

- (11) Patent numeris: **4000** (51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/52**
C12N 15/75
- (21) Paraiškos numeris: **IP1820**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1994 01 28**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 08 25**
- (45) Patent paskelbimo data: **1996 06 25**
- (60) SU duomenys: **PCT/NL 88/00007, 1988 02 26**
SU 4356848, 1988 10 26
- (31, 32, 33) Prioritetas: **87200358, 1987 02 27, NL**
- (72) Išradėjas:
Johannes Cornelis van der Laan, NL
Leonardus Johannes Sofie Marie Mulleners, NL
Christiaan Albertus Gerardus van Eekelen, NL
- (73) Patent savininkas:
GIST-BROCADES N. V., Wateringseweg 1, P. O. Box 1, 2600 MA Delft, NL
- (74) Patentinis patikėtinis:
Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
Ekspresijos blokas, transformuota ląstelė-šeimininkė, serino proteazės gavimo būdas, transformacijos būdas, DNR seka, plazmidė, oligonukleotidas
- (57) Referatas:

Siūlomi nauji būdai ir nauji pramoniniai *Bacillus* kamienai serino proteazės gamybai. Plazmidinės konstrukcijos, į kurias įeina serino proteazės genas, įvedamos į suderinamą šeimininką, paprastai *Bacillus*, jau padidintai produktojančią serino proteazę. Tinkamiausiomis ląstelėmis-šeimininkėmis yra *Bacillus novo* sp. PB92 ir tinkamiausias serino proteazės genas taip pat gautas iš *Bacillus* PB92. Plazmidės įsistatymas ir palaikymas ląstelės-šeimininkės chromosomoje gali būti pasiektas, įjungiant temperatūrai jautrų replikacijos pradmenį į plazmidinę konstrukciją ir auginant selektyviose sąlygose.

Šio išradimo objektas yra transformuotas *Bacillus* ląstelės gavimas, panaudojant rekombinantines technologijas.

Bacilos plačiai naudojamos, gaminant svarbius pramonėje fermentus, tokius kaip alfa-amilazė, neutrali proteazė ir šarminės arba serino proteazės. Bendrai, bakterinės serino proteazės gali būti gaunamos iš daugelio prokariotinių organizmų, įskaitant gram-neigiamus organizmus, tokius kaip *Serratia* arba *Pseudomonas* rūšys ir gram-teigiamas bakterijas, tokias kaip *Micrococcus* ir *Bacillus* rūšys. Į svarbių pramonėje serino proteazių grupę, kuria ypač domimasi, įeina tos proteazės, kurios pasižymi dideliu aktyvumu šarminėje terpėje. Pramoninės serino proteazės gaminamos įvairių mikroorganizmų rūšių, tarp jų ir *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.amyloliquefaciens*, *B.alcalophilus* ir kitų *Bacillus* rūšių, o stipriai šarminės proteazės pagrindinai gaminamos *Bacillus* kamienų, kurie sugeba augti esant šarminiam pH. Tokios bakterijos pavyzdžiu gali būti *Bacillus novo species* PB 92. Domimasi sukūrimu bakterijų kamienų, sugebančių gaminti proteolitinius fermentus su didele išeiga, tarp jų ir stipriai šarminės proteazės.

Buvo sėkmingai klonuoti keletas bacilų genų, koduojančių neląstelinius fermentus. Tai alfa-amilazės genai *B.amylolique-faciens* (Palva et al., Gene 15 (1981) 43-51), *B.licheniformis* (Ortlepp, Gene 23 (1983) 267, *B.stearothermophilus* (Mielenz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 5975-5979; EPA - 0057976) ir *B.subtilis* (Yang et al., Nucleic Acids Res.11 (1983) 237); levansukrazės genai *B.subtilis* (Gay et al., J.Bacterio 153, /1983/ 1424), genai koduojantys neutralią proteazę *B.stearothermophilus* (Fuji et al., J.Bacteriol 156, /1983/ 831), *B.amyloliquefaciens* (Honjo et al., J.Biotech. 1 /1984/ 165; *B.subtilis* (Yang et al., J.Bacteriol 160/1984/115), genai, koduojantys serino ar šarminę proteazę *B.subtilis* (Wong et al., Proc.Natl Acad. Sci. USA 81/1984/1184), *B.licheniformis* (Jacobs et al., Nucleic Acids Res. 13/1985/8913) ir *B.amyloliquefaciens* (Wells et al., Nucleic. Acids Res. 13/1985/8913 ir *B.amyloliquefaciens* (Wells et al., Nucleic Acids Res., 11/1983/7911).

Pramoninių serino proteazių gamyba įvairiose *Bacillus* rūšyse aprašyta, pvz., JAV patentuose Nr. 3 674 643, 3 723 250 ir 4 480 043. Didelio šarmingumo proteolitinio

fermento gamyba *Bacillus* kamienuose, galinčiuose augti esant šarminiam pH, aprašyta, pvz., JAV patentuose Nr. 3 723 250, 30 602 ir 4 480 037. Apžvalginis straipsnis apie bakterijų panaudojimą pramonei svarbių fermentų gamybai, pvz., Debabovo str. "The industrial Use of Bacilli's", in The Molecular Biology of Bacilli, (Acad. Press. New York, 1982. *B.subtilis* protoplasto transformacijos protokolas buvo aprašytas Chang ir Goken str. (Mol.Gen.Genet. 168/1979/111-115). Panašūs sėkmingos *B.megaterium* protoplastų transformacijos protokoliai buvo aprašyti (Vorobjeva et al., FEMS Microbiol. Letters 7/1980/261-263, taip pat *B.amyloliquefaciens* protoplastų (Smith et al., Appl. and Env. Microbiol. 51/1966/643), *B.thuringiensis* protoplastų (Fisher et al., Arch. Microbiol. 139/1981/213-217), *B.sphaerius* protoplastų (McDonald, J.Gen.Microbiol. 130/1984/203 ir *B.larvae* protoplastų (Bakhiet et al., Appl. and Env. Microbiol. 49/1985/377). Tačiau Bakhiet su bendr. (aukščiau) praneša apie nesėkmingus rezultatus su *B.popillae*. Mann et al., Current Microbiol. 13/1986/181-185 pranešė apie sėkmingą *B.Polymyxa*, *B.licheniformis*, *B.Macerans* ir *B.laterosporus* transformaciją. Tačiau tie būdai nebuvo sėkmingi *B.coagulans*, *B.cereus* ir *B.pumilus*, nors ir galima buvo stebėti gerą protoplastų susidarymą. Kiti DNR įvedimo į protoplastus būdai panaudoja susiliejamą su liposomomis, turinčiomis DNR (Holubeva, Folia Microbiol. 30/1985/97).

Siūlomi nauji alkalofiliniai *Bacillus* kamienai, būdai ir sąstatai tokių kamienų transformacijai. Siūloma nauja DNR seka, beje, į minėtą seką įeina genas, koduojantis stipriai šarminį proteolitinį fermentą, gautas iš alkalofilinio *Bacillus* kamieno. Ląstelė-šeimininkė, pageidautina, turinti teigiamą foną, transformuojama, panaudojant plazmidę konstrukciją, turinčią geną, koduojantį minėtą stipriai šarminį proteolitinį fermentą. Gali būti panaudota protoplasto transformacija plazmidine konstrukcija, esant polietilenglikoliui šarminėje terpėje. DNR seka gali būti palaikoma nechromosomoje arba įjungta į ląstelės-šeiminės genomą.

