolitinį aktyvumą (1 lentelė). Tolimesniam darbui buvo pasirinktas FH4C kamienas.

1 lentelė

<u>S.cerevisiae</u> mielių kamienai (pFS19)	HBsAg kiekis (sutart. vnt.) 1*	Proteolitinis aktyvumas (sutart. vnt.) 2*
DBY746 (D.Botstein)	1.0	2.75
DC5 (J.Hicks)	1.5	2.60
a3-41 pep4-1 (E.Jones)	4.2	1.35
FH4C (O.Lampen)	10.0	1.0
VIL-2N2 (Taik.enz.inst.)	3.0	2.5
7A(12)	2.5	2.8
7A(16)322	2.7	2.8
15B П 4	2.3	2.7
442 K2	10.0	1.2
P6	4.2	2.0
P67 K252	3.8	2.7

1* nustatyta radioimunologiniu metodu

2* nustatyta, naudojant substraktą HBsAg žymėtą I¹²⁵

7 pavyzdys. S.cerevisiae FH4C[pFS19] (БКПМ Y1831) kamieno gavimas ir jo produktyvumo nustatymas.

pFS19 plazmide transformavome S.cerevisiae FH4C kamieną pasinaudodami Ito metodu (Ito ir kt., J.Bacteriol., 1983, T 153 p.163-168).

FH4C[pFS19] kamieno ląsteles auginome 30° C temperatūroje 100 ml YEPD terpės 24 val. kratyklėje 200 aps/min. Po 24 val. pridėjome 4% galaktozės ir toliau auginome ląsteles 8-12 val. analogiškose sąlygose. Po 8-12 val. buvo imami ir analizuojami mėginiai.

1 ml ląstelių kultūros centrifugavome 10 min. 3000 aps/min, ląsteles suspendavome 1 ml buferio (0.05 M Na-fosfatinio buferio, 0.05% Tritono X-100, pH 7.2), pridėjome 1 g 0.5 mM dydžio stiklinių šratų ir ardėme 4 min., periodiškai šaldydami lede, po to centrifugavome 10 min. 3000 aps/min.

Žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigeno HBsAg kiekio nustatymą atlikome radioimunologiniu metodu, panaudodami rinkinius HBsAg nustatymui ("Radiopreparat", ИЯФ УЗССР) Standartinius preparatus, gautus iš Medicininės kontrolės

instituto, naudojome kalibracinei kreivei gauti. Duomenys pateikti 2 lentelėje.

8,9 pavyzdžiai. S.cerevisiae FH4C[pFpS2-48](BKPM Y1833) ir S. cerevisiae FH4C[pJLFdS1] (BKPM Y1832) buvo gauti ir patikrinti analogiškai 7 pavyzdžiui, tik transformacijai buvo panaudotos pFpS2-48 ir pJLFdS1 plazmidės. Duomenys pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Paviršiaus antigeninių baltymų HBsAg, HBpreS1Ag ir HBpreS2Ag ekspresijos lygis mielėse (nurodytas % rodo imunologiškai aktyvaus baltymo kiekį lyginant su visu tirpiu baltymu).

Sistema	HBpreS1Ag	HBpreS2Ag	HBsAg
<u>S. cerevisiae</u> pagal patentą EP 0164556			0.2%
<u>S. cerevisiae</u> EP 0174444		0.18%	0.067%
<u>S. cerevisiae</u> EP 0248410	HBpreS1Ag+HBpreS2Ag 0.36 mkg/ml	0.69 mkg/ml	
<u>P.pastoris</u> EP 0339567		9-60 mkg/ml 0.11-0.63%	
<u>P. pastoris</u> EP 0339567		HBpreS2+HBsAg 1%	
<u>S. cerevisiae</u> EP 0401941		2.4 mkg/ml	
Pareikšta sistema	0.5-0.8% 50-90 mkg/ml	0.7-1.3% 80-160 mkg/ml	0.7-1.3% 80-160 mkg/ml

Iš 2 lentelės matome, kad pareikšta išradimų grupė pagal žmogaus hepatito B viruso paviršiaus antigenų išėigą procentais nuo bendro ląstelinio baltymo viršija žinomus analogus S. cerevisiae mielėse iki 20 kartų, o pagal išėigą iš 1 l kultūros - iki 100 kartų. Pagal antigenų sintezės produktyvumą duota sistema nežymiai viršija efektyviausią iš dabar žinomų - Pichia pastoris sistemą. S. cerevisiae mielės yra patogios, nes seniai naudojamos maisto pramonėje, neturi toksinų bei pirogeninių medžiagų.

Didelė antigenų išeiga pareikštoje sistemoje pasiekama panaudojant indukuojamą hibridinį GAL1-10-PYK1 promotorių, PGK1 geno transkripcijos terminatorių ir dominantinį geną FOR-R, leidžiantį vykdyti laukinių S. cerevisiae kamienų su padidintu antigenų produktyvumu selekciją. Dominantinio geno panaudojimas leidžia panaudoti laukinio tipo kamienus, kurių kultivavimui galima naudoti pilnas, pigias terpes, tai yra svarbus pranašumas vykdant pramoninį mielių auginimą.

Pilnų terpių panaudojimas padidina biomasės išeigą iš to paties kultūrinio skysčio tūrio, be to sutrumpina fermentacijos laiką, nes sutrumpina mielių ląstelių generacijos laiką.

