

(19)



(10)

LT 4628 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4628**

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 9/06**

(21) Paraiškos numeris: **99-051**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 05 11**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 10 25**

(45) Patento paskelbimo data: **2000 02 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/ES98/00262**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 09 24**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 05 11**

(31, 32, 33) Prioritetas: **P 9702008, 1997 09 25, ES**

(72) Išradėjas:

**Jose Luis Garcia-Lopez, ES
Estrella Cortes-Rubio, ES
Jorge Alonso-Palacios, ES
Encarnacion Mellado-Duran, ES
Bruno Díez-García, ES
Jose Manuel Guisan-Seijas, ES
Francisco Salto-Maldonado, ES
Jose Luis Barredo-Fuente, ES**

(73) Patento savininkas:

ANTIBIOTICOS S.A.U., Avda. Antibioticos 59/61, 24080 Leon, ES

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Cefalosporano 7beta-(4-karboksibutanamido)rūgšties fermentinis gavimo būdas, panaudojant modifikuotą *Trigonopsis variabilis* D-aminorūgšties oksidazės fermentą, produkuotą *Escherichia coli*

(57) Referatas:

Aprašytas cefalosporano 7beta-(4-karboksibutanamido)rūgšties fermentinis gavimo būdas panaudojant modifikuotą *Trigonopsis variabilis* D-aminorūgšties oksidazę, produkuotą *Escherichia coli*. Šio fermento ekspresijos būdas apima: (I) DNR, atitinkančios geno, kuris koduoja D-aminorūgšties oksidazę, išskyrimą; (II) introno, kuris yra šiame gene, pašalinimą; (III) gauto DNR fragmento įterpimą į plazmidę, kuri gali replikuotis *Escherichia coli*; (IV) sintetinio assemblerio, turinčio šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką, prijungimą geno struktūrinės srities 5' gale; (V) *Escherichia coli* kamieno transformavimą gauta rekombinantine plazmide; (VI) transformuotų *Escherichia coli* ląstelių auginimą; ir (VII) D-aminorūgšties oksidazės išskyrimą iš gautos kultūros, panaudojant giminingumo chromatografiją.

IŠRADIMO SRITIS

Šis išradimas yra susijęs su 7 β -(4-karboksibutanamido)cefalosporano rūgšties fermentiniu gavimo būdu. Konkrečiau, jame aprašomas geno, kuris koduoja fermentą, turintį D-aminorūgšties oksidazės aktyvumą, išskyrimo būdas, panaudojant rekombinantines DNR metodikas, šio geno klonavimas *Escherichia* rūšies mikroorganizme, šio fermento modifikavimas baltymų inžinerijos metodais, šio modifikuoto fermento hiperprodukavimas minėto mikroorganizmo fermentavimo būdu ir modifikuoto fermento ekstrahavimas norint gauti 7 β -(4-karboksibutanamido)cefalosporano rūgštį. Ši rūgštis yra tarpinis junginys 7-aminocefalosporano rūgšties, kuri savo ruožtu yra žinomas tarpinis junginys gaminant daugybę cefalosporinų šeimos priešbakterinių agentų, gamyboje.

ANKSTESNIS TECHNIKOS LYGIS

7 β -(4-Karboksibutanamido)cefalosporano rūgštis, dar vadinamos glutaril-7-aminocefalosporano rūgštimi (toliau žymima GL-7ACA), gamyboje iš cefalosporino C yra žinomas D-aminorūgšties oksidazės fermento (toliau žymima DAO) iš įvairių mikroorganizmų, kaip antai *Trigonopsis variabilis* (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1993) 31:709), *Rhodotorula gracilis* (J. Biol. Chem. (1994) 269:17809) ir *Fusarium solani* (J. Biochem. (1990) 108:1063), panaudojimas. DAO gavimas panaudojant šiuos mikroorganizmus turi daug trūkumų. Pirmiausia aktyvios DAO produkcijos lygis yra labai žemas, o antra vertus, kartu su minėtu fermentu yra stebimi kitokie nepageidautini fermentiniai aktyvumai, kaip antai esterazių ir katalazių.

Pirmasis skaldo GL-7ACA rūgštį, sumažindamas išeigą ir tuo pačiu padidindamas gryninimo proceso kainą. Antrasis aktyvumas suardo vandenilio peroksida, kurio reikia katalizei, ir todėl reikia pridėti šio junginio, kas taip pat didina šio proceso kainą, o be to sumažina fermento aktyvumą ir jo pakartotino panaudojimo galimybes. Norint išvengti tokio fermentinio užterštumo, reikia išgryninti aktyvią DAO, o tai labai padidina kainas ir apsunkina GL-7ACA gavimo iš cefalosporino fermentinį procesą.

Neseniai buvo aprašytas geno, kuris koduoja DAO *T. variabilis* ir jį ekspresuoja *E. coli* ir *T. variabilis*, išskyrimo būdas (Japonijos eksponuota patentinė paraiška Nr. 71180/1988; Europos patentinė paraiška Nr. 93202219.7, publikacijos Nr. 0583817A2). Be to, genas, kuris koduoja *F. solani* aktyvią DAO, taip pat buvo klonuotas ir ekspresuotas *E. coli* ir *Achremonium chrysogenum* (Japonijos eksponuota patentinė paraiška Nr. 2000181/1990; J. Biochem. (1990) 108:1063; Bio/Technology (1991) 9:188), o dar vėliau genas, kuris koduoja DAO *R. gracilis*, buvo klonuotas ir ekspresuotas *E. coli* (Ispanijos patentas P9600906).

Išeinant iš didelio susidomėjimo išgryninta aktyvia DAO, skirta pramoninei GL-7ACA gamybai, šis išradimo pagrindinis tikslas buvo gauti DAO aktyvumą turintį fermentą, kurį galima lengvai išgryninti. Šia prasme yra žinoma, kad vienas iš efektyviausių baltymų gryninimo būdų yra giminingumo chromatografijos panaudojimas (Sassenfeld, H. M. (1990) Trends Biotechnol. 8:88). Šiam tikslui reikia surasti chromatografinį adsorbentą, kuris leistų selektyviai surišti ir/arba eliuuoti dominantį baltymą. Toks chromatografinis adsorbentas turi turėti tokią minėtą baltymą atpažįstančią molekulę arba ligandą, kad baltymo sąveika su ligandu būtų specifinė ir pakankamai stipri, ir leistų selektyviai eliuuoti šį baltymą. Giminingumo chromatografijos adsorbentų sukūrimas nėra paprastas, ir iki šiol nėra aprašytų būdų, duodančių galimybę išgryninti aktyvų DAO fermentą per vieną stadiją.

Be to, yra žinoma, kad tam tikri genetinės inžinerijos būdai duoda galimybę modifikuoti baltymus, pagerinant individualias savybes, kurios palengvina jų gryninimą. Tokiu būdu, baltymo struktūrai modifikuoti buvo ištobulintos įvairios sistemos, suteikiančios galimybę gryninti jį giminingumo

chromatografijos metodu (Sii, D. and Sadana, A. (1991) J. Biotechnol. 19: 83; Narayanan, S. R. and Crane, L. J. (1990) Trends Biotechnol. 8: 12; Scouten, W. H. (1991) Curr. Opinion Biotechnol. 2: 37; Sassenfeld, H. M. (1990) Trends Biotechnol. 8: 88). Iš esmės tokios modifikacijos pasireiškia polipeptido, kuris turi specifines sąveikos su tam tikru chromatografiniu adsorbentu savybes, prijungimu prie baltymo, ir tai suteikia sulietam baltymui galimybę būti išgrynintam giminingumo chromatografijos metodu. Viena iš tokių modifikacijų yra polihistidininės sekos prijungimas prie aptariamo baltymo, kuri suteikia sulietam baltymui galimybę būti gryninamam giminingumo chromatografijos metodu naudojant adsorbentą, turintį divalenčio metalo jonų (Arnolds, F. H. (1991) Bio/technology 9: 151; Hochuli et al. (1988) Bio/technology 6: 1321).