Fig. 1 rodo histidin/MORS gel-elektroforezės rezultatus, kurie gauti su kultūrų *B.subtilis* DB104, turinčių atitinkamai pUB110 ir pM58 lyginant su kai kuriais subtilizinais.

1 takelis: subtilizinas *Carlsberg*;

2 takelis: proteazė *Bacillus* PB92;

3 takelis: subtilizinas *Bacillus subtilis*;

4 takelis: *Bacillus subtilis* DB104 (pM58);

5 takelis: *Bacillus subtilis* DB104 (pUB110).

Fig. 2 rodo plazmidės pM58 restriktogramą. Dar daugiau, viršutinėje piešinio dalyje parodyta sekų nustatymo strategija. Ištisinės linijos su rodyklėmis vaizduoja fragmentus, klonuotus fago M13 vektoriuose mp10, mp11 ir mp13 fago M13. Apatinė piešinio dalis rodo sekų nustatymo strategiją, naudojant 10 oligonukleotidų, esančių lygiais tarpais proteazės gene.

Fig. 3 rodo koduojančios grandinės nukleotidų seką, nustatytą pagal serino proteazės *Bacillus* PB92 aminorūgščių seką. Taip pat parodyti promotoriai (P1,P2), ribosomų prisirišimo vietos (rbs) ir DNR sekos terminacijos rajonai (term). Sunumeruotos ištisinės linijos rodo dešimties oligonukleotidų, panaudotų sekų nustatymui, išsidėstymo vietą.

Fig. 4a rodo plazmidės pE194-neo konstravimo schemą.

Fig. 4b rodo plazmidės pMAX-4 konstravimo schemą.

Atitinkamai su išradimo objektu, siūlomos kaip naujos DNR konstrukcijos ir *Bacillus* kamienai, skirti proteolitinių fermentų gavimui su aukšta išeiga, taip ir jų paruošimo būdai. Ląstelės-šeimininkės transformuojamos, sujungiant protoplastus, paruoštus iš *Bacillus* kamieno-šeimininko, susiliejančią su plazmidės konstrukcija, turinčią DNR seką, koduojančią proteolitinį fermentą.

Stipriai šarminės proteazės - tai serino proteazės arba subtilizina, pasižymintys dideliu aktyvumu šarminėje terpėje. Konkrečiau, stipriai šarminės proteazės turi optimalų aktyvumą, kai pH maždaug 9 ir išlaiko bent jau 80% to aktyvumo, kai pH maždaug 11 ar net daugiau. Stipriai šarminės proteazės daugiausiai pagamina *Bacillus* kamienai, kurie sugeba augti šarminiame pH.

Šioje mokslo srityje žinomi būdai, naudojami išskiriant proteazės geną, apimantys sintezę, išskyrimą geno iš genomines DNR, paruošimą iš kDNR arba jų derinius. Stipriai šarminės proteazės geno išskyrimas ir ekspresija atskleisti prioritetiniame dokumente - paraiškoje Europos patentui Nr.EP-A-87200358.7, kuriuo remiasi ir ši paraiška, kurios turinys įjungtas čia nuorodų pagalba. Įvairūs darbo su genais būdai gerai žinomi ir apima restrikciją, skaidymą, iškirpimą, sujungimą, mutagenezę *in vitro*, pirminę reparaciją,

linkerių ir adapterių panaudojimą ir pan. (žiūr. Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982).

Kaip taisyklė, būdas apima genomines bibliotekos paruošimą iš organizmo, ekspresuojančio stipriai šarminę proteazę. Donorinio mikroorganizmo genomas išskiriamas ir sukarpomamas tinkamu restrikciniu fermentu. Gauti donorinio kamieno DNR fragmentai po to sujungiami su klonavimo vektoriumi, kuris sukarpomamas ta pačia restrikcijos endonukleaze.

Klonai, turintys įstatytą DNR fragmentą, gali būti aptikti stabilaus markerio pagalba arba panaudojant tiesioginės ar teigiamos selekcijos būdą, kaip tai yra parengta *B.subtilis* (Gryczan and Dubnow, Gene 20/1982/459-469). Be to, klonai, ekspresuojantys stipriai šarminę proteazę, gali būti identifikuoti antikūnų prieš ekspresijos produktą pagalba arba aptinkant substrato sunaudojimą, arba susidarant proteolitinio fermento veikimo produktui. Pavyzdžiui, kolonijos, ekspresuojančios markerinį geną, koku yra stabilumo antibiotikui genas, gali būti išanalizuotos proteazės gamybai, nustatomi pagal kazeino precipitacijos aureolės padidėjimą aplink kolonijas lėkštelėse su agaru, turinčiu kazeino.

Kada pilnas genas identifikuotas arba kaip kDNR, arba kaip chromosominė DNR, po to ekspresijos užtikrinimui juo galima manipuliuoti įvairiais keliais. Gali būti panaudoti įvairūs *Bacillus* šeimininkai, pvz., šarminės bakterijos, tame tarpe tokios alkalofilinės bakterijos, kurios jau yra stipriai šarminių proteazių producentais. Pageidautinu šeimininko organizmu yra *Bacillus novo* sp. pB 92, todėl patogų palaikyti laukinio tipo seką su reguliatoriniais signalais ir sektorinėmis pradžios sekomis ir taip toliau, nors gali būti panaudotos kontroliuojančios atkarpos, gautos iš kitų bacilų, kurios funkcionuoja *Bacillus* kamienne-šeimininke. Patogus *Bacillus* ląstelės transformacijai vektorius tuo būdu turi savyje struktūrinį geną, koduojantį stipriai šarminę proteazę, gautą iš alkalofilinės *Bacillus* ir turinčios kontroliuojančias atkarpas, tokias kaip promotoriaus seka, seka, sudaranti ribosomų surišimo atkarpą ir sekas, kontroliuojančias transkripcijos terminaciją ir šarminės proteazės geno transliaciją, beje, išvardintos kontoliuojančios atkarpos yra funkcionalios alkalofilinės *Bacillus* ląstelėje-šeimininke.

Be to, vektorius gali turėti markerinį geną, pvz., suteikiantį atsparumą antibiotikui, kuriam kamienas-šeimininkas jautrus, ir replikacijos pradmuo, kuris sugeba autonomiškai replikuotis ląstelėje-šeimininke. Replikacijos pradmuo gali būti toks, kuris

turi mutaciją, darančią jo funkcionavimą ląstelėje-šeimininke jautriu temperatūrai, tuo būdu užtikrinant chromosomalinio įsistatymo selekciją, kaip aprašyta Erlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 1433.