Mielių FH4C kamieno su sumažintu proteolitinio aktyvumu panaudojimas sumažina heterologinių baltymų degradaciją, tai palengvina natyvių hepatito B viruso antigenų valymą. Dominantinio geno panaudojimas leidžia vykdyti kamienų su padidintu heterologinio baltymo produktyvumu atranką.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Rekombinantinė pFS19 plazmidė, koduojanti žmogaus hepatito B viruso paviršiaus S antigeno sintezę, yra 10.4 tūkst.b.p. dydžio ir sudaryta iš sekančių elementų:

KpnI-XbaI 2.9 tūkst.b.p. dydžio pTZ19R plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir E.coli ori sritį;

XbaI-BamHI 3.6 tūkst.b.p. dydžio C. maltosa DNR fragmento, turinčio geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehydai (dominantinis genas);

Eco147I-HindIII 2.16 tūkst.b.p. dydžio fragmento, turinčio GAL 1-10 transkripcijos aktyvatorių, piruvatkinazės PYK1 geno promotorių, žmogaus hepatito B viruso S geną, fosfogliceratkinazės PGK1 geno transkripcijos terminatorių;

HindIII-Eco91I 1.74 tūkst.b.p. dydžio mielių 2 mkm plazmidės fragmento, turinčio ori sritį.

2. Rekombinantinė pFpS2-48 plazmidė, koduojanti žmogaus hepatito B paviršinio preS2 antigeno sintezę, yra 10.8 tūkst.b.p. dydžio ir susideda iš sekančių elementų:

KpnI-XbaI 2.9 tūkst.b.p. dydžio pTZ19R plazmidės fragmento, turinčio geną, apsprendžiantį atsparumą ampicilinui ir E.coli ori sritį;

XbaI-BamHI 3.6 tūkst.b.p. dydžio C. maltosa DNR fragmento, turinčio geną FOR-R, apsprendžiantį atsparumą formaldehydai (dominantinis genas);

NcoI-HindIII 2.56 tūkst.b.p. dydžio fragmento, turinčio GAL 1-10 transkripcijos aktyvatorių, piruvatkinazės PYK1 geno promotorių, žmogaus hepatito B viruso preS2 geną, fosfogliceratkinazės PGK1 geno transkripcijos terminatorių;

HindIII-Eco91I 1.74 tūkst.b.p. dydžio mielių 2 mkm plazmidės fragmento, turinčio mielių ori sritį.

3. Rekombinantinė pJLFdS1 plazmidė, koduojanti žmogaus hepatito B paviršiaus preS1 antigeno sintezę, yra 11.4 tūkst.b.p. dydžio ir susideda iš sekančių elementų:

XbaI-PstI 2.2 tūkst.b.p. dydžio C.maltosa DNR fragmento, turinčio FOR-R geną, apsprendžiantį atsparumą formaldehidui (dominantinis genas);

HindIII-Eco91I 1.74 tūkst.b.p.dydžio mielių 2 mkm plazmidės fragmento, turinčio mielių ori sritį;

HindIII-EcoRI 1.74 tūkst.b.p. dydžio fragmento, turinčio piruvatkinazės PYK1 geno promotorių, žmogaus hepatito B viruso preS1 geną, fosfogliceratkinazės PGK1 geno transkripcijos terminatorių;

EcoRI-Bsp68I 5.63 tūkst.b.p. dydžio fragmento, turinčio GAL 1-10 transkripcijos aktyvatorių, mielių URA3 geną, atsparumo ampicilinui geną ir E.coli ori sritį.

4. Plazmidžių pFS19, pFpS2-48 ir pJLFdS1, koduojančių paviršinių antigenų HBsAg, HBpreS2Ag ir HBpreS1Ag sintezę, konstravimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima dominantinio geno FOR-R sujungimą vienoje plazmidėje su S, preS2 arba preS1 genais, kurių ekspresija reguliuojama hibridinio, galaktoze indukuojamo GAL1-10-PYK1 promotoriaus ir PGK1 transkripcijos terminatoriaus, o taip pat su mielių 2 mkm plazmidės fragmentu, turinčiu mielių ori sritį, bei atsparumo ampicilinui genu ir E.coli ori sritimi, o dominantinio geno FOR-R klonavimas apima Candida maltosa genų banko konstravimą panaudojant bifunkcinį mielių vektorių, transformaciją į Saccharomyces cerevisiae ir transformantų, komplementuojančių leu2 mutaciją, parinkimą, transformantų, galinčių augti ant terpių su formaldehidu, atranką, plazmidžių išskyrimą iš šių transformantų, FOR-R geno subklonavimą ir jo pirminės sekos nustatymą.

5. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad konstruojant pFpS2-48 plazmidę, pHB320 plazmidę skaldo DraI restriktaze, liguoja BglII linkerius, skaldo BglII ir BamHI restriktazėmis, išskirtą 1.68 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su pIC19R plazmide, suskaldyta BglII restriktaze, gautą pIC19RS plazmidę skaldo Eco147I restriktaze ir prijungia sintetinį oligonukleotidą

```

5' CT AGA CAA TGG AAC TCC ACT TTC CAC CAA ACT TTG CAA
3'      T GTT ACC TTG AGG TGA AAG GTG GTT TGA AAC GTT
      GAC CCA AGA GTT AGA GG -3'
      CTG GGT TCT CAA TCT CC -5' ,

```

po to skaldo XbaI ir BglII restriktazėmis, izoliuotą 0.85 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su pP-T plazmide, perskelta XbaI ir BglII restriktazėmis, gautą p37-pS2-1 plazmidę skaldo KpnI ir HindIII restriktazėmis ir izoliuoja fragmentą, turintį PYK1 geno promotorių, preS2 geną ir PGK1 terminatorių, kurį klonuoja į pTZ19R plazmidę, suskaldytą KpnI ir Hind III restriktazėmis; gautą p37pS2-2 plazmidę skaldo EcoRI restriktaze, veikia Klenovo fermentu ir skaldo HindIII restriktaze, o gautą 1.51 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su YepSec1 plazmidės fragmentu, gautu paeiliui apdorojant XhoI restriktaze, Klenovo fermentu ir HindIII restriktaze, po to gautą p6pS2 plazmidę skaldo NcoI ir Eco91I restriktazėmis, paveikia Klenovo fermentu, išskiria 4.3 tūkst.b.p. dydžio DNR fragmentą ir liguoja su pRA1 plazmide, suskaldyta SmaI restriktaze.

6. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad konstruojant pFS19 plazmidę, pHB320 plazmidę skaldo DraI restriktaze, liguoja BglII linkerius, skaldo BglII ir BamHI restriktazėmis, išskirtą 1.68 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su pIC19R plazmide, suskaldyta BglII restriktaze, gautą pIC19RS plazmidę skaldo Eco147I restriktaze ir prijungia sintetinį oligonukleotidą

```

5' CT AGA CAA TGG AAC TCC ACT TTC CAC CAA ACT TTG CAA
3'      T GTT ACC TTG AGG TGA AAG GTG GTT TGA AAC GTT
      GAC CCA AGA GTT AGA GG -3'
      CTG GGT TCT CAA TCT CC -5' ,

```

po to skaldo XbaI ir BglII restriktazėmis, izoliuotą 0.85 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su pP-T plazmide, perskelta XbaI ir BglII restriktazėmis, gautą p37-pS2-1 plazmidę skaldo KpnI ir HindIII restriktazėmis ir

izoluoja fragmentą, turintį PYK1 geno promotorių, preS2 geną ir PGK1 terminatorių, kurį klonuoja į pTZ19R plazmidę, suskaldytą KpnI ir HindIII restriktazėmis; gautą p37pS2-2 plazmidę skaldo EcoRI restriktaze, veikia Klenovo fermentu ir skaldo HindIII restriktaze, o gautą 1.51 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su YepSec1 plazmidės fragmentu, gautu paeiliui apdorojant XhoI restriktaze, Klenovo fermentu ir HindIII restriktaze, po to gautą p6pS2 plazmidę paveikia XbaI restriktaze, Mung Bean nukleaze ir BglII restriktaze, liguoja su 0.68 tūkst.b.p. fragmentu, išskirtu iš p37pS2-2 plazmidės, paveikus ją Hin6I restriktaze, Klenovo fermentu ir BglII restriktaze; gautą p6-6S plazmidę skaldo Eco147I, Eco91I restriktazėmis, veikia Klenovo fermentu, išskiria 3.9 tūkst.b.p. dydžio fragmentą, kurį liguoja su pRA1 plazmide, suskaldytą SmaI restriktaze.

7. Būdas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad siekiant sukonstruoti pJLFDs1 plazmidę, pHB320 plazmidę skaldo BamHI ir XbaI restriktazėmis, išskirtą 0.53 tūkst.b.p. dydžio fragmentą liguoja su pTZ19R plazmide, suskaldytą BamHI ir XbaI restriktazėmis, gautą pTZS1 plazmidę panaudoja matricos vietoje polimerazinėje grandininėje reakcijoje, šioje reakcijoje pradmenimis naudojant 2 sintetinius nukleotidus

5' -ATGGAGAACATCACATCAG-3' ir 5'-GCCACCAGCAGGGAAATAC-3';

šios reakcijos produktą - 3.4 tūkst.b.p. dydžio DNR fragmentą paveikia polinukleotidkinaze ir ligaze, gautą pTZdS1 plazmidę skaldo BamHI ir EcoRI restriktazėmis ir liguoja su sintetiniu DNR fragmentu, koduojančiu 5' preS1 geno dalį,

5'-AA TTC TCT AGA GGT CAA AAC TTA TCT ACC TCT AAC CCA
3'- G AGT TCT CCA GTT TTG AAT AGA TGG AGA TTG GGT

TTA GGT TTC TTC CCA CAC CAC CAA TTG -3'
AAT CCA AAG AAG GGT GTG GTG GTT AAC CTAG-5' ,

gautą pds1s plazmidę skaldo XbaI restriktaze, izoluoja 0.49 tūkst.b.p. dydžio XbaI-XbaI fragmentą, kurį liguoja

su 8.9 tūkst.b.p. dydžio DNR fragmentu, gautu suskaldžius p6pS2 plazmidę XbaI restriktaze; gautą pJLdS1 plazmidę skaldo Bsp68I ir Eco91I restriktazėmis, veikia Klenovo fermentu ir liguoja su 2.2 tūkst.b.p. dydžio XbaI-PstI pRA1 plazmidės fragmentu, paveiktu Mung Bean nukleaze.

8. Saccharomyces cerevisiae FH4C[pFS19] (BKПМ Y1831) kamienas - žmogaus hepatito B viruso paviršiaus S antigeno producentas.

9. Saccharomyces cerevisiae FH4C[pFpS2-48] (BKПМ Y1833) kamienas - žmogaus hepatito B viruso paviršiaus preS2 antigeno producentas.

10. Saccharomyces cerevisiae FH4C[pJLFdS1] (BKПМ Y1832) kamienas - žmogaus hepatito B viruso paviršiaus preS1 antigeno producentas.