Nors sulietų baltymų gavimas, norint pagerinti jų gryninimo savybes, iš principo yra paprastas ir efektyvus metodas, jo pagrindinis trūkumas pasireiškia tuo, kad baltymo pirminės struktūros modifikavimas sukelia pokyčius, kurie gali turėti svarbų poveikį jo antrinei, tretinei ir ketvirtinei struktūrai. Tokie struktūriniai pokyčiai gali paveikti baltymą tokiu laipsniu, kad jis visiškai arba dalinai praranda savo funkcionalumą, paversdami jį baltymu, kuris nebetinka numatomai funkcijai atlikti. Todėl sulieto baltymo gavimas visada yra susijęs su dideliu neapibrėžtumu, nes galutinis rezultatas yra labai neprognozuojamas, ypač kai vykdomas pirmas suliejimo eksperimentas, t.y. kai ankstesnių suliejimų rezultatas nėra žinomas. Būtent tokio galutinio rezultato neapibrėžtume ir yra sulieto baltymo gavimo būdo naujumas, nes šiuo metu negalima tiksliai numatyti, kas atsitiks, kai bus atliktas baltymo suliejimo eksperimentas.

Mokslinėje literatūroje nėra aprašyta jokio *T. variabilis* DAO fermento, kuris yra modifikuotas taip, kad būtų galima jį išgryninti per vieną stadiją ir kad jį būtų galima hiperprodukuoti veiklioje formoje arba *E. coli*, arba kitame mikroorganizme, gavimo būdo.

SMULKUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šio išradimo aprašymą reikia pradėti nuo mielių *T. variabilis* ATCC 20931, kurios yra dezoksiribonukleino rūgšties (toliau žymimos DNR) donorius. Gavus mielių genominę DNR (kurioje yra genas, turintis susijusią su DAO genetinę informaciją, toliau vadinamas *dao* genu), ji buvo naudojama DNR bibliotekai konstruoti *E. coli*, naudojant fago vektorių λ -GEM12. Šios DNR bibliotekos analizė buvo atliekama pagal standartines hibridizacijos metodikas, mėginiais naudojant sintetinius oligonukleotidus, sukonstruotus remiantis panašumo sritimis, rastomis skirtingose DAO. Tokiu būdu buvo išskirta eilė *E. coli* rekombinantinių klonų, kuriuose buvo *T. variabilis* DNR fragmentas, koduojantis *dao* geną. Taip gautas DNR fragmentas buvo perklonuotas į plazmidinį vektorių, gautą iš *E. coli* kamieno. Rekombinantinis vektorius buvo panaudotas DNR fragmento, kuriame yra *T. variabilis dao* genas, sekai gauti (SEQ ID NO:1). Minėtos sekos analizė leido apibūdinti *dao* geną, kuris susideda iš dviejų egzonų ir vieno introno.

Kadangi anksčiau gautas DNR fragmentas, turintis *T. variabilis dao* geno genominę seką, turi vieną introną, jo negalima naudoti tiesiogiai ekspresijai *E. coli*. Todėl buvo dedamos pastangos gauti *dao* geną, kuris neturėtų minėto introno. Šiam tikslui *dao* genas buvo amplifikuotas PGS būdu, naudojant du sintetinius oligonukleotidus. Pirmasis iš jų buvo sukonstruotas taip, kad jame būtų tokie elementai: ribosomos surišimo vieta, translacijos inicijavimo vieta, pilna pirmojo egzono seka ir antrojo egzono 5' galo pirmieji nukleotidai. Antrasis oligonukleotidas turėjo komplementarią 3' galo seką, atitinkančią *dao* geno antrąjį egzoną, įskaitant translacijos užbaigimo kodoną. Į šiuos sintetinius oligonukleotidus taip pat buvo įvestos skirtingos restrikcijos vietos, tinkančios DNR fragmentų klonavimui. Tokiu būdu buvo gautas naujas DNR fragmentas, kuris po išskyrimo buvo klonuotas į *E. coli* plazmidinį vektorių (Fig.1). Po to, naudojant anksčiau sukurtus restrikcijos taikinius, DNR fragmentas, turintis pilną *dao* geną be introno, buvo įklonuotas į įvairius *E. coli* plazmidinius vektorius, kurie turėjo promotorius, suteikiančius galimybę ekspresuoti genus šiame šeimininke-

bakterijoje. Įvairių klonų produkuotos DAO aktyvumas buvo nustatomas panaudojant kalorimetrines metodikas ir HPLC chromatografiją. Tokiu būdu buvo gauti rekombinantiniai *E. coli* klonai, kurie gamina didelį kiekį aktyvaus DAO fermento.

Po to *dao* genas buvo modifikuojamas prijungiant nukleotidų seką, koduojančią polihistidiną. Šiam tikslui *dao* geną turinti plazmidė karpoma restrikcijos fermentu, kuris įkerpa transliacijos iniciacijos kodoną, ir perkirpimo metu atsiradę DNR galai atbukinami *E. coli* DNR polimerazės I Klenovo fragmentu. Po to jie sujungiami sintetiniu linkeriu, kuriame yra polihistidino kodonai, su kuriais buvo pagaminta plazmidė, turinti modifikuotą *dao* geną jos koduojančios srities 5' gale (SEQ ID NO:2). Taip gauta rekombinantinė plazmidė buvo transformuota į *E. coli* kamieną ir atrinkta pagal hibridizacijos metodikas, mėginiais panaudojant polihistidininio linkerio oligonukleotidus. Norint patikrinti ar teisingai buvo produkuotas norimas suliejimas, buvo nustatyta modifikuoto *dao* geno seka.

Po to buvo tiriamas modifikuotos polihistidinu DAO (toliau žymima hisDAO) produkavimas, naudojant įvairius *E. coli* kamienus kaip anksčiau sukonstruotų plazmidžių šeimininkus. Šiuo būdu buvo patikrinta ar hisDAO fermentas yra aktyvus.

Norint produkuoti hisDAO panaudojant anksčiau atrinktus rekombinantinius *E. coli* klonus, jie buvo auginami terpėje, turinčioje anglies šaltinį, azoto šaltinį ir mineralinių druskų. Inkubavimo temperatūra buvo tarp 18 °C ir 37 °C, o pH turi būti palaikomas tarp 5 ir 9. Mažo masto fermentacijai gali būti naudojamos įvairios talpos (nuo 50 ml iki 1000 ml) kolbos, kuriose terpės kiekis yra tarp 10 % ir 50 % kolbos tūrio. Fermentacijos trukmė gali būti 12-90 val. ribose.

DAO produkavimas, panaudojant šį rekombinantinį mikroorganizmą, gali būti pagerinamas, jeigu parenkamos auginimo sąlygos, tinkamos rekombinantinio vektoriaus stabilumui palaikyti, o tai pasiekama į auginimo terpę pridedant antibiotikų, kuriems *dao* geną turintis rekombinantinis vektorius turi atsparumo markerį (ampicilino, chloramfenikolio, kanamicino, tetraciklino ir t.t.). Nekalbant apie produkavimo stabilizavimą, tai apsaugo nuo

auginimo terpės užteršimo kitais nepageidaujamais mikroorganizmais ir taip pat pašalina kamienus, kurie pradėję rekombinantinį vektorių stabdo DAO produkavimą.

Rekombinantinės hisDAO produkuojančios ląstelės buvo atskirtos nuo kultivavimo terpės centrifuguojant ir buvo suardytos arba padarytos laidžiomis cheminiais, fermentiniais arba mechaniniais būdais. Norint gauti didesnio grynumo fermentinį ekstraktą, hisDAO buvo gryninama vienastadijiniu giminingumo chromatografijos metodu naudojant Co^{2+} -IDA kolonėles. Šiam tikslui negrynintas fermentinis ekstraktas buvo užpilamas ant Co^{2+} -IDA dervos, ir baltymai-priemaišos eliuuojami plaunant 20 mM fosfatinio buferiu, pH 7,0, kuriame yra 0,2 M NaCl. Po to hisDAO fermentas eliuojamas plaunant 10 mM imidazolu.

Jeigu vietoj Co^{2+} -IDA chromatografiniu adsorbentu yra naudojamas Cu^{2+} -IDA arba Zn^{2+} -IDA, hisDAO fermentas išlieka stipriai prijungtas prie matricos aktyvioje formoje ir jo negalima eliuoti didelėmis imidazolo koncentracijomis. Šiuo atveju adsorbentas, jį tinkamai išplovus pašalinant baltymus-priemaišas, gali būti naudojamas kaip imobilizuota fermentinė sistema.

Naudojant išskirtą iš rekombinantinių *E. coli* klonų, kurie ekspresuoja chimerinį geną, hisDAO, iš cefalosporino C buvo gauta GL-7ACA.