Aminorūgščių seka gali būti panaudota tam, kad būtų sukurtas kDNR bibliotekos arba genominės bibliotekos, paruoštų iš mPNR ar DNR ląstelių, skringo zondas; pastarosiomis ląstelėmis domimasi, kaip stipriai šarminės proteazės geno donorinėmis ląstelėmis. Panaudojant stipriai šarminės proteazės kDNR arba jos fragmentą, kaip hibridizuojantį zondą, gali būti lengvai klonuojami struktūriškai giminingi genai, rasti kituose organizmuose. Ypatingas dėmesys skiriamas genų išskyrimui iš organizmų, kurie ekspresuoja stipriai šarmines serino proteazes, panaudojant oligonukleotidinius zondus, kurie pagaminti pagal stipriai šarminių serino proteazių genų nukleotidines sekas, kurias galima gauti iš alkalofilinių *Bacillus* kamienų, tame tarpe ir *Bacillus novo species* pB 92. Tokie zondai gali būti žymiai trumpesni, negu visa seka, bet jų ilgis turi būti bent jau 10, geriau 15, o dar geriau 20 nukleotidų. Tinkami ir ilgesni oligonukleotidai, iki pat pilno geno ilgio, bet ne ilgesni, negu 1200 nukleotidų. Galima naudoti kaip RNR, taip ir DNR zondus.

Naudojami zondai paprastai žymėti detektuojamu būdu (pvz., 32 P, biotinu arba avidinu) ir inkubuojami su vienos grandinės DNR ar RNR suspensija iš organizmo, kuriame ieškomas genas. Hibridizacija aptinkama pagal žymę, atskyrus vienos grandinės ir dviejų grandinių (hibridizuotą) DNR (arba DNR/RNR), paprastai panaudojant nitroceliuliozinį popierių. Hibridizacijos būdai, tinkami naudojimui su oligonukleotidais, gerai žinomi šios srities specialistams.

Nors dažniausiai naudojami zondai su detektuojama žyme, kuri garantuoja lengvą identifikaciją, nežymėti oligonukleotidai taip pat naudingi kaip žymėtų zondų pirmtakai, bei naudojant juos tiesioginiam dviejų grandžių DNR (arba DNR/RNR) nustatymui. Todėl terminas oligonukleotidinis zondas tinka kaip žymėtoms, taip ir nežymėtoms formoms. Ligavimo mišinys po to naudojamas *B.subtilis* kompetentinių ląstelių transformacijai. Naudojant markerinį geną kaip selekcijos priemonę, rekombinantines plazmides po to galima išskirti ir charakterizuoti, pasitelkiant į pagalbą restrikcinę analizę ir sekos nustatymą.

Gaminant stipriai šarminę proteazę, geriausia DNR seka yra seka, gauta iš *Bacillus novo species* PB 92, naudojant transformacijai *Bacillus* kamienus, kurie jau produkuoja serino proteazę. Serino proteazės aminorūgščių seka, koduojama DNR seka, yra tokia:

H₂N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L-T-G-S-G-V-K-V-A-V-L-D-T-G-I-S-T-H-P-D-L-N-I-R-G-G-A-S-F-V-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-N-A-E-L-Y-A-V-K-V-L-G-A-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-L-E-W-A-G-N-N-G-M-H-V-A-N-L-S-L-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-R-G-V-L-V-V-A-A-S-G-N-S-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-F-S-Q-Y-G-A-G-L-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-L-N-G-T-S-M-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-L-K-N-T-A-T-S-L-G-S-T-N-L-Y-G-S-G-L-V-N-A-E-A-A-T-R-COOH.

Nors tinkamiausiu kamieniu proteazės geno aprūpinimui yra rūšis *Bacillus* PB 92, iš esmės tokia pati serino proteazė gali būti gauta ir iš kitų šarminę terpę mėgstančių bakterijų. Proteazių genai, turintys giminingumą su aminorūgščių seka *Bacillus* PB 92 bent jau 70%, o geriau virš 80%, turi būti laikomi patekę į šio išradimo objekto sritį.

Pageidautina, kad išraiškos produktas būtų išskiriamas į terpę. Kadangi šarminę proteazę yra sekretuojama, gali būti panaudoti sekreciniai pradžios signalai ir laukinio tipo procesingo signalai. Be to, sujungtas genas gali būti gautas, suteikus 5' seką struktūriniam genui, koduojančiam sekrecijos pradžios signalą ir processingo signalą. Charakteringos skirtingos sekretorinės pradžios sekos apima *Bacillus* amilazės ir proteazės genų sekretorines pradžios sekas. Teisingai sujungus pagal atskaitos rėmelį sekretorinę pradžios seką su norimu struktūriniu genu, į augimo terpę gali būti sekretuojama alkalofilinė proteazė.

Ekspresijos blokas gali būti pilnai ar dalinai gautas iš gamtinių šaltinių arba iš šaltinių, giminingų ląstelei-šeimininkei. Įvairios DNR konstrukcijos, DNR sekos, vektoriai, plazmidės, ekspresijos blokai pagal šį išradimą išskiriami ir/arba valomi ir sintetinami, ir tuo būdu nėra "gamtiniai". Priklausomi nuo to, ar norima įstatyti struktūrinį geną į kamieno-šeimininko chromosomą ar palaikyti jį nechromosominiame elemente, replikacinė *Bacillus* sistema gali būti, o gali ir nebūti įjungta.

Norint įstatyti giminingos su *Bacillus* genomu, plazmidės konstrukcijos atkarpos gali būti panaudotos rekombinacijų tikimybės padidinimui. Dar daugiau, tai kad į plazmidinę konstrukciją įjungiamas temperatūrai jautrus replikacijos pradmuo, leidžia vykdyti atranką pagal įterpimą į chromosomą. Žiūrėk, pavyzdžiui, Ehrlich, Proc. Natl. Acad. Sc. USA (1978) 1433.

Struktūrinio geno ekspresijos padidinimui į ląstelę-šeimininką gali būti įstatyta daugiau, nei viena struktūrinio geno kopija. Stabili struktūrinio geno amplifikacija gali būti gauta, įstatant bent vieną papildomą struktūrinio geno kopiją į ląstelės-šeimininko genomą ir atrenkant transformantus, kuriuose struktūrinio geno kopijos atskirtos endogeninėmis chromosominėmis sekomis. DNR konstrukcijos ir panaudojimo būdai prokariotinėse sistemose aprašyti paraiškoje Europos patentui Nr.EP-A-87200356 - išradimui, kuris čia minimas kaip literatūros šaltinis.

Papildant replikacijos sistemą, paprastai būna bent vienas markerinis genas, įjungtas į plazmidinę konstrukciją. Markerinis genas - tai struktūrinis genas, sugebantis reikštis šeimininke, suteikiantis atsparumą biocidams ar virusams arba atsparumą sunkiesiems metalams, imunintetą ir pan. Kalbant apie atsparumą biocidams, galima sakyti, kad tai apima ir atsparumą antibiotikams, pvz., neomicinui, kanamicinui, tetraciklinui ir t.t. Markerinis genas bus parinktas taip, kad užtikrintų atranką esant mažam kopijų skaičiui ir antibiotiko koncentracijai, kuri nestipriai sulėtina rekombinacinių ląstelių augimą. Ypatingai įdomus yra atsparumas neomicinui.