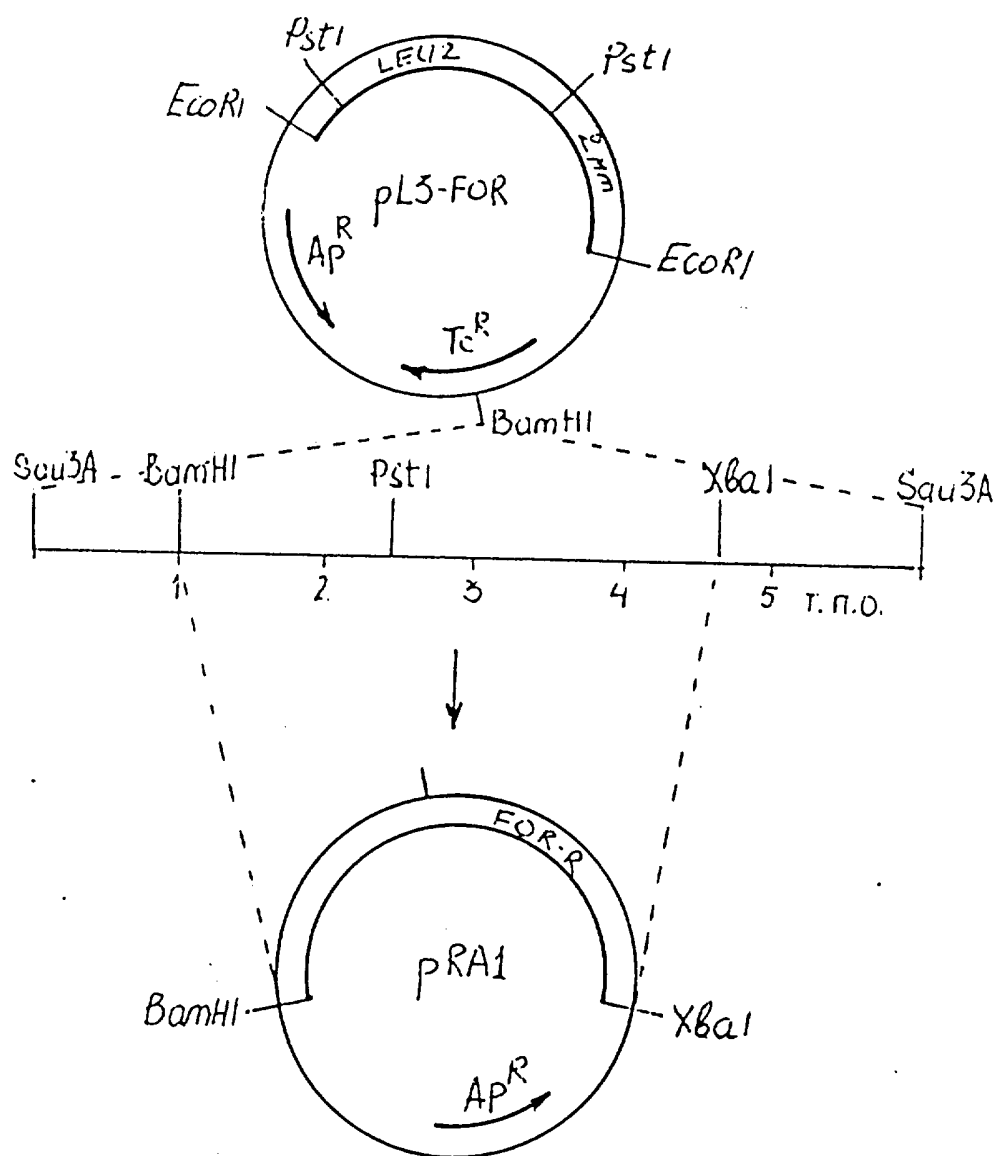


Fig. 1

LT 3988 B

AGAAAGAAAAAGAAAAAGCAAGCGATAGTCAACACAAAGAGAATATCTGAGTTTAAAGTGT	60
GTCAACGTTACATCAAAATAGAGAATTAGTAATCAAGATAGAACCAATACTTTTCTAAAC	120
AATATTGCGGGTGAGATACTTCGTGATTATATGAGTTTAAAGCGATAAGTTTCCGCGCTAT	180
TTGTGATACCTAATFATTAAGCATGGTCAAAATTATGCGAAACTAAAAAAAAAAAAACGTG	240
AGTAAGCCGTAAAGATGAGGCCTAATCGGGTAACCAATTCCCTGCAACGTTTCAGCGCGAG	300
AAACAAAGAAGTTCATGAACTGATAGAACGAAGAAAAAAAAAAAAAAGATTATAAAA	360
ACCAAATCAACTCCTTCTTCTTTTTCATTTTCTAGTCTTACCATTGATTAATTAECTT	420
ACTTACTTATTTTATCAATTGTTACTATAATAATGTCTGAATCAACTGTTGGAAAAGTAT	480
MetSerGluSerThrValGlyLys	8
GTAAGTCAATTCATTTATCCCTCTTTTTCATTTTGTCTTTCTTAATTGAAATTGGA	540
AAATGATTTTCAATTGGTGGAGAAAATTGTTAATTTTTTTTTTTTTTTTGAAAAAAGGGA	600
AATTTTCATCATATTTTATACCCACACACCATGAGCAATTCGAAAATCACCTAGTGGTT	660
AAAACATAAACTCAAAAAAAAAAGAAATTATGTTTCATTTTACTAACTTTACTCAGCCAATTA	720
ProIleT	10
CCTGTAAAGCCGCTGTTGCTTGCAGAGCTGCTAAACCATTATCCATTGAAGATGTCACTG	780
hrCysLysAlaAlaValAlaTyrGluAlaAlaLysProLeuSerIleGluAspValThrV	30
TTGCTCCACCAAACGTCATGAAGTCCGTATCAAACCTTTATGACACTGGTGGTTTGTACA	840
alAlaProProLysArgHisGluValArgIleLysLeuTyrAspThrGlyValCysHist	50
CTGATGCTTACACTTTAAGTGCGGGTTGATCCAGAAGGTGCTTTCCAGTTATTTTGGGAC	900
hrAspAlaTyrThrLeuSerGlyValAspProGluGlyAlaPheProValIleLeuGlyH	70
ATGAAGGTGCCGGTATTGTGCGAAAGTATTGGTGAAGGTGTCACCAATGTTAAAGTTGGTG	960
isGluGlyAlaGlyIleValGluSerIleGlyGluGlyValThrAsnValLysValGlyA	90
ACCATGTCATTGCCTTGTATACCCAGAATGTGGTGAATGTAAATTCTGTAAATCTGGTA	1020
spHisValIleAlaLeuTyrThrProGluCysGlyGluCysLysPheCysLysSerGlyL	110
AAACCAACTTGTGTGGTAAAAATTAGAGCTACCCAAGGTAAAGGTGTTATGCCAGATGGTA	1080
ysThrAsnLeuCysGlyLysIleArgAlaThrGlnGlyLysGlyValMetProAspGlyT	130
CTTCAAGATTTACATGCAAAGGTAAAGAAATTCTCCACTTTATGGGTGTTTCCACTTTCT	1140
hrSerArgPheThrCysLysGlyLysGluIleLeuHisPheMetGlyCysSerThrPheS	150
CCCAATATACTGTTGTTGCTGACATTTCTGTTGTTGCCATCAATCCAAAAGCTGAATTTG	1200
erGlnTyrThrValValAlaAspIleSerValValAlaIleAsnProLysAlaGluPheA	170
ACAAAGCTTGTGTTGTTAGGTTGTGGTATTACTACTGGTTATGGTGCCGCCACCATCACCG	1260
spLysAlaCysLeuLeuGlyCysGlyIleThrThrGlyTyrGlyAlaAlaThrIleThrA	190