Dializuoti ir sukonzentruoti fermentiniai ekstraktai, gauti po chromatografijos per Co^{2+} -IDA adsorbentą, taip pat gali būti imobilizuojami įvykdant reakciją su kitais tinkamais inertiniais kietais nešikliais, ir imobilizuotas hisDAO gali būti naudojamas cikliniame procese.

Šio išradimo naujumas yra tame, kad pirmą kartą *T. variabilis* mielių fermentas DAO, modifikuotas kaip hisDAO, gali būti ekspresuojamas aktyvioje formoje prokariotiniame organizme, tokiame kaip *E. coli*, ir gali būti išgryninamas giminingumo chromatografijos metodu per vieną stadiją. Be to, buvo gautas DAO produkavimo padidėjimas, lyginant su kiekiu, gaunamu *T. variabilis*, o tai palengvina šio fermento panaudojimą pramoniniu mastu. Galimybė produkuoti hisDAO įvairiuose *E. coli* kamienuose, kurie neturi nepageidautinų fermentų, tokių kaip katalazė arba esterazės, o taip pat

galimybė pagerinti jos stabilumą ir katalitines savybes, panaudojant papildomus baltymų inžinerijos metodus, yra kiti aspektai, kurie padidina šio patento naujumo sąvoką.

Šis išradimas, jo neapribojant, smulkiau bus pailiustruojamas pavyzdžiais, kurie aprašomi toliau.

1 PAVYZDYS

1. DAO aktyvumo tyrimas

DAO aktyvumo tyrimas buvo atliekamas pagal anksčiau aprašytą metodiką (J. Biol. Chem. (1967) 242: 3957) substratu naudojant D-fenilgliciną (25 mM). Inkubacija buvo vykdoma 50 mM fosfatiniame buferyje, pH 8,0, 15-30 min., sustabdant reakciją 1/10 tūriu grynios acto rūgšties. Optinio tankio (OD) pokytis esant 252 nm bangos ilgiui atspindi fermento aktyvumą, priimant dėmesin, kad 89,77 nmol reakcijoje susidariusios benzoilskruzdžių rūgšties OD₂₅₂ yra 1,0.

2. DNR vektorių ir transformacijai skirtų imlių *E. coli* ląstelių gavimas

Plazmidiniai vektoriai pBluescript I KS (+) (Ap^r) (Stratagene) ir pKK233.2 (Ap^r) (Pharmacia) buvo gauti šarminės lizės metodu (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Šiam tikslui aukščiau minėtas plazmidės turintys *E. coli* kamienai buvo inkubuojami 16 val. maišant sukamu 250 aps./min. maišikliu 37 °C temperatūroje 500 ml LB su 100 µg/ml ampicilino. Šiuo metodu gauta plazmidės DNR buvo gryninama centrifuguojant CsCl gradientu.

Imliosios *E. coli* TG1 ir *E. coli* DH5α ląstelės buvo gautos pagal RbCl metodiką (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA).

3. Donorinės DNR, turinčios su DAO produkavimu susijusią genetinę informaciją, gavimas

T. variabilis ATCC 20931 kamienas buvo kultivuojamas YMPG terpėje (0,3 % salyklo ekstrakto, 0,3 % mielių ekstrakto, 0,5 % peptono ir 1 % gliukozės). Inkubavimas buvo vykdomas 36 val. ($OD_{660} = 5,0$) maišant sukamu 250 aps./min. maišikliu 30 °C temperatūroje.

Po to ląstelės buvo nusodinamos, plaunamos ir lizuojamos zymoliaze, o DNR buvo ekstrahuojama pagal anksčiau aprašytą metodiką (Sherman et al. (1986) Laboratory Course for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Norint pasiekti didesnį grynumą, DNR buvo veikama RNaze, keletą kartų ekstrahuojama fenoliu ir chloroformo-izoamilio alkoholio mišiniu 24/1 (CIA), ir nusodinama izopropanoliu. Nusodinta DNR buvo plaunama 100 % etanoliu ir 70 % etanoliu, ir ištirpinama 10 mM Tris-HCl buferyje, pH 7,5, turinčiame 1 mM EDTA (TE buferyje).

2 PAVYZDYS

1. *T. variabilis* DNR bibliotekos konstravimas

T. variabilis ATCC 20931 kamieno pilna DNR buvo gauta pagal 1 pavyzdžio 3 dalyje aprašytą metodiką. Minėtos DNR 300 µg buvo dalinai sukarpoma 20 vienetų *Sau3A* 600 µl reakcijos tūryje 37 °C temperatūroje, ir atitinkamai po 45 sekundžių, 1 minutės ir 2 minučių paimamos 3 alikvotos sustabdant karpymą šalta 20 mM EDTA. Patikrinus sukarpymus 0,7 % agarozės gelyje, mėginiai buvo sumaišomi, pašildomi 10 min. 68 °C temperatūroje, leidžiama lėtai atvėsti iki kambario temperatūros ir užpilama ant 38 ml (10-40 %) sacharozės gradiento. Šis gradientas centrifuguojamas 24 val. 15 °C temperatūroje esant 26000 aps./min., surenkamos 0,5 ml alikvotos, ir 10 µl šių alikvotų analizuojama 0,4 % agarozės gelyje. Alikvotos, kurių DNR yra 18-22 kb dydžio, sumaišomos ir praskiedžiamos distiliuotu vandeniu iki maždaug 10 % sacharozės. Po to ši DNR nusodinama etanoliu, resuspenduojama 50 µl TE buferio ir 3 µl pastarojo tirpalo analizuojama 0,4 % agarozės gelyje. Analizė šiame gelyje patvirtina, kad yra tinkamas DNR fragmentų dydis ir kad jų koncentracija yra maždaug 50 ng/µl.

Lygiagrečiai, pagal anksčiau aprašytas metodikas su nedideliais pakeitimais (Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) pagaminama bakteriofago λ -GEM12 DNR. Šiam tikslui *E. coli* NM538 kamienas (Promega) buvo auginamas 10 val. NZCYM-0,2 % maltozėje ir jo OD buvo matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui. Kultūros, atitinkančios 3×10^9 ląstelių, tūris buvo centrifuguojamas staline centrifuga 10 min. 4 °C temperatūroje esant 4000 aps./min. ir resuspenduojamas 1,2 ml SM buferio. Į šias ląsteles pridedama 3×10^7 plokštelių sudarančių vienetų (pfu) λ -GEM12 fago, ir mišinys inkubuojamas 30 min. 37 °C temperatūroje nemaišant. Kiekviena pašildyta iki 37 °C temperatūros kolba (500 ml tūrio su 100 ml NZCYM-0,2 % maltozės terpės) inokuliuojama 200 μ l šių infekuotų ląstelių. Minėtos kolbos inkubuojamos 37 °C temperatūroje tol, kol prasideda kultūros lizavimasis (5-6 val.). Lizatai veikiami DNaze (1 μ g/ml) ir RNaze (2 μ g/ml) 45 min. kambario temperatūroje. Po to 100-ui ml lizato pridedama 5,8 g NaCl, ir mišinys laikomas 60 min. lede. Po šio laiko lizatas nufiltruojamas, norint pašalinti ląstelių liekanas, ir 100-ui ml lizato pridėjus 20 ml 50 % PEG-6000 mišinys laikomas 60 min. lede ir centrifuguojamas 20 min. 4 °C temperatūroje esant 10000 x g. Nuosėdos resuspenduojamos 1 ml TE buferio ir ekstrahuojamos du kartus CIA, norint pašalinti PEG-6000 liekaną nesuardant fago. Po to ekstrahuojama du kartus neutraliu fenoliu, vieną kartą - fenoliu-CIA ir vieną kartą - CIA. Į vandeninę fazę pridedama NaCl iki 0,5 M (pridedant 4M NaCl), ir DNR nusodinama dviem tūriais etanolio -20 °C temperatūroje. Po 20 min. centrifugavimo minicentrifuga 4 °C temperatūroje esant 12000 aps./min., nusodinta DNR plaunama 70 % etanolio, džiovinama ir resuspenduojama 50 μ l TE buferio.