Įvairios DNR sekos gali būti gaunamos iš skirtingų šaltinių ir sujungtos kartu, kad būtų gautas vektorius, kuris turi vieną ar daugiau patogių, pageidautina - unikalių restrikcijos saitų, kurie leistų įstatyti arba pakeisti struktūrinius genus pagal tuos saitus ir gauti plazmidinę konstrukciją.

Po to, kai plazmidinė konstrukcija paruošta, ji gali būti panaudota tinkamos ląstelės-šeimininko transformacijai. *Bacillus* šeimininku gali būti bet koks *Bacillus* kamienas, tačiau parenkant tinkamą kamieną, įvertinami faktoriai, kurie gali pagerinti šarminių proteazių produkciją. Produkcija gali būti pagerinta įvairiais keliais, įskaitant šeimininką, kuriame sumažinta norimo produkto degradacija, reguliatorinių signalų pažinimas, sekrecijos palengvinimas ir t.t. Tuo būdu, nors tinkamas *Bacillus* šeimininkas yra stipriai šarminės proteazės producentas, arba *Bacillus* laukinio tipo arba *Bacillus*

mutantas, *Bacillus* šeimininkas gali būti mutantiniu producentu alkalofilinės proteazės, kuris negamino alkalofilinės proteazės.

Bacilos, produkuojančios stipriai šarminę proteazę, taksonomiškai nėra pakankamai klasifikuotos, ir paprastai jas priskiria prie alkalofilinių *Bacillus* kamienų. Pavyzdžiai *Bacillus* kamienų, galinčių augti esant šarminiam pH, aprašyti, pavyzdžiui, JAV patentuose Nr.Nr.3 723 250, Re.30 602 ir 4 480 037. Labiau tinkamo ūkinio alkalofilinio *Bacillus* kamieno-šeimininko pavyzdžiu yra *Bacillus novo species* PB92, atskleistas kartu su kitais JAV patente Nr.Re.30602.

Pramoniniai alkalofiliniai *Bacillus* kamienai taip pat gali būti naudojami kaip ląstelės-šeimininkai. Pramoniniai *Bacillus* kamienai yra išvedami iš organizmų, kurie gali būti išskirti iš dirvos arba gali būti paimti iš bankų ar kitų šaltinių ir gaunami genetiškai modifikuojant tokius *Bacillus* kamienus. Pramoniniams *Bacillus* kamienams charakteringas atsparumas genetiniams mainams, tokiems kaip fagų infekcija arba transformacija. Tie kamienai stabilūs, ir transformacijos gali arba negali sudaryti sporas. Kamienai dažniausiai yra fototrofai ir modifikuoti taip, kad būtų gaunamos didelės endogeninių baltyminių produktų, tokių kaip alfa-amilazės fermentai ir įvairios proteazės, išeigos. Endogeninių baltyminių produktų išeiga, gauta pramoninės gamybos procese, gali siekti bent jau 5 g/l 0,5% (svoris/tūris). Pramoniniai kamienai taip pat išskiria DNRzes, kurios degraduoja DNR terpėje, tuo apsaugodamos nuo genetinių mainų.

Alkalofilinių *Bacillus* kamienų transformacija pirmoje eilėje įjungs minėtų kamienų protoplastų panaudojimą. Tačiau, kaip aprašyta Cohen et al. (aukščiau), paprastas protoplastų transformacijos būdas netinka alkalofiliniams *Bacillus* kamienams. Taigi, turi būti sukurti papildomi būdai.

Alkalofilinėms bakterijoms protoplastų susidarymas ir regeneracija gali vykti aukštame pH, geriausia apie pH 8. Protoplastai gali būti paruošti, resuspenduojant ląsteles šarminėje buferinėje terpėje (AHM - alkaline holding medium) pH 7,8-8,5 su po to sekančia ląstelių inkubacija 37°C temperatūroje 30-80 minučių. Tai matome 5 pavyzdyje. Gauti protoplastai po to plaunami, siekiant pašalinti lizocimą, o po to resuspenduojami šarminėje buferinėje terpėje (AHM). Dalyvaujant tinkamam sukirpimo reagentui, plazmidinė konstrukcija ir šarminę terpę mėgstančio *Bacillus*-šeimininko protoplastas susijungia. Nors gali būti naudojamas bet koks sujungimo reagentas,

uštikrinantis norimą efektyvumą, tačiau buvo rasta, kad tam geriausiai tinka polietilenglikolis, kurio molekul. svoris 1000-8000. Protoplastai, paruošti iš akceptorinio *Bacillus* kamieno ir laikomi ne ilgiau kaip 5 min., geriau ne ilgiau kaip 2 min., sumaišomi su plazmidine konstrukcija, dalyvaujant polietilenglikoliui. Sujungimo reagentų mišinys po to pakeičiamas paprasta maitinimo terpe, kurioje ląstelės inkubuojamos iki 5 h, geriau 2-3 h, po to pernešamos ant regeneracijos terpės lėkštelių. Regeneracijos lėkštelėse yra antibiotikas, toks, kaip neomicinas - transformantų atrankai.

Klonai su episomaliniu DNR konstrukcijos palaikymu gali būti identifikuoti, aptinkant stipriai šarminės serino proteazės ekspresiją. Klonai, kurių ekspresinė konstrukcija yra atkarpa, įsistačiusi į jų chromosomas, yra atrenkami ir identifikuojami, išskiriant sumarinę ląstelinę DNR ir atrenkant tuos klonus, kuriuose gali būti aptikta laisva plazmidinė DNR, su ekspresuojamu markeriniu plazmidės genu. Tie klonai gali būti atrenkami stipriai šarminės serino proteazės aptikimui tinkamais būdais.

Įvairūs aptikimo būdai, įskaitant ir specifinių antikūnų panaudojimą, DNR ir RNR hibridizaciją, fermentinio produkto susidarymą arba fermentinio substrato išnykimą, gali būti panaudojami tam, kad atrinkus klonus, norint aptikti ekspresinės konstrukcijos buvimą ir dominančio struktūrinio geno ekspresiją, būtų, proteazės gamybą. Gaminama proteazė gali būti charakterizuojama biochemiškai, pavyzdžiui, nustatant proteazės molekulinę masę elektroforezės SDS-poliakrilamidiniame gelyje, elektroforezės Histidin-MOPS gelyje pagalba, nustatant kinetinius K ir V parametrus sintetiniam substratui sukcinil - L - alanil - L - alanil - L - propil - L - fenilalanil - p - nitro - anilidui.

Bacillus šeimininkas, turintis ekspresuojančią konstrukciją, įjungtą episomaliai ar chromosomaliai, auginamas maitinančioje terpėje tokiose sąlygose, kurios palankios fermento sintezei. Maitinanti terpė būtina turi plazmidės palaikymui skirtų medžiagų, kaip antibiotiko, kuriam jautrus netransformuotas šeimininkas. Fermentacija gali tęstis tol, kol nebus išnaudotos maisto medžiagos. Tuo atveju, kai produktas sekretuojamas, jis gali būti išskirtas iš buljono patogiu būdu, pvz., ekstrakcijos, chromatografijos, elektroforezės ar pan. Ten, kur produktas lieka citoplazmoje, ląstelės gali būti surinktos centrifugavimu, filtravimu ir t.t., suardomos mechaniškai pertrinant, detergentu, lizocimu ar kitais metodais, ir produktas gali būti išskirtas, kaip aprašyta aukščiau. Kai netransformuota ląstelė-šeimininkė yra stipriai šarminės proteazės producentė, tai

pateikto metodo pagalba gali būti pasiektas smarkiai stipriai šarminės serino proteazės išėigos padidėjimas, bent jau 120%, lyginant su išėiga netransformuotos ląstelės šeimininkės su vienintele nechromosomine geno kopija.