Fig. 2

CCAACGTTCAAAAAGGTGACAACGTTGCTGTTTTTCGGTGGTGGTATTTCTGGGTTATCCG	1320
laAsnValGlnLysGlyAspAsnValAlaValPheGlyGlyGlyIleValGlyLeuSerV	210
TCATTCAAGGTTGTGCTGAAAGAGGAGCTGCTCAAATCATTTTAGTTGATATCAGTGACA	1380
alIleGlnGlyCysAlaGluArgGlyAlaAlaGlnIleIleIleuValAspIleSerAspL	230
AGAAAGAAGAATGGGGTCAAAAACCTTGGTGCCACTGCCTTTGTTAACCCAACCAAATTAC	1440
ysLysGluGluTrpGlyGlnLysLeuGlyAlaThrAlaPheValAsnProThrLysLeuP	250
CAGAAGGTACCACTATTGTGCGATAAATTGATTGAAATGACCGATGGTGGTTGTGATTTC	1500
roGluGlyThrThrIleValAspLysLeuIleGluMetThrAspGlyGlyCysAspPheT	270
CTTTTGATTGTACCGCTAATGTTGGGGTTATGAGAAACGCTTTGGAAGCTTGTCAATAAG	1560
hrPheAspCysThrGlyAsnValGlyValMetArgAsnAlaLeuGluAlaCysHisLysG	290
GTTGGGGTACTTCCGTCATTATTGGTGTGCTGCAGCTGGTAAAGAAATTTCCACCAGAC	1620
lyTrpGlyThrSerValIleIleGlyValAlaAlaAlaGlyLysGluIleSerThrArgP	310
CATTCCAATTGGTTACCGGTAGAACTTGGAAAGGAGCTGCTTTCGGTGGTGTAAAGGTA	1680
roPheGlnLeuValThrGlyArgThrTrpLysGlyAlaAlaPheGlyGlyValLysGlyA	330
GATCCCAATTACCAGGAATTGTTAACAATTACTTGGATGGTAAATTGAAGGTTGAAGAAT	1740
rgSerGlnLeuProGlyIleValAsnAsnTyrLeuAspGlyLysLeuLysValGluGluP	350
TCATTACCCACAGAGAACCTTTGGCAGCCATTAACAAAGCTTTTGAAGAAATGCATGCTG	1800
heIleThrHisArgGluProLeuAlaAlaIleAsnLysAlaPheGluGluMetHisAlaG	370
GTGATTGTATCAGAGCTGTTGTTGACTTGTTCATGACTAGACAGCAAACCTTTAAGTTGTTT	1860
lyAspCysIleArgAlaValValAspLeuSerEnd	381
GTTTGTTCGTTTGTAAATTAAAGATACGTATATATTATCTATTATTATAACCTTCAAATAAA	1920
AAATAAAATAAAAAATGGATTACTAAAAATTCTATTCAATTATCTGAATCTGTCACTAATT	1980
CTGCAGCTGATGGAATATCTACATCTTCATCGTCTTCGTCTTCGTCTTCATCGTCTTCTT	2040
CACCTTCTTCATAGTCATCGACACCATCCATGATTTCATCTTCATCATCGTCGCTGATAA	2100
CACCAATATACTGAGCATCGTCAAGTTCTTCGATATATTCCACGTCACCTTCCTTCTTCCA	2160
CATATTTCATCTTCAACATCATCTTCAACGAAAATTTCAATTCTTCAAATCAGTATTATCAT	2220
TAAGTAAATTCAATCTACCTTGTAATTCCAATAACCTT	2258

Fig. 2 (tesinys)