50 μ l bakteriofago DNR buvo karpoma endonukleazėmis *Bam*HI ir *Xba*I 37 °C temperatūroje 2 valandas. Šis dvigubo karpymo mišinys buvo ekstrahuojamas fenoliu-CIA ir CIA, nusodinamas etanolio ir resuspenduojamas 50 μ l TE buferio. Atskyrus 2 μ l alikvotą, į liekaną pridedama $MgCl_2$ iki 10 mM koncentracijos ir inkubuojama 1 val. 42 °C temperatūroje norint paskatinti vektoriaus atšakų susijungimą lipniais galais.

Vėl buvo atskirta 2 μ l frakcija, kuri buvo analizuojama kartu su pirmesniaja 0,5 % agarozės gelyje. Patvirtinus, kad susijungimas lipniais galais įvyko reikiamu būdu, mišinys supilamas ant 38 ml sacharozės gradiento (10-40 %). Šiuo atveju, prieš pilant ant gradiento DNR nebuvo šildoma 68 °C temperatūroje, nes tai atskirtų fago lipnius galus. Šis gradientas buvo centrifuguojamas 15 °C temperatūroje 24 val. 26000 aps./min. greičiu, po to surenkamos 0,5 ml alkivotos. Išanalizavus 15 μ l kiekvienos iš šių alikvotų 0,5 % agarozės gelyje, frakcijos, kuriose nebuvo nebūtino centrinio fragmento arba "šlamšto", buvo sumaišytos ir praskiestos distiliuotu vandeniu iki maždaug 10 % sacharozės koncentracijos. Ši DNR buvo nusodinama etanoliumi, resuspenduojama 50 μ l TE, ir 2 μ l pastarojo tirpalo buvo analizuojama agarozės gelyje (0,5 %), norint patvirtinti, kad nėra centrinio fragmento ir kad jos apytikrė koncentracija yra 100 ng/ μ l.

Po to buvo atlikta eilė ligavimų, naudojant 0,25 μ g intarpo ir 0,25-0,75 μ g ribose esančius vektoriaus kiekius, keičiant intarpo/vektoriaus santykį. Reakcijų mišiniai buvo inkubuojami 12-14 °C temperatūroje 16 valandų. Patvirtinus 0,4 % agarozės gelyje, kad pasirodė DNR fragmentai (gauti ligavimo reakcijoje) didesni nei vektorius arba intarpas, visi ligavimo reakcijų mišiniai sumaišomi, nusodinami etanoliumi ir resuspenduojami 4 μ l ligavimo buferio.

Gautos po ligavimo rekombinantinės fago DNR pakavimas buvo vykdomas su Packagene (Promega) "in vitro" pakavimo ekstraktais. Pakavimo reakcijos rezultatas, resuspenduotas 500 μ l SM, buvo naudojamas infekuoti *E. coli* NM538 esančių fagų skaičiaus nustatymui, ir *E. coli* NM539 (Promega) - rekombinantinių fagų procentinio kiekio nustatymui. *E. coli* NM539 yra fago P2 lizogeninis kamienas ir duoda tik lizės plokštes, jeigu fage, kuris jį infekuoja, nėra nebūtinos centrinės srities. Sukonstruota DNR biblioteka turėjo apie 200000 pfu ir apie 85 % fagų turėjo egzogeninį DNR fragmentą.

Atlikus šiuos skaičiavimus, buvo infekuota *E. coli* NM539 ir pilna genetinė biblioteka paskleista ant 150 mm skersmens Petri lėkštelių.

2. Klonų, kurie turi *dao* geną, identifikavimas

Pilna DNR biblioteka buvo perkelta į nitroceliuliozės filtrus ir pagal anksčiau aprašytą hibridizacijos metodiką (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) buvo atrinkti teigiami klonai. Atrinkimas buvo pradėtas nuo nitroceliuliozės filtrų prehibridizacijos inkubuojant juos 42 °C temperatūroje 3 val. hibridizacijos buferyje. Hibridizacija buvo vykdoma pašalinant prehibridizacijoje naudotą buferį ir įvedant naują hibridizacijos buferį kartu su 10 pmol oligonukleotido OA (5'-TCTTGTCTCGACACC-3') ir OB (5'-GACGTGGATTGTCAACTG-3'), pažymėtų jų 5' gale ³²P panaudojant fago T4 polinukleotidinę kinazę ir [γ -³²P]ATP (ICN Biochemicals) pagal standartines metodikas (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA). Filtrai buvo inkubuojami 42 °C temperatūroje 16 valandų ir plaunami du kartus po 20 min. kambario temperatūroje 2 x SSC-0,1 % SDS, o po to plaunama dar du kartus tokį patį laiką hibridizacijos temperatūroje 0,1 x SSC-0,1 % SDS buferiu. Po to nitroceliulioziniai filtrai buvo eksponuojami su Hyperfilm-MP (Amersham) po amplifikacijos ekranais -70 °C temperatūroje 48 valandas.

Pabaigus prehibridizaciją, hibridizaciją, plovimus ir autoradiografiją, buvo atrinkti 63 klonai, kurie davė teigiamus signalus su abiem mėginiais - OA ir OB. Tik 9 iš teigiamų lizės plokštelių buvo surinktos atskirai panaudojant Pastero pipetę ir kiekviena iš jų buvo resuspenduota 1 ml SM plius 50 μ l chloroformo. Po to buvo titruojami šiame tirpale esantys fagai. Šiam tikslui reikėjo praskiesti minėtus fagus 5000 kartų, norint užtikrinti, kad jeigu bus infekuojama 20 μ l šio mišinio, lizės plokštelių skaičius Petri lėkštei bus tarp 500 ir 1000. Perkėlus kiekvienos Petri lėkštelės turinį ant atinkamo nitroceliuliozinio filtro, pastarasis buvo vėl hibridizuojamas su tais pačiais OA ir OB mėginiais. Autoradiografija parodė, kad tarp 20 ir 50 % fagų iš kiekvienos Petri lėkštelės davė teigiamą signalą. Todėl reikėjo išgyninti kiekvieną teigiamą fagą, panaudojant trečią hibridizacijos ciklą. Šiuo tikslu buvo panaudota Pastero pipetė teigiamoms lizės plokštelėms, kurios buvo

labiau atsiskyrę nuo kitų, arba kurios buvo apsuptos taip pat teigiamomis lizės plokštelėmis, surinkti, ir jos buvo resuspenduotos 1 ml SM plius 50 μ l chloroformo. Praskiedus fago tirpalą 100 kartų ir infekavus 15 μ l šio tirpalo, buvo gauti maždaug 300 lizės plokštelių/Petri lėkštei titrai. Pakartojus bandymą ankstesniems dviems ciklams identiškomis sąlygomis, buvo gautas rezultatas, kad 100 % fagų iš kiekvienos Petri lėkštelės buvo teigiami. Tokiu būdu buvo išgrynintos 9 nepriklausomos lizės plokštelės. Kiekviena lizės plokštelė buvo resuspenduota 100 μ l SM plius 10 μ l chloroformo, ir panaudojant 2 μ l šio tirpalo buvo gautos susijungusios lizės plokštelės turint tikslą amplifikuoti minėtus teigiamus fagus ant kietos terpės. Surinkus viršutinį agarozės sluoksnį ir resuspendavus jį 5 ml SM, buvo gauti kiekvieno teigiamo fago tirpalai, kurių koncentracija apytikriai 10^7 pfu/ μ l.