Pavyzdžiai siūlomi kaip iliustracija, bet ne kaip išradimo apribojimas.

I pavyzdys

Genominės DNR banko paruošimas iš alkalofilinės naujos rūšies *Bacillus* PB 92 banko ir serino proteazės geno išskyrimas

Chromosominė DNR, išskirta iš *Bacillus novo* sp. PB 92 (saugoma Delfto Techninio universiteto mikrobiologijos laboratorijoje NR.OR-60; Niderlandai, žiūr. JAV patentą Nr.30 602) būdu, aprašytu Saito-Miuva, Biochim.Biophys. Acta 72 (1963) 619-623, dalinai buvo sukarpyta restrikciniu fermentu Sau 3A ir liguota Bam HI kirpimo vietoje plazmidėje pUB110 (Gryczan et al., J.Bacteriol. 134 (1978) 313-329). Plazmidinė DNR pUB110 buvo paruošta, kaip aprašyta Birnboim and Doly (Nucl.Acids Res. 7 (1979) 1513-1523).

Ligavimo mišiniu transformavo *B.subtilis* IA40 (Genetinis bacilų saugojimo centras) pagal būdą, aprašytą Spizizen et al., J. Bacteriol. 81 (1961) 741-746, naudojant 0,6-1 µg DNR/ml komponentinių ląstelių. Ląsteles iš transformacijos mišinio išsėjo ant minimalių lėkštelių, turinčių: 2,8% K₂HPO₄; 1,2% KH₂PO₄; 0,4% (NH₄)₂SO₄; 0,2% tri-Na-citrato 2H₂O; 0,04% MgSO₄·7H₂O; 0,00005% MnSO₄·4H₂O; 0,4% L-gliutamininės rūgšties; 0,5% gliukozės; 0,02% kazamino rūgšties, 50 µg/ml triptofano; 20 µg/ml metionino; 20 µg/ml lizino; 20 µg/ml neomicino; 0,4% kazeino ir 1,5% agaro. Po to, kai lėkštelės buvo išlaikytos per naktį 37°C temperatūroje, viena iš 50000 kolonijų, atsparių neomicinui, parodė išaugusią proteazės produkciją; tai nustatė pagal padidintą kazeino skilimo produktų precipitacijos žiedo padidėjimą aplink koloniją ant agaro plokštelės. Plazmidinė DNR buvo išskirta iš tos kolonijos būdu, aprašytu Birnboim and Doly, Nucleic Acids Res. 7 (1979) 1513-1523 ir pažymėta pM 58.

2 pavyzdys

PB serino proteazės geno ekspresija

Bacillus subtilis IA 40, turinti pM 58, buvo išauginta minimalioje terpėje (Spizizen et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 44 (1958) 1072-1078), į kurią buvo pridėta 0,02% kazamino rūgščių; 50 µg/ml triptofano; 20 µg/ml metionino; 20 µg/ml lizino ir 20 µg/ml neomicino. Po 24 valandų kultūrą centrifugavo ir tikrino nuopilo proteazinį aktyvumą, substratu naudodami dimetilkazeiną. (Lin et al., J Biol. Chem. 244 (1969) 739-793). Kultūra *B.subtilis* IA 40, turinti plazmidę pUB110, panaudota kaip kontrolinė, parodė mažiau nei 1/60 proteazės aktyvumo, lyginant su kultūra, transformuota pM58. Proteazės aktyvumas pilnai nuslopinamas, apdorojant 1 mM fenilsulfanilfluoridu (FSF), bet ne 20 mM EDTA.

Aukščiau aprašytų nuopilų tokie bandiniai buvo analizuojami, panaudojant baltyminių gelį aprašytu Leamly, Nature, 227 (1970) 680 būdu. Analizių ant šių gelių bandiniai buvo paruošti, apdorojant nuopilus 5% trichloracto rūgštimi (TCA). Pavyzdį nucentrifugavus, išsodinto baltymo nuosėdos du kartus buvo praplautos acetonu, po to ištirpintos 40 µl buferio pavyzdžiams (0,5 M TrisHCl pH 7,5; 10% (tūrio) 2-merkptoetanolio; 50% tūrio glicerino ir 0,05 % bromfenolio mėlio), virinant 10 min. Po elektroforezės geliai dažomi, panaudojant Kumassi Briliantinį Mėlį. Po to kultūrų nuopilų bandiniai buvo analizuojami elektroforeze. Buvo naudojami trys skirtingi *B.subtilis* IA40 kamienai: kamienas, turintis pUB110; arba pM58; arba be plazmidės ir *Bacillus* pB92 proteazė kaip kontrolinė. Po elektroforezės gelius dažė, panaudodami Kumassi Briliantinį Mėlį ir atplovė. Pavyzdys iš *B.subtilis* kamieno IA40, turinčio pM58, turėjo 31 kDa svorio baltymą, kuris migruoja kartu su *Bacillus* PB92 proteaze. Tas baltymas nebuvo aptinkamas kontroliniame kamieno *B.subtilis* IA40, turinčio pUB110, takelyje.

Visos serino proteazės turi vienodą molekulinį svorį. Dėl to klonuota *Bacillus* PB92 serino proteazė buvo atskiriama nuo žinomų serino proteazių subtilizino *B.subtilis*, subtilizino Calsberg, panaudojant pM58 ir pUB110 transformaciją į beproteazinį kamieną *B.subtilis* DB104 (R.Do, J.Bacteriol. 160(1984)442-444) ir produkuojamos neląstelinės proteazės analizę. Gauti transformantai buvo auginami minimalioje terpėje ('Spizizen et al., aukščiau), turinčioje 0,02% kazamino rūgščių, 50 µg/ml histidino ir 20

µg/ml neomicino. Po 24 h buvo paimti pavyzdžiai, centrifuguoti ir be papildomo apdorojimo analizuoti, panaudojant histidin/MORS gelį, turintį 75 mM KOH; 40 mM histidino; 100 mM MORS (3-(N-morfolino)-propansulfonatas), pH 7,5 ir 5% poliakrilamido. Elektroforezės buferis turėjo 40 mM histidino, 100 mM MORS, pH 6,6. Pavyzdžiai judėjo katodo link. Proteazės juostos buvo aptinkamos specialių plėvelių Agfa Pan 100 pagalba (Zuidweg et al., Biotechnol. and Bioengin 14 (1972) 685-714). Šie rezultatai parodyti Fig. 1. Kaip matome, pM58 turi geną, koduojantį *Bacillus* PB92 proteazę.