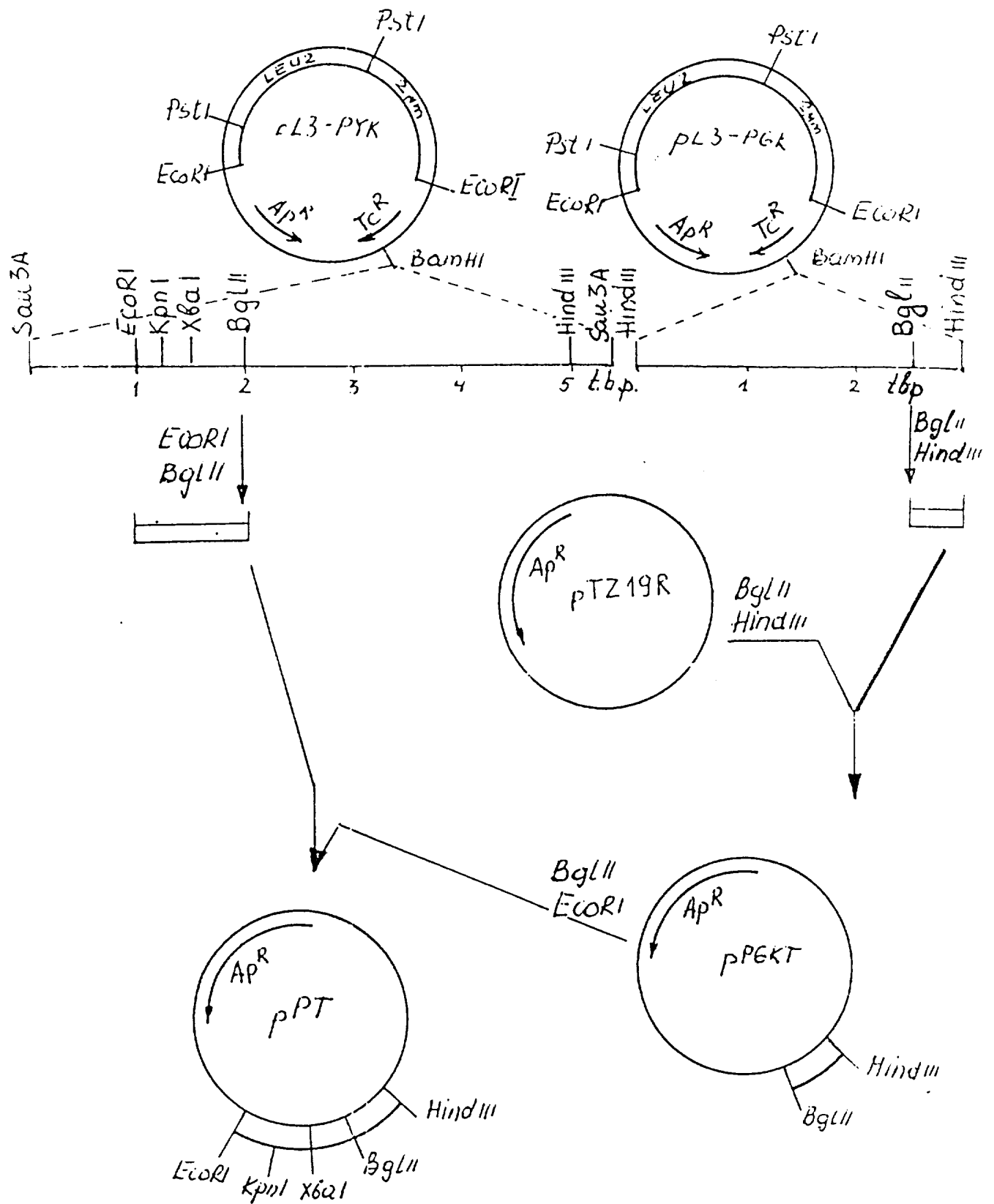


Fig.3

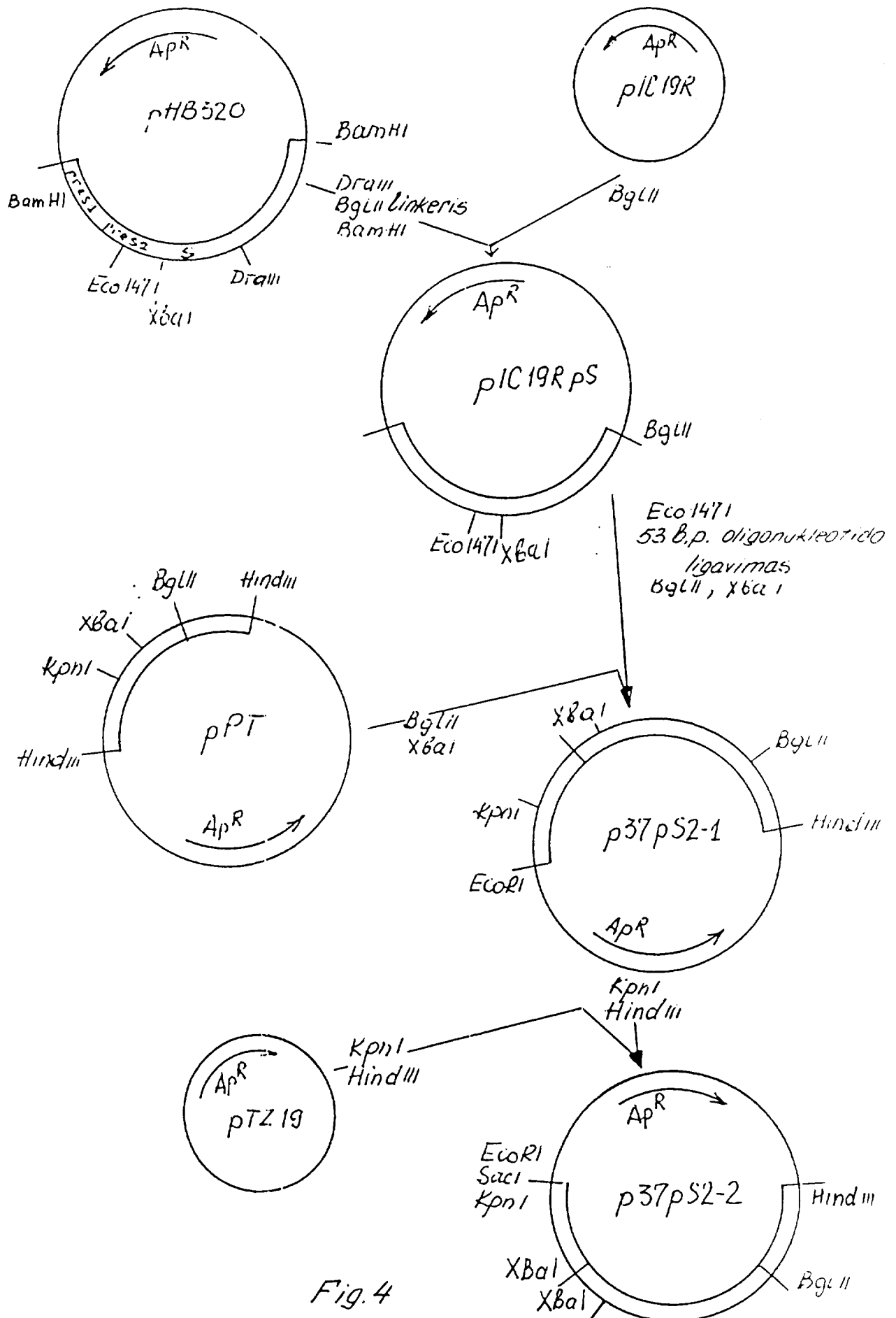