Naudojant Southern'o metodą (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA), aukščiau minėti oligonukleotidai OA ir OB buvo taip pat naudojami kaip mėginiai nustatyti genominės DNR fragmentams, kuriuose yra *T. variabilis* *dao* genas. Šiam tikslui buvo vykdoma hibridizacija su DNR, sukarpyta restrikcijos endonukleazėmis (Pharmacia) *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Xba*I ir *Xho*I ir frakcionuota agarozės gelyje žemiau aprašytomis sąlygomis. Agarozės gelis, kuriame buvo išskirstyti DNR fragmentai remiantis jų molekulių dydžiu, buvo iš eilės inkubuojamas kambario temperatūroje, silpnai maišant, 15 min. - 0,25 M HCl, 1 val. - denatūravimo tirpale ir 1 val. - neutralizavimo tirpale. Po to šis gelis buvo padėtas ant pluošto Whatman 3 MM filtro popierių, išmirkytų 10 x SSC, o ant jo buvo uždėtas tokių pačių kaip ir gelis išmatavimų BA85 nitroceliuliozės filtras (0,45 μ m) (Schleicher and Schuell), išmirkytas 2 x SSC, stengiantis, kad nesusidarytų burbuliukai. Ant šio nitroceliuliozės filtro buvo uždėti du lapai Watman 3MM popieriaus, išmirkyto 2 x SSC, ant jų uždėta 8-10 cm aukščio pluoštas tokių pačių išmatavimų sauso filtrinio popieriaus, o ant jų viršaus - maždaug 500 g svoris. Pernešimo procesas buvo vykdomas 16 valandų. Pernešus DNR, nitroceliuliozės filtras 5 minutėms buvo atsargiai panardintas į 6 x SSC, paliktas 1 valandą išdžiūti kambario temperatūroje ir laikomas tarp

dviejų Whatman 3 MM popieriaus lapų 80 °C temperatūroje vakuume 3 valandas, kad DNR prisitvirtintų prie filtro. Tada buvo prehibridizuojama ir hibridizuojama tomis pačiomis sąlygomis kaip aprašyta anksčiau DNR bibliotekos atrinkimui. Autoradiografijos rezultatai parodė, kad atsirado kiekvienam sukarpymui būdingos hibridizacijos juostos. Tiksliau sakant, šias juostas atitinkantis dydis buvo: 10,2 kb karpant *EcoRI*, 3,7 kb - *BamHI*, 3,5 kb - *HindIII*, 11,6 kb - *Knpl*, 11,3 kb - *PstI*, 4,8 kb - *PvuII*, 2,8 kb - *XbaI* ir 4,7 kb - *XhoI*.

3. DNR fragmento, kuris koduoja *dao* geną, klonavimas

Išgryninus fagų DNR, kaip nurodyta 2 pavyzdžio 1 dalyje bakteriofago λ -GEM12 atveju, ji buvo karpoma *SaI*, ir identifikuota 9,2 kb juosta, kuri buvo įklonuota į pBluescript I KS(+) plazmidę (Stratagene), sukarpomą panaudojant T4 fago DNR ligazę, ATP ir fermento tiekėjų rekomenduojamą buferį. Gautas ligavimo mišinys buvo inkubuojamas 5 val. 12 °C temperatūroje ir naudojamas imliosioms *E. coli* TG1 ląstelėms (Amersham) transformuoti. Transformantai buvo atrinkti kietoje LB terpėje, į kurią pridėta ampicilino (100 µg/ml), X-gal (40 µg/ml) ir 0,2 mM IPTG. Iš klonų, kurie rodo baltąjį selekcijos fenotipą, išskirta pALT1 plazmidė. Naudojant Sauthern'o metodiką ir OB mėginį, po to buvo lokalizuotas 3,7 kb *BamHI* fragmentas, įeinantis į pALT1 plazmidę. Šis *BamHI* fragmentas buvo įklonuotas į pBluescript I KS(+) plazmidę (Stratagene), sukarpytą *BamHI*. Tokiu būdu buvo išskirtos pALT2 ir pALT3 plazmidės, kurios abiejose orientacijose turi 3,7 kb *BamHI* fragmentą (Fig.1).

4. Fragmento, kuris turi *dao* geną, sekos nustatymas

Fragmento, esančio pALT2 plazmidėje, nukleotidų seka buvo nustatyta imant tą pačią plazmidę anksčiau aprašytu būdu (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5464), naudojant T7 DNR polimerazės rinkinį (Pharmacia) ir [³⁵S]dATP. Ši seka yra parodyta SEQ ID NO:1. Sekos analizė ir jos palyginimas su kitomis tarptautinėse duomenų bazėse (GeneBank/EMBL)

žinomomis sekomis parodė, kad klonuotas fragmentas koduoja *T. variabilis* *dao* geną.

3 PAVYZDYS

1. *dao* geno introno eliminavimas PGS būdu

0,15 µg DNR mėginys iš pALT2 plazmidės buvo sumaišytas su 10 µl (25 µM) kiekvieno iš šių oligonukleotidų: DAO1 (5'-CATGCCATGGCTAAAATCGTTGTTATTGGGGCCGGTGTTGCCGGTTTAAC-3'), kuris koduoja pirmojo egzono pilną seką ir antrojo egzono 5' galą ir turi *NcoI* restrikcijos vietą; ir DAO2 (5'-CCCAAGCTTCTAAAGGTTTGGACGAG-3'), kuris turi *HindIII* restrikcijos vietą ir 3' galo seką, atitinkančią *dao* geno antrąjį egzoną, įskaitant transliacijos baigmės kodoną. Į šį mišinį pridedama 2,5 vieneto Taq polimerazės (Perkin-Elmer) kartu su atitinkamu tiekėju rekomenduojamu buferiu, ir preparatas amplifikuojamas PGS elemente (Gene-ATAQ, Pharmacia), naudojant 30 ciklų, kiekviename cikle esant 95 °C (1 minutė), 50 °C (2 minutės) ir 55 °C (2,5 minutės). Amplifikacijos rezultatas įvertinamas nudažant etidžio bromidu po elektroforezės 1 % agarozės gelyje.

PGS būdu gautas fragmentas, kurio dydis apytikriai 0,9 kb, buvo gryninamas ekstrahuojant agarozės gelį, panaudojant β-agarazę (Biolabs) pagal gamintojų instrukcijas. 0,2 µg išgryninto fragmento buvo liguojama su 1µg M13tg130 vektoriaus (Amersham), sukarpyto *HincII* (Pharmacia), panaudojant T4 fago DNR ligazę (Amersham) esant ATP, naudojant tiekėjo rekomenduojamą buferį. Šiuo būdu buvo pagamintas M13DAO fagas (Fig.1), po to buvo nustatyta jo seka, norint patikrinti ar buvo pakankamai eliminuotas intronas. M13DAO fage esančio fragmento nukleotidų seka buvo nustatyta imant tą patį rekombinantinį fagą anksčiau aprašytu būdu (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5464), naudojant T7 DNR polimerazės rinkinį (Pharmacia) ir [³⁵S]dATP. Ši nukleotidų seka parodė, kad klonuotas fragmetas yra 0,9 kb dydžio ir turi *T. variabilis dao* geno seką be introno.

2. Neturinčio introno *dao* geno įklonavimas į pKK233.2

0,1 μg DNR mėginio iš pKK233.2 plazmidės buvo karpoma restrikcijos endonukleazėmis *Nco*I ir *Hind*III (Pharmacia) 37 °C temperatūroje tiekėjų rekomenduojamame buferyje 1 valandą ir norint sustabdyti reakciją pašildoma 10 min. 65 °C temperatūroje. Sukarpyta plazmidė sumaišoma su 0,2 μg M13DAO fago, sukarpyto tomis pačiomis aukščiau nurodytomis endonukleazėmis, ir abi DNR liguojamos, panaudojant T4 fago DNR ligazę (Amersham) esant ATP ir naudojant tiekėjo rekomenduojamą buferį.

Gautas ligavimo mišinys naudojamas imliosioms *E. coli* TG1 ląstelėms transformuoti. Transformantai buvo išskirti LB terpėje su ampicilinu (100 μg/ml). Pagal šią metodiką buvo gautas klonas, turintis rekombinantinę plazmidę pKDAO3 (Fig.1), kuris turi 0,9 kb DNR fragmentą, atsirandantį iš amplifikacijos PGS būdu, įterptą tarp pKK233.2 plazmidės *Nco*I ir *Hind* III vietų, t.y. ekspresuotą kontroliuojant *trc* promotoriui.

4 PAVYZDYS

1. Chimerinio DAO fermento, turinčio uodegą iš 6 histidinu, konstravimas

Norint į *T. variabilis* DAO fermento amino-galą įterpti polihistidininę uodegą, 0,1 μg pKDAO3 plazmidės buvo karpoma restrikcijos endonukleaze *Nco*I (Pharmacia) 1 val. 37 °C temperatūroje tiekėjo rekomenduojamomis sąlygomis ir šildoma 10 min. 65 °C temperatūroje reakcijai sustabdyti. Taip sukarpyta plazmidė veikiama *E. coli* DNR polimerazės I Klenovo fragmentu (Pharmacia) pagal tiekėjo instrukcijas, po to šis mėginys šildomas 10 min. 65 °C temperatūroje reakcijai sustabdyti. Gauta ištiesinta plazmidė liguojama su DNR fragmentu, kuris turi 6 histidino liekanas koduojančią nukleotidų seką, panaudojant T4 fago DNR ligazę (Amersham), esant ATP ir naudojant tiekėjo rekomenduojamą buferį. Šešias histidino liekanas koduojantis fragmentas buvo gautas panaudojant 1,5 μg dviejų komplementarių oligonukleotidų, vadinamų HIS1 (5'-CATCATCACCACCATCACTT-3') ir HIS2 (5'-AAGTGATGGTGGTGATGATG-3'), mišinio, kuris buvo pakaitintas 100 °C

temperatūroje 5 minutes ir po to atvėsintas iki kambario temperatūros, kad susihybridizuotų susidarant dvigrandžiam DNR fragmentui.