3 pavyzdys

Serino proteazės *Bacillus* PB92 geno nukleotidų sekų nustatymas

Pilna seka Ball-HpaI fragmento pM58 buvo nustatyta būdu, aprašytu Sanger, Proc Natl. Acad. Sci USA 77 (1977) 6463. Restrikcijos fragmentai pM58 (žiūr. Fig. 2) buvo klonuoti fago M13 vektoriuose mp10, mp11 ir mp18 (Messing et al., Nucleic Acids Res. 9 (1981) 309-321). Apie pM58 fragmentų įsistatymą buvo sprendžiama fago kolonijų hibridizacijos pagalba. Po sekų nustatymo (sekvenavimo) buvo padaryta dešimt oligonukleotidų, lokalizuotų gene lygiais tarpais ir buvo pakartotas sekų nustatymas, kuris patvirtino seką, parodytą Fig. 3.

4 pavyzdys

Plazmidės pMAX-4, turinčios serino proteazės geną, konstravimas

Plazmidės pUCN710 (Fig. 4A) konstravimui pUB110 buvo sukarpyta endonukleazėmis TayI ir PvuII. Fragmentas, turintis atsparumo neomicinui geną, buvo išvalytas žemos lydymosi temperatūros agarozės pagalba ir užbukintas Klenovo polimeraze ir TNF (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor 1982). Plazmidė pUC7 (Vieira et al., Gene 19 (1982) 259-268) buvo linearizuota Sall ir užbukinta, kaip aprašyta aukščiau. Abu fragmentai buvo sujungti T4 ligaze (Maniatis) ir transformuoti į *E. Coli* JM103. Atranką vykdė ant 2xTY lėkštelių (1,6%

sv./tūr. Bakto-triptono; 1% sv./tūr. mielių ekstrakto; 0,5% NaCl), turinčiu 50 µg/ml ampicilino ir 10 µg/ml neomicino. Gauta plazmidė, pavadinta pUCN710, buvo sukarpyta BamHI. Plazmidė pE194 (Vardanescu, Plasmid 1 (1978) 468-479) buvo paveikta BcII. Fragmentai iš abiejų karpymų buvo sujungti T4 ligaze ir transformuoti į *B.subtilis* IA40. Atranką vykdė minimalios terpės lėkštelėse, turinčiose 20 µg/ml neomicino.

Proteazės geno pakartotiną perklonavimą, panaudodami įstatymo vektorių, atliko tokiu būdu: pM58 (žiūr. 1 pavyzdys) sukarpė HpaI ir Ball ir BgeII. Plazmidę pE194-neo karpė HpaI. Tuos fragmentus sujungė T4 ligaze ir jais transformavo *B.subtilis* IA40. Transformantus atrinko pagal atsparumą neomicinui ir proteazės produkcijos padidėjimą, apie ką sprendė pagal kazeino skilimo produktų precipitaciją (žiedo susidarymą, žiūr. 1 pavyzdį). Buvo gauta plazmidė pMAX-4, kurios struktūra patvirtinta restrikcinių fragmentų analize (žiūr. Fig. 4B).

5 pavyzdys

***Bacillus* PB92 pMAX-4 kamieno protoplastų transformacija**

Bacillus PB92 kamieną augino per naktį 100 ml terpės NBSG-X (Thorne et al., J.Bacteriol. 91 (1966)1012-1020) Kultūrą 10 min. centrifugavo Sorvall tipo GSA modelio rotorijoje esant 4500 aps/min. Protoplastai buvo paruošti, inkubuojant bacilas 37°C temperatūroje laike 1 h 10 ml šarminės terpės, turinčios 0,5 M sacharozės; 0,02 M MgCl₂ ir 0,02 M Tris/maleato, pH8,0; steriliame vandenyje, į kurį buvo pridėta 0,4 mg/ml lizocimo. Protoplastai buvo nusodinti centrifuguojant 10 min., esant 4500 aps/min resuspenduoti 5 ml buferinio mišinio AHM⁺pH 8,0 (AHM buferis, į kurį pridėta 3,5% sv./tūrio Bakto Panessay buljono ir 0,04% sv./tūr. Merieux albumino), sumaišyti, po to persodinti, kaip anksčiau. Po suspendavimo 5,0 ml AHM, 0,5 ml šios protoplastų suspensijos buvo sumaišyta su 5 µg demineralizuoto vandens, su 1 µg plazmidės DNR ir 2 min. inkubuoti, esant 30% sv./tūr. polietilenglikolio 8000, pH 8,0. Triskart praskiedus AHM⁺ terpe pH 8,0 ir centrifugavus, nuosėdas suspendavo mažame tūryje - 1 ml AHM⁺ ir inkubavo 2-3 h. Tokie pat tūriai po 100 µl buvo išsėti ant šviežiai paruoštų regeneracinės terpės lėkštelių, turinčių 0,5 M sukcinato Na/HCl pH 8,0; 1,5% sv./tūr. agaro; 0,5% sv./tūr. kazamino rūgščių, 0,5% sv./tūr. mielių ekstrakto; 0,031 M fosfatinio

buferio pH 8,0; 0,5 sv./tūr. gliukozės; 0,02 M $MgCl_2$ ir 0,02 % sv./tūr. Merieux albumino. Selekcijos tikslais lėkštelėse buvo 1000 $\mu g/ml$ neomicino. Inkubavus 37°C temperatūroje bent jau 72h, kolonijos buvo perneštos ant lėkštelių su agaru, turinčiu širdies ekstrakto ir 20 $\mu g/ml$ neomicino.

6 pavyzdys

pMAX-4 įstatymas į *Bacillus* PB92 kamieno chromosomą

Bacillus PB92 kamieno, turinčio pMAX-4, kolonija, išauginta ant lėkštelės su agaru, turinčiu širdies ekstraktą ir 20 $\mu g/ml$ neomicino, buvo patalpinta į 100 ml triptoninio sojos buljono, turinčio 1 $\mu g/ml$ neomicino ir inkubuota 24h 37°C temperatūroje. 2 ml kultūros (apie 10^9 ląstelių/ml) buvo praskiesti 100 ml tos pat terpės, turinčios 1 $\mu g/ml$ neomicino ir inkubuota 24 h 50°C temperatūroje. Po 24 h 5 ml kultūros (apie 10^9 ląstelių/ml) buvo vėl praskiesti, kaip aprašyta aukščiau, ir inkubuoti 24 h 50°C, esant 1 $\mu g/ml$ neomicino. Pastaroji procedūra buvo pakartota dar kartą. Po to ląstelinė suspensija buvo praskiesta 100 kartų ir išsėta į lėkštelę su agaru, turinčiu širdies ekstrakto (HI-agaras Difco), turinčio 1 $\mu g/ml$ neomicino. Lėkštelės inkubuotos 16 h 50°C. Kolonijos, atsparios neomicinui, buvo izoliuotos ir kultivuotos 16 h laikotarpyje 37°C 10-je ml terpės TSB, turinčios 1 $\mu g/ml$ neomicino. Iš tų kultūrų buvo išskirta bendra DNR (Holnuss et al., Anal. Biochem. 114(1981) 193-197) ir DNR elektroforezės agarose gelyje pagalba buvo patikrinta, ar nėra plazmidės. Pavyzdžiui, kuriuose nerasta plazmidinės DNR, buvo dar kartą patikrinti, sumarine DNR transformuojant į *B. subtilis* IA40. Pavyzdžiai, neturintys sugebėjimo transformuoti *B. subtilis* IA40, buvo laikomi neturintys plazmidės. Buvo rastas atsparus neomicinui ir neturintis plazmidės kamienas, gautas iš *Bacillus* PB92, ir pavadintas PBT109. Šis kamienas turėjo plazmidės pMAX-4 kopiją, įstatytą į jo chromosomą. Įstatymas į PBT109 kamieną vykdo pagal taip vadinamą Campbell tipo mechanizmą homologinės rekombinacijos keliu, duodančiu du paeiliui išsidėsčiusius proteazės genus ant chromosomos, atskirtus plazmidinėmis sekomis. Ši genetinė kamieno PBT109 organizacija buvo patvirtinta, kaip parodyta bendroje paraiškoje Europos patentui, užregistruotoje kartu su šia, kurios atradimas įjungtas čia kaip literatūros nuoroda.