Fig. 4

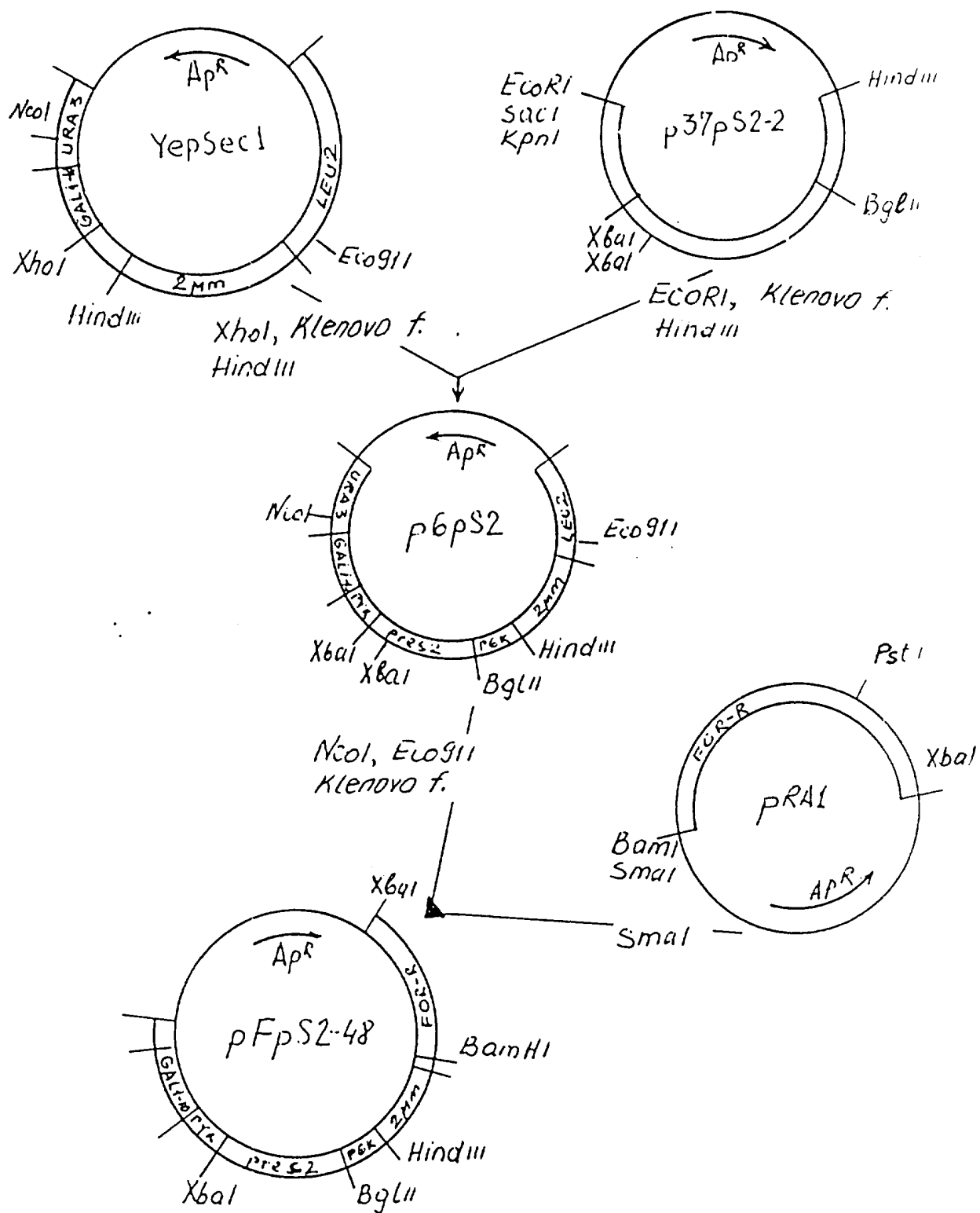


Fig. 5