Gautas ligavimo mišinys buvo panaudotas imliosioms *E. coli* TG1 ląstelėms transformuoti. Transformantai buvo išskirti LB terpėje su ampicilinu (100 µg/ml). Pagal šią metodiką buvo gautas klonas, turintis rekombinantinę plazmidę pKDAOHIS, kuris turi dao geną, prijungtą prie 18 nukleotidų sekos, koduojančios 6 histidino liekanas 5' gale. Norint patikrinti, ar pKDAOHIS plazmidė (Fig.1) turi laukiamą chimerinį konstruktą, buvo nustatyta seka imant tą pačią rekombinantinę plazmidę pagal anksčiau aprašytą metodiką (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5464), naudojant T7 DNR polimerazės rinkinį (Pharmacia) ir [³⁵S]dATP. Gauta seka parodyta SEQ ID NO:2.

pKDAOHIS plazmide transformuotas *E. coli* TG1 kamienas buvo fermentuojamas LB terpėje 20 val. 25 °C temperatūroje esant 250 aps./min. Po to ląstelės buvo surenkamos centrifuguojant, esant 5000xg, 10 min., suardomos ultragarsu ir tiriamas jų DAO aktyvumas pagal 1 pavyzdžio 1 dalyje aprašytą metodiką. Pagal šią metodiką gautos DAO aktyvumas buvo 350 vienetų/mg baltymo. Šiuo būdu buvo patvirtinta, kad taip gautas chimerinis DAO fermentas su histidinių grandine (hisDAO) yra aktyvus. Be to, naudojant SDS-poliakrilamidinio gelio elektroforezę buvo patvirtinta, kad, kaip ir buvo laukiama, hisDAO fermentas yra šiek tiek didesnis nei natyvus DAO fermentas. pKDAOHIS plazmide transformuotas *E. coli* TG1 kamienas buvo deponuotas Ispanijos tipinių kultūrų kolekcijoje (CECT), kuri yra Valensijos universiteto biologijos mokslų fakulteto mikrobiologijos departamente, 46100 Burjasot (Valencia), 1997.06.10 su depozito numeriu CECT4888.

5 PAVYZDYS

1. Agarozės-metalo chelato adsorbento gavimas

5,7 ml epichlorhidrino ir 11,4 ml etilenglikolio dimetilo eterio mišinys lėtai supilamas į 7 g agarozės CL6B suspensiją 57 ml 0,1 N NaOH tirpalo, turinčio 340 mg NaBH₄, ir suspensija lėtai maišoma be pertraukos 4 val. 25

°C temperatūroje. Taip gautas agarozė-epoksidas plaunamas dideliu kiekiu distiliuoto vandens ir sudedamas į tirpalą, pagamintą iš 2,5 ml 2M natrio iminodiacetato ir 19 ml 0,1 M natrio rūgščiojo karbonato buferio, pH 11. Ši suspensija lėtai maišoma be pertraukos 12 val. 25 °C temperatūroje. Pagaliau adsorbentas plaunamas distiliuotu vandeniu ir resuspenduojamas vandeniniame tirpale, kuriame yra norimo metalo druskos (5 mg/ml). Taip gautas agarozės-metalo chelato adsorbentas plaunamas dideliu kiekiu vandens ir paruošiamas tolimesniam naudojimui. Jeigu pridedama metalo druska yra CoCl_2 , gaunamas agarozės-kobalto chelato adsorbentas.

2. Chimerinio hisDAO fermento gryninimas panaudojant agarozės-kobalto chelato adsorbentą

Kolonėlė, kurioje yra agarozės-kobalto chelato adsorbentas, išlyginama 20 mM natrio fosfato buferiu (pH 7,0) ir 0,2 M NaCl. Į šią kolonėlę supilamas tirpus ląstelių ekstraktas, gautas taip kaip aprašyta ankstesniame pavyzdyje iš transformuotų pKDAOHIS plazmide *E. coli* TG1 ląstelių. Supylus šį ekstraktą, kolonėlė plaunama dideliu kiekiu to paties išlyginimo buferio, tokiu būdu iš ekstrakto pašalinant visus baltymus, išskyrus hisDAO, kuris lieka kolonėlėje. Po to hisDAO fermentas eliuuojamas, naudojant 20 mM natrio fosfato buferį, pH 7,0, kuriame yra 10 mM imidazolo. Surenkamos frakcijos, kuriose yra hisDAO fermento, ir dializuojama 20 mM natrio fosfato buferyje, pH 7,0. Taip pagamintas fermentas (9000 vienetų/mg) yra didesnio nei 90 % grynumo ir yra paruoštas naudoti cefalosporino C pavertimui į GL-7ACA.

SMULKUS FIGŪRŲ APRAŠYMAS

Fig.1. - pKDAOHIS plazmidės konstravimo būdas

Neturintis introno ir turintis *Nco*I vietą ATG, kuris koduoja baltymo pirmąjį metioniną, *dao* genas buvo gautas PGS būdu iš pALT2 plazmidės. Po to PGS būdu amplifikuotas fragmentas buvo įklonuotas prie M13tg130 vektoriaus *Hinc*II vietos, susidarant M13DAO. Iš M13DAO gautas *Nco*I-*Hind*III fragmentas buvo įklonuotas prie pKK233.2 plazmidės *Nco*I-*Hind*III vietų, susidarant pKDAO3. Ši plazmidė turi *dao* geną, ekspresuojamą kontroliuojant *E. coli trc* promotoriui. Galų gale buvo įvestas DNR fragmentas, koduojantis *dao* geno polihistidininę uodegą 5' gale, gaunant pKDAOHIS plazmidę.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Modifikuoto *Trigonopsis variabilis* D-aminorūgšties oksidazės fermento šeimininko (ne žmogaus) organizme gavimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis susidada iš tokių operacijų:

(a) DNR geno, kuris koduoja aktyvią D-aminorūgšties oksidazę šį fermentą gaminančiame bet kokio kamieno mikroorganizme, išskyrimo;

(b) introno, esančio minėtą gene, pašalinimo sintetinių oligonukleotidų ir polimerazinės grandinės sintezės (PGS) panaudojimu paremtos metodikos pagalba;

(c) (b) stadijoje gauto DNR fragmento įterpimo į plazmidę, kuri gali replikuotis šeimininko organizme;

(d) sintetinio assemblerio, turinčio šešis histidinus koduojančią nukleotidų seką, prijungimo introno neturinčio geno, kuris koduoja aktyvią D-aminorūgšties oksidazę, struktūrinės srities 5' gale;

(e) šeimininko organizmo transformavimo (d) stadijoje gauta rekombinantine plazmide;

(f) gauto (e) stadijoje organizmo transformuotų ląstelių auginimo tinkamoje kultivavimo terpėje D-aminorūgšties oksidazės gamimąsi užtikrinančiomis sąlygomis;

(g) D-aminorūgšties oksidazės išskyrimo iš (f) stadijoje gautos kultūros, panaudojant giminingumo chromatografiją.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad D-aminorūgšties oksidazės fermentą koduojantis genas yra *Trigonopsis variabilis* genas.

3. Būdas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šeimininko (ne žmogaus) organizmas yra *Escherichia coli*.

4. Būdas pagal bet kurį iš pirmesniųjų punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad giminingumo chromatografija, naudojama modifikuotam fermentui išskirti, yra paremta panaudojimu adsorbento divalenčių katijonų pagrindu.

5. D-aminorūgšties oksidazės fermentas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra modifikuotas, pagamintas ir išgrynintas bet kuriame iš pirmesniųjų punktų apibrėžtu būdu.

6. 7β -(4-karboksibutanamido)cefalosporano rūgšties fermentinės sintezės būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jame naudoja D-aminorūgšties oksidazės fermentą pagal 5 punktą.