7 pavyzdys

Transformuotų kamienų proteazės produkcija

Transformuotų kamienų proteazės produkcija buvo nustatyta, pridedant 0,2 ml TSB kultūros suspensijos, turinčios apie 10^9 ląstelių/ml, 500 ml supamoje kolboje, turinčioje 100 ml produkcinės terpės, aprašytos JAV patente Nr. Re.30 602. Tačiau, tiriant *B.subtilis* kamienus, pH buvo sureguliuota iki pH 7,0. DB104 (pUB110), DB104 (pMAX-4), PB92 pMAX-4 kamienams pridėdavo 20 µg/ml neomicino, o kamienui PBT109 - 1 µg/ml neomicino. Santykinė proteazės produkcija šioms ląstelių linijoms pateikta 1 lentelėje.

1 lentelė

Transformuotų bacilų proteazės produkcija

Kamienas	Santykinė proteazės produkcija **	neomicino priedas
<i>Bacillus</i> PB92	100.0%	-
<i>Bacillus</i> PB92 pMAX-4	120.0%	+
<i>Bacillus</i> PBT109	120.0%	+
<i>B.subtilis</i> B104 (pUB110)*	1.5%	+
<i>B.subtilis</i> B104 (pMAX-4)	10.0%	+

* Tik proteazino pMAX-4 geno proteazės produkcijos matavimui plazmidė buvo taip pat transformuota (Spizizen et al., (1961) aukščiau) į beproteazinį kamieną *B.subtilis* DB104 (R.Doī, J.Bacteriol. 160 (1984) 442-444)

kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

** Proteazinį aktyvumą matavo, panaudojant kaip substratą dimetilkazeiną, kaip aprašyta Lin et al., J. Biol. Chem. 244 (1969) 789-793.

Fermentuojant didesniame kiekyje - 10-je litrų, *Bacillus* PB92 pMAX-4 pasirodė nestabilus ir duodantis mažesnę produkciją, negu PB109, jei į fermentacinę terpę neprisidėjo neomicino.

Iš aukščiau minėtų rezultatų seka, kad pasiūlytas paprastas ir efektyvus serino proteazės produkcijos būdas, stabiliai įvedant homologinį ir heterologinį geną, koduojantį serino proteazę, į pramoninių *Bacillus* kamienų chromosomą. Taip pat siūloma padidinti serino proteazės produkciją *Bacillus*-šeimininke, kuris jau gamina serino proteazę. Plazmidinių konstrukcijų įstatymas į ląstelės-šeimininko chromosomą lemia stabilumą gamybinėse fermentacijose ir žymiai padidina proteazės produkciją negu esant kamienams su nechromosominėmis plazmidėmis.

Visos publikacijos ir paraiškos patentams, minėtos šiame išradimo aprašyme, nurodo tos srities specialistų kvalifikacijos lygį. Visos publikacijos ir paraiškos patentams įrašyti į šį patentą kaip nuorodos taip, lyg kiekviena atskira publikacija ar paraiška patentui būtų specialiai ir individualiai nurodyta literatūros sąrašė.

Kadangi išradimas dabar pilnai aprašytas, tai daugelio pakeitimų ir modifikacijų jame galimybė, neatitrūkstant nuo išradimo esmės ir apibrėžties apimtys bus, matyti, įprastu technikos dalyku.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Ekspresijos blokas, į kurį įeina transkripcijos kryptimi: transkripcijos reguliavimo seka ir transliacijos inicijavimo seka, funkcionuojantys *Bacillus* ląstelėje-šeimininke; DNR seka, koduojanti stipriai šarminį proteolitinį fermentą; transliacijos ir transkripcijos terminacijos sekos, funkcionuojančios minėtoje ląstelėje-šeimininke, kurioje minėtos DNR sekos ekspresija vyksta minėtų sekų iniciacijos ir terminacijos reguliacinėje kontrolėje; ir bent jau vienas markerinis genas ir temperatūrai jautrus bakterinės plazmidės replikacijos pradmuo.
2. Ekspresijos blokas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas proteolitinis fermentas gautas iš alkalofilinio *Bacillus* kamieno PB92 rūšies.
3. Ekspresijos blokas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka turi bent jau 70% nukleotidinės sekos homologijos su proteolitinį fermentą koduojančiu *Bacillus* novo species PB92 genu.
4. Ekspresijos blokas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR seka koduoja polipeptidą, turintį tokią aminorūgščių seką:

H₂N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L-T-G-S-G-V-K-V-A-V-L-D-T-G-I-S-T-H-P-D-L-N-I-R-G-G-A-S-F-V-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-N-A-E-L-Y-A-V-K-V-L-G-A-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-L-E-W-A-G-N-N-G-M-H-V-A-N-L-S-L-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-R-G-V-L-V-V-A-A-S-G-N-S-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-F-S-Q-Y-G-A-G-L-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-L-N-G-T-S-M-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-L-K-N-T-A-T-S-L-G-S-T-N-L-Y-G-S-G-L-V-N-A-E-A-A-T-R-COOH.

5. Transformuota *Bacillus* ląstelė-šeimininkė, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad turi savyje ekspresijos bloką, kuriame yra transkripcijos kryptimi transkripcijos reguliavimo seka ir transliacijos inicijavimo seka, funkcionuojantys minėtoje ląstelėje-šeimininke, DNR seka, koduojanti stipriai šarminę serino proteazę ir transliacijos ir terminacijos

transkripcijos sekos, funkcionuojančios minėtoje ląstelėje-šeimininke, kurioje minėtos DNR sekos ekspresija vyksta minėtų sekų iniciacijos ir terminacijos reguliacinėje kontrolėje; ir bent jau vienas markerinis genas ir temperatūrai jautrus bakterinės plazmidės replikacijos pradmuo.

6. Ląstelė pagal 5 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad turi bent jau dvi minėtos DNR sekos kopijas, įstatytas į minėtos ląstelės chromosomą.

7. Ląstelė pagal 5 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad minėta ląstelė-šeimininkė yra laukinio tipo serino proteazės transformuotu producentu.

8. Ląstelė pagal 5 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad minėta ląstelė-šeimininkė yra laukinio tipo serino proteazės transformuotu mutantiniu kamieniu.

9. Ląstelė pagal 8 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad minėtas mutantas nėra serino proteazės producentu.