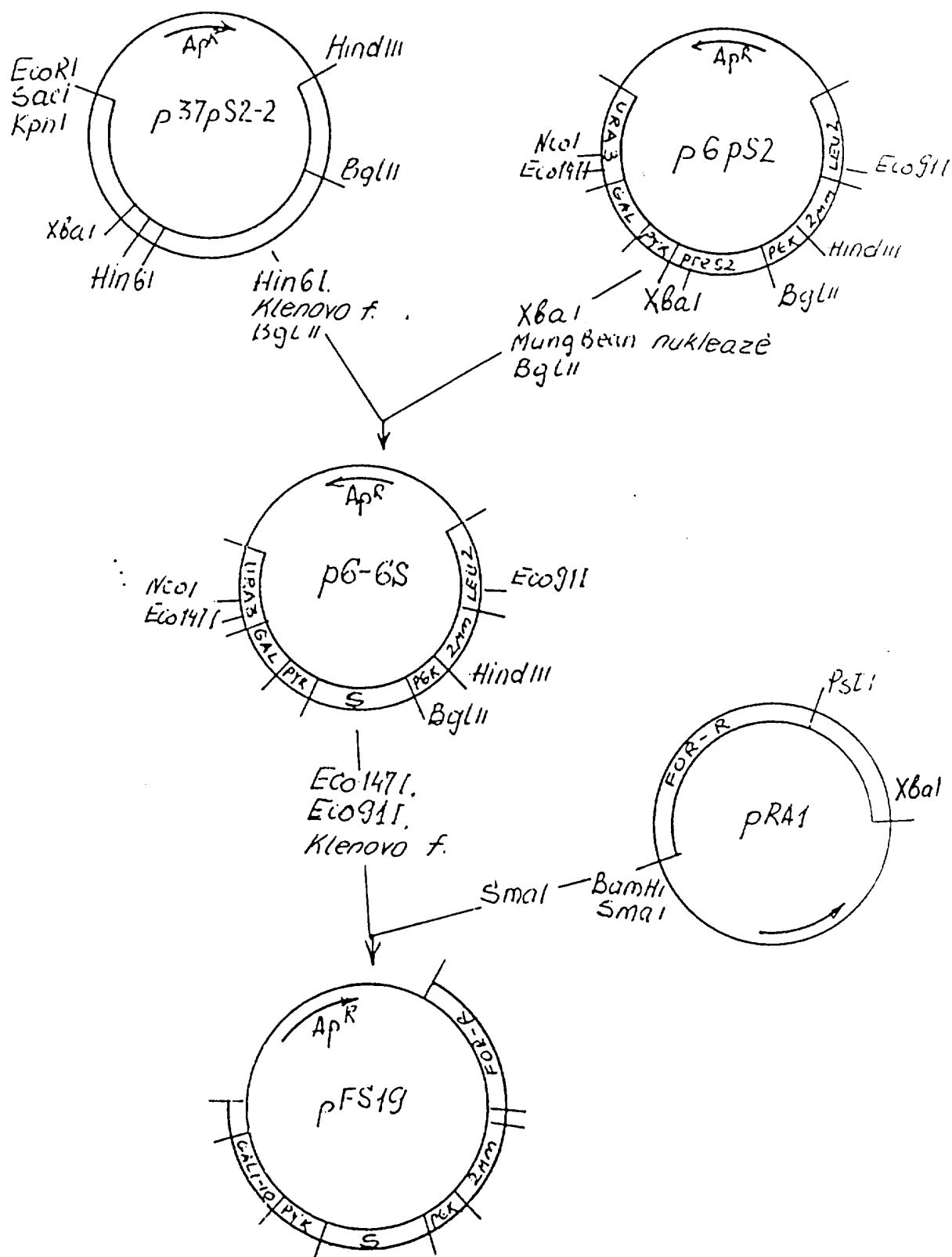


Fig. 6

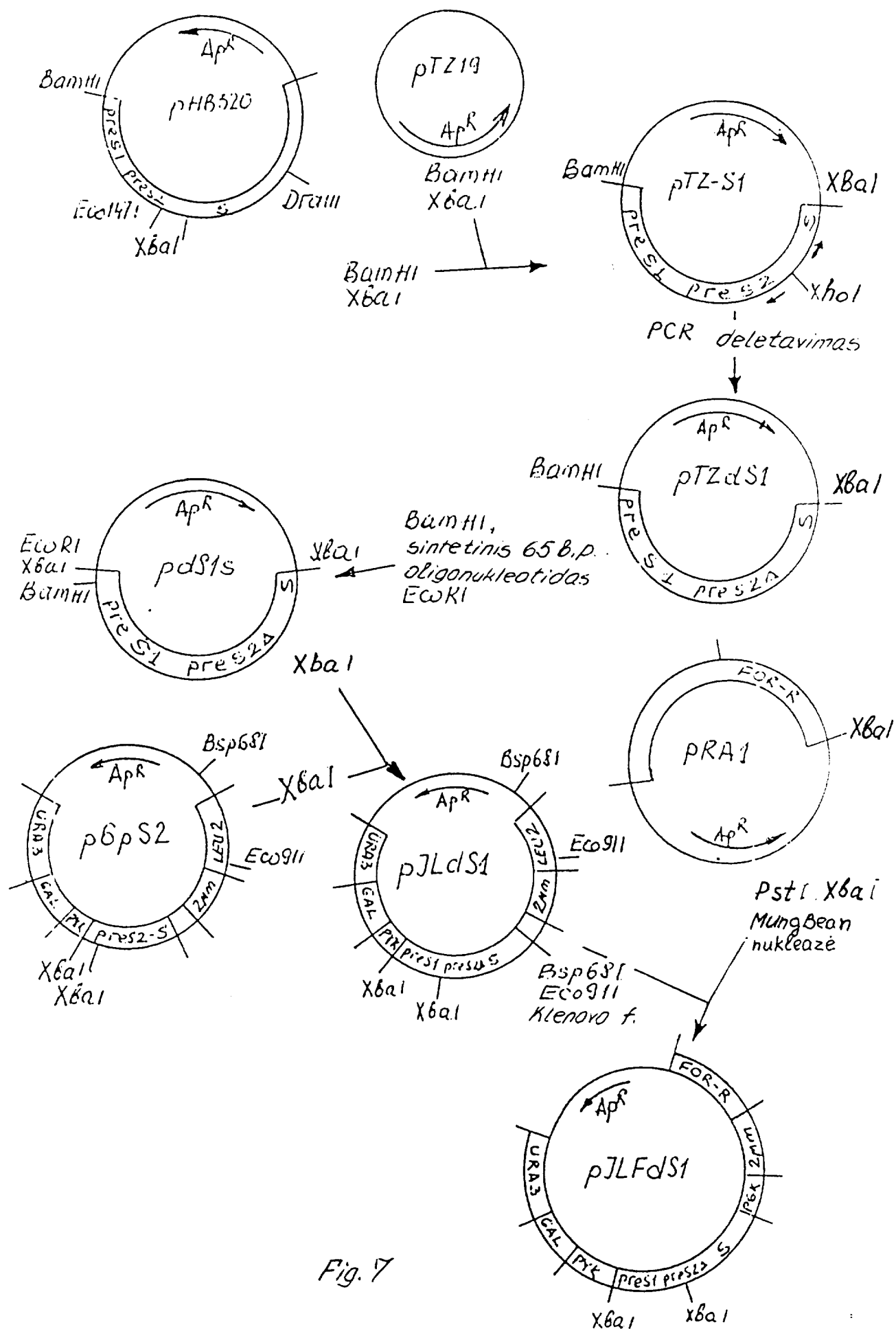


Fig. 7