7. Būdas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad cefalosporiną C veikia D-aminorūgšties oksidazės fermentu vandeninėje terpėje.

8. Būdas pagal 6 ir 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentinę reakciją vykdo su imobilizuotu D-aminorūgšties oksidazės fermentu.

SEKŲ SĄRAŠAS

<110> ANTIBIOTIKAI, S.A.V.

<120> "CEFALOSPORANO 7 β -(4-KARBOKSIBUTANAMIDO)RŪGŠTIES
FERMENTINIS GAVIMO BŪDAS PANAUDOJANT MODIFIKUOTĄ
TRIGONOPSIS VARIABILIS D-AMINORŪGŠTIES OKSIDAZĖS FERMENTĄ,
PRODUKUOTĄ *ESCHERICHIA COLI*"

<130> PCT-47

<150> ES 9702008

<160> 2

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 3668 bazių poros

<212> DNR

<213> *Trigonopsis variabilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1481... 1503, 1543...2506)

<223> *dao* genas

<220>

<221> Intronas

<222> 1504...1442

<220>

<221> CDS

<222> 2952...3668

<223> ORF 1

<400>

GGATCCTTAC	GAGGAAGATC	TGATAATGGA	GAATTCTCTC	GCTTTATGCC	ATGACTTGCA	60
GGTTCCCTCGG	GTAATGGAAC	CACTGACAAA	TCGGCTGCTT	GAGGTTTTGT	TCCCTTCAAC	120
ACTTCATCTT	CCAAGGTTCT	AATTCGTAGT	TTCTTCTCAT	TCAATAAAGC	TGCAAAACCGC	180
TCCAACATTT	GTAGATCATT	ATTCTTTGTC	TTCACGGCAA	CTGTATCTAG	TTCCTTCTGA	240
AGGTCCTTCG	TTTCTTTGGT	TAGTAGATCT	ACCATGCCAG	TTAAGCGATC	AATCTCCTCT	300
TGGACCTCCT	TCTTGAGTGA	TAGCTCTGAC	CAGAACCAAT	CAAAAAGAAC	ACCAGGATCG	360
GTACATGTTT	CTTGTCGGGA	TAGGGACAGT	GATCCCAAAG	TAATTGATAG	ATCCTGAACT	420
TTCTGGGTAA	TCGAGATAAT	AACCGAACTC	AAATCTTGTG	ATGGCTTGGC	GTTCATTTGA	480
ATGTTTTTCGC	TAGAAAGCCT	CGGACTCTTA	CGTTGGTCTT	CATCTGTAAG	CGACCGCGTG	540
AACAGTTGTT	GGAATAAGTC	ATTCCATTCA	CTTTCACCTT	GAGGACTTCT	ATTTGACCGT	600
AGATCTTTAA	TTGACTCATT	TCCAGTTACT	GAAAGTTAGC	TGGAAGCTTT	CAACATGTCC	660
TCACCAGAGG	TTTGATAGAG	GTCTAACGAT	GGCTTCATAC	AGGCTGTGAA	TGTGATTGTT	720
TCGCCAGTCT	CAACTCTGAC	GATCAAAACG	TTAGATCCAC	CAATCTCAAT	ACCGAAGAG	780
TTAATTTCGAC	TCATTGCTCA	ATATGATTGA	TCGC CGGGA	TGACATCGAA	GGTGACAAAC	840
GTACGCGAAA	GATGCGTGAC	GATAAGGACA	ACGACTAAGG	GAGTAGATGG	ACTGGGGAGT	900
GAAGGAAATG	TGAGACTAGA	GAAAAGCCAC	TGACTGAGAG	TAAACAGGCC	ATGATTAGAC	960
AATCAGCCAT	GACAGCACTA	TAACGTGATA	TGATAAGTAA	GGCTCTGTTG	CCCGCTGACG	1020
GCCAAACGGCT	GACGGCCAAC	TTGATGATTC	TACCACAAA	AATCATACGA	GAAGTCAACG	1080
AAAAGTCCTT	AGTTTGGAAT	TCCAGACATG	GCAGAATTTA	ACGGCCACTA	CAGTTGCGCG	1140
TTTCGTAAACG	AGACAAGTGA	CTCATGGCAG	CACCGTCTCA	GTCCACCGGT	CTAAAGCACT	1200
TGGTGCCAGA	TGAATTTGGA	AACTGTCACC	TTATAGAATT	ACTTTTGGAT	AGTTTGTGTA	1260
AGGCTGGAGA	CTTGTAAGCC	TGACTCAGTT	GACTCATCGG	CGAAAGCTTC	CTATCTTGGA	1320
GCTAAGATCG	CCTGATCGTT	TTGCCCTACT	TATCTTGGTT	GCATGAGTTG	GC CGGTGAGA	1380
GCCGCATTCT	AGCCAAAGGG	TTATAGCGTT	ACACTCTTGA	TAGGCAATC	CGTGCTGCGA	1440
TTATATATAA	GGCPAAAGTC	GATTCAACGG	ATCAATAAAA	ATG GCT AAA	ATC GTT	1495
				Met Ala Lys Ile Val		
				1	5	
GTT ATT GG	GTAAGTGCCT	TGATACCAGA	CGGCTGACAT	TTGTTTAG T	GCC GGT	1548
Val Ile Gly					Ala Gly	
					10	
GTT GCC GGT	TTA ACT ACA	GCT CTT CAA	CTT CTT CGT	AAA GGA	CAT GAG	1596
Val Ala Gly	Leu Thr Thr	Ala Leu Gln	Leu Leu Arg	Lys Gly	His Glu	
	15	20	25			
GTT ACA ATT	GTG TCC GAG	TTT ACG CCC	GGT GAT CTT	AGT ATC	GGA TAT	1644
Val Thr Ile	Val Ser Glu	Phe Thr Pro	Gly Asp Leu	Ser Ile	Gly Tyr	
	30	35	40			
ACC TCG CCT	TGG GCA GGT	GCC AAC TGG	CTC ACA TTT	TAC GAT	GGA GGC	1692
Thr Ser Pro	Trp Ala Gly	Ala Asn Trp	Leu Thr Phe	Tyr Asp	Gly Gly	
	45	50	55			
AAG TTA GCC	GAC TAC GAT	GCC GTC TCT	TAT CCT ATC	TTG CGA	GAG CTG	1740
Lys Leu Ala	Asp Tyr Asp	Ala Val Ser	Tyr Pro Ile	Leu Arg	Glu Leu	
	60	65	70			
GCT CGA AGC	AGC CCC GAG	GCT GGA ATT	CGA CTC ATC	AAC CAA	CGC TCC	1788
Ala Arg Ser	Ser Pro Glu	Ala Gly Ile	Arg Leu Ile	Asn Gln	Arg Ser	
	75	80	85		90	
CAT GTT CTC	AAG CGT GAT	CTT CCT AAA	CTG GAA GGT	GCC ATG	TGG GCC	1836
His Val Leu	Lys Arg Asp	Leu Pro Lys	Leu Glu Gly	Ala Met	Ser Ala	
	95	100	105			
ATC TGT CAA	CGC AAC CCC	TGG TTC AAA	AAC ACA GTC	GAT TCT	TTC GAG	1884
Ile Cys Gln	Arg Asn Pro	Trp Phe Lys	Asn Thr Val	Asp Ser	Phe Glu	
	110	115	120			
ATT ATC GAG	GAC AGG TCC	AGG ATT GTC	CAC GAT GAT	GTG GCT	TAT CTA	1932
Ile Ile Glu	Asp Arg Ser	Arg Ile Val	His Asp Asp	Val Ala	Tyr Leu	
	125	130	135			
GTC GAA TTT	GCT TCC GTT	TGT ATC CAC	ACC GGA GTC	TAC TTG	AAC TGG	1980
Val Glu Phe	Ala Ser Val	Cys Ile His	Thr Gly Val	Tyr Leu	Asn Trp	
	140	145	150			

[illegible]