10. Ląstelė pagal 5 punktą, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad minėta stipriai šarminė serino proteazė gauta iš *Bacillus novo species* PB92.

11. Serino proteazės produkcijos būdas alkalofilinėje *Bacillus* ląstelėje-šeimininke, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad į minėtą ląstelę-šeimininkę įveda ekspresijos bloką, turintį transkripcijos kryptimi transkripcijos kryptimi transkripcijos ir transliacijos reguliacinį iniciavimo seką; DNR seką, koduojančią serino proteazę; transkripcijos ir transliacijos terminacijos reguliavimo seką, kur minėti reguliavimo rajonai funkcionuoja minėtoje ląstelėje-šeimininke; ir selekcinį markerinį geną transformuotų ląstelių-šeimininkių atrankai;

augina minėtas transformuotas ląsteles-šeimininkes, turinčias minėtą ekspresijos bloką, selektyvinėse sąlygose, kur gauta transformuota kultūra yra laisva nuo netransformuotų ląstelių-šeimininkių ir

inkubuoja minėtą transformuotą kultūrą maitinimo terpėje, gaudami dėl to didesnę serino proteazės produkciją.

12. Būdas pagal 11 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėta ląstelė-šeimininkė yra laukinio tipo serino proteazės producentė.

13. Būdas pagal 11 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėta ląstelė-šeimininkė yra laukinio tipo serino proteazės producento mutantas.

14. Būdas pagal 13 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad minėtas mutantas nėra serino proteazės producentu.

15. Būdas pagal 12 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas alkalofilinis kamienas yra *Bacillus novo species* PB92.
16. Alkalofilinių ląstelių transformacijos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtų *Bacillus* ląstelių pradinį apdorojimą atlieka lizocimu šarminėje terpėje maždaug 20-37 C temperatūroje, kad susidarytų protoplastai;
minėtus protoplastus atskiria nuo minėto lizino,
apjungia minėtus protoplastus su DNR konstrukcija, dalyvaujant sujungimo reagentui maždaug 20-37 C temperatūroje,
praskiedžia minėtą reagentą, kad minėtos *Bacillus* ląstelės susijungtų ir regeneruotųsi ir augina minėtas regeneruotas *Bacillus* ląsteles selektyvinėse sąlygose.
17. Būdas pagal 16 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta DNR konstrukcija transkripcijos kryptimi turi transkripcijos ir transliacijos reguliacinę seką; DNR seką, koduojančią dominantį polipeptidą; ir terminacijos transkripcijos ir transliacijos reguliacinę seką, kur minėtos reguliacinės sekos funkcionuoja minėtoje ląstelėje-šeimininke.
18. Dominančio polipeptido produkcijos alkalofilinio *Bacillus* kamieno ląstelėje-šeimininke sustiprinimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad dalyvaujant sujungimo šarminiame pH reagentui, sujungia minėtos ląstelės-šeimininkės protoplastą ir plazmidinę konstrukciją, į kurią įeina DNR seka, koduojanti minėtos ląstelės-šeimininkės endogeninį fermentą, replikacinė sistema, funkcionuojanti minėtoje ląstelėje-šeimininke ir selektyvus markerinis genas, dėka ko minėta DNR įjungiama į minėtą ląstelę-šeimininkę;
minėtas ląsteles-šeimininkes, turinčias minėtą DNR, atrenka ir
minėtas ląsteles-šeimininkes augina sąlygomis, turinčiomis gerą poveikį minėto dominančio polipeptido sintezei.
19. Būdas pagal 18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėta ląstelė-šeimininkė yra *Bacillus novo species* PB92.
20. Būdas pagal 18 ar 19 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas endogeninis fermentas yra serino proteazė, geriausiai, stipriai šarminė proteazė.
21. Būdas pagal bet kurį iš punktų nuo 18 iki 20, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad bent jau viena minėtos DNR kopija yra įstatyta į ląstelę-šeimininkę.
22. DNR seka, koduojanti tokios aminorūgščių sekos polipeptidą:

H₂N-A-Q-S-V-P-W-G-I-S-R-V-Q-A-P-A-A-H-N-R-G-L-T-G-S-G-V-K-V-A-V-L-D-T-G-I-S-T-H-P-D-L-N-I-R-G-G-A-S-F-V-P-G-E-P-S-T-Q-D-G-N-G-H-G-T-H-V-A-G-T-I-A-A-L-N-N-S-I-G-V-L-G-V-A-P-N-A-E-L-Y-A-V-K-V-L-G-A-S-G-S-G-S-V-S-S-I-A-Q-G-L-E-W-A-G-N-N-G-M-H-V-A-N-L-S-L-G-S-P-S-P-S-A-T-L-E-Q-A-V-N-S-A-T-S-R-R-G-V-L-V-V-A-A-S-G-N-S-G-A-G-S-I-S-Y-P-A-R-Y-A-N-A-M-A-V-G-A-T-D-Q-N-N-N-R-A-S-F-S-Q-Y-G-A-G-L-D-I-V-A-P-G-V-N-V-Q-S-T-Y-P-G-S-T-Y-A-S-L-N-G-T-S-M-A-T-P-H-V-A-G-A-A-A-L-V-K-Q-K-N-P-S-W-S-N-V-Q-I-R-N-H-L-K-N-T-A-T-S-L-G-S-T-N-L-Y-G-S-G-L-V-N-A-E-A-A-T-R-COOH

23. DNR seka pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad koduoja serino proteazę, kilusią iš *Bacillus novo species* PB92.

24. Transformuotos *Bacillus* ląstelės-šeimininkės, b e s i s k i r i a n č i o s tuo, kad yra gautos pagal būdą, į kurį įeina:

DNR fragmento, turinčio geną, koduojantį serino proteazę, sugebantį ekspresuotis minėtoje ląstelėje-šeimininke, atskyrimas:

minėto DNR fragmento sujungimas su linijine vektorine DNR, norint gauti vektorių, turintį minėtą geną ir selekcijos markerį;

protoplasto, paruošto iš ląstelės-šeimininkės, sujungimas su minėtu vektoriumi, esant sujungimo šarminiame pH reagentui, ir dėka to minėtas genas įvedamas į minėtą ląstelę-šeimininkę ir įstato į minėtos ląstelės-šeimininkės chromosomą;

ląstelių-šeimininkių, stabiliai turinčių minėtą geną, atrinkimas.

25. Transformuota *Bacillus* ląstelė-šeimininkė pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta *Bacillus* yra *Bacillus novo species* PB92.

26. Transformuota *Bacillus* ląstelė-šeimininkė pagal 24 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėtu vektoriumi yra pMAX-4.

27. Plazmidė pMAX-4.

28. Išskirtas DNR arba RNR oligonukleotidas, turintis seką bent jau iš 15 nukleotidų, atrinktų iš nukleotidų, galinčių hibridizuotis su seka, kuri koduoja stipriai šarminės serino proteazės, gaunamos iš *Bacillus novo species* PB92, aminorūgščių seką.

29. Oligonukleotidas pagal 28 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi radioaktyvią žymę.

30. Oligonukleotidas pagal 28 arba 29 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi seką bent jau iš 20 nukleotidų.