CTA AAG TCC GCG AGT CAG GAA CAA GCA GAG ACC TCC TTT CGT GAC TCG	3203
Leu Lys Ser Ala Ser Gln Glu Gln Ala Glu Thr Ser Phe Arg Asp Ser	
425 430 435	
AAC GCT GGC GTC AAT GCT TTC AGC TGC GGG ACT ATA AAA GCC TTA GGA	3251
Asn Ala Gly Val Asn Ala Phe Ser Cys Gly Thr Ile Lys Ala Leu Gly	
440 445 450 455	
AAG AAT AGG ATG ACG ACG GTG GAA GAG AAG TGG GAA AAG GAA GTT AGA	3299
Lys Asn Arg Met Thr Thr Val Glu Glu Lys Trp Glu Lys Glu Val Arg	
460 465 470	
CGC GAT CAA ATT GGG TTC AAT GAA GCT ACT CTT AGA GCT CAT GAG ACT	3347
Arg Asp Gln Ile Gly Phe Asn Glu Ala Thr Leu Arg Ala His Glu Thr	
475 480 485	
ACC AGA GAA TGG TTA AAA TCC CAG ACT GGC GAA GCT GGG ACT AAA AGC	3395
Thr Arg Glu Trp Leu Lys Ser Gln Thr Gly Glu Ala Gly Thr Lys Ser	
490 495 500	
AAG GTC TTT AGC CCA ATT CTC GAC GGA TCA TTC TTC GAA CCG CCT TTG	3443
Lys Val Phe Ser Pro Ile Leu Asp Gly Ser Phe Phe Glu Pro Pro Leu	
505 510 515	
GAA TCT AAA GTC AGG CGT TAT CAT TCA CCC CGG AAA CAG GCA CCT CCT	3491
Glu Ser Lys Val Arg Arg Tyr His Ser Pro Arg Lys Gln Ala Pro Pro	
520 525 530	
CCT CCT CCT GAC GAT TTT TCA GAT GCA TTT GAA CTA TCT ACA GAA GAG	3539
Pro Pro Pro Asp Asp Phe Ser Asp Ala Phe Glu Leu Ser Thr Glu Glu	
535 540 545 550	
CCA CTG AAA TTA AAA GTC CAA CCA GTT CAA CCT CAT ATG ACG CCT GCT	3587
Pro Leu Lys Leu Lys Val Gln Pro Val Gln Pro His Met Thr Pro Ala	
555 560 565	
CTG AGT GAT AAT GAT CTA TGG GGT GAG GAA TCT ATT GGT GTG CGA CGA	3635
Leu Ser Asp Asn Asp Leu Trp Gly Glu Glu Ser Ile Gly Val Arg Arg	
570 575 580	
GGA GGC AGG GAC TCG TCA AGT ATG GGA GGA TCC	3668
Gly Gly Arg Asp Ser Ser Ser Met Gly Gly Ser	
585 590	

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 1128 bazių poros

<212> DNR

<213> *Trigonopsis variabilis*

<220>

<221> CDS

<222> 16...1107

<223> *dao* genas, kurio 5' gale prijungtas nukleotidas, koduojantis 6 narių polihistidiną (*hisDAO*)

<400>

CACAGGAAAC AGACC ATG CAT CAT CAC CAC CAT CAC TTC ATG GCT AAA ATC	51
Met His His His His His His Phe Met Ala Lys Ile	
1 5 10	
GTT GTT ATT GGG GCC GGT GTT GCC GGT TTA ACT ACA GCT CTT CAA CTT	99
Val Val Ile Gly Ala Gly Val Ala Gly Leu Thr Thr Ala Leu Gln Leu	
15 20 25	
CTT CGT AAA GGA CAT GAG GTT ACA ATT GTG TCC GAG TTT ACG CCC GGT	147
Leu Arg Lys Gly His Glu Val Thr Ile Val Ser Glu Phe Thr Pro Gly	
30 35 40	
GAT CTT AGT ATC GGA TAT ACC TCG CCT TGG GCA GGT GCC AAC TGG CTC	195
Asp Leu Ser Ile Gly Tyr Thr Ser Pro Trp Ala Gly Ala Asn Trp Leu	
45 50 55 60	
ACA TTT TAC GAT GGA GGC AAG TTA GCC GAC TAC GAT GCC GTC TCT TAT	243
Thr Phe Tyr Asp Gly Gly Lys Leu Ala Asp Tyr Asp Ala Val Ser Tyr	
65 70 75	
CCT ATC TTG CGA GAG CTG GCT CGA AGC AGC CCC GAG GCT GGA ATT CGA	291
Pro Ile Leu Arg Glu Leu Ala Arg Ser Ser Pro Glu Ala Gly Ile Arg	
80 85 90	
CTC ATC AAC CAA CGC TCC CAT GTT CTC AAG CGT GAT CTT CCT AAA CTG	339
Leu Ile Asn Gln Arg Ser His Val Leu Lys Arg Asp Leu Pro Lys Leu	
95 100 105	
GAA GGT GCC ATG TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC CCC TGG TTC AAA AAC	387
Glu Gly Ala Met Ser Ala Ile Cys Gln Arg Asn Pro Trp Phe Lys Asn	
110 115 120	
ACA GTC GAT TCT TTC GAG ATT ATC GAG GAC AGG TCC AGG ATT GTC CAC	435
Thr Val Asp Ser Phe Glu Ile Ile Glu Asp Arg Ser Arg Ile Val His	
125 130 135 140	
GAT GAT GTG GCT TAT CTA GTC GAA TTT GCT TCC GTT TGT ATC CAC ACC	483
Asp Asp Val Ala Tyr Leu Val Glu Phe Ala Ser Val Cys Ile His Thr	
145 150 155	
GGA GTC TAC TTG AAC TGG CTG ATG TCC CAA TGC TTA TCG CTC GGC GCC	531
Gly Val Tyr Leu Asn Trp Leu Met Ser Gln Cys Leu Ser Leu Gly Ala	
160 165 170	
ACG GTG GTT AAA CGT CGA GTG AAC CAT ATC AAG GAT GCC AAT TTA CTA	579
Thr Val Val Lys Arg Arg Val Asn His Ile Lys Asp Ala Asn Leu Leu	
175 180 185	
CAC TCC TCA GGA TCA CGC CCC GAC GTG ATT GTC AAC TGT AGT GGT CTC	627
His Ser Ser Gly Ser Arg Pro Asp Val Ile Val Asn Cys Ser Gly Leu	
190 195 200	
TTT GCC CGG TTC TTG GGA GGC GTC GAG GAC AAG AAG ATG TAC CCT ATT	675
Phe Ala Arg Phe Leu Gly Gly Val Glu Asp Lys Lys Met Tyr Pro Ile	
205 210 215 220	
CGA GGA CAA GTC GTC CTT GTT CGA AAC TCT CTT CCT TTT ATG GCC TCC	723
Arg Gly Gln Val Val Leu Val Arg Asn Ser Leu Pro Phe Met Ala Ser	
225 230 235	
TTT TCC AGC ACT CCT GAA AAA GAA AAT GAA GAC GAA GCT CTA TAT ATC	771
Phe Ser Ser Thr Pro Glu Lys Glu Asn Glu Asp Glu Ala Leu Tyr Ile	
240 245 250	
ATG ACC CGA TTC GAT GGT ACT TCT ATC ATT GGC GGT TGT TTC CAA CCC	819
Met Thr Arg Phe Asp Gly Thr Ser Ile Ile Gly Gly Cys Phe Gln Pro	
255 260 265	
AAC AAC TGG TCA TCC GAA CCC GAT CCT TCT CTC ACC CAT CGA ATC CTG	867
Asn Asn Trp Ser Ser Glu Pro Asp Pro Ser Leu Thr His Arg Ile Leu	
270 275 280	
TCT AGA GCC CTC GAC CGA TTC CCG GAA CTG ACC AAA GAT GGC CCT CTT	915
Ser Arg Ala Leu Asp Arg Phe Pro Glu Leu Thr Lys Asp Gly Pro Leu	
285 290 295 300	

GAC	ATT	GTG	CGC	GAA	TGC	GTT	GGC	CAC	CGT	CCT	GGT	AGA	GAG	GGC	GGT	963
Asp	Ile	Val	Arg	Glu	Cys	Val	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Arg	Glu	Gly	Gly	
				305					310					315		
CCC	CGA	GTA	GAA	TTA	GAG	AAG	ATC	CCC	GGC	GTT	GGC	TTT	GTT	GTC	CAT	1011
Pro	Arg	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Pro	Gly	Val	Gly	Phe	Val	Val	His	
			320						325					330		
AAC	TAT	GGT	GCC	GCC	GGT	GCT	GGT	TAC	CAG	TCC	TCT	TAC	GGC	ATG	GCT	1059
Asn	Tyr	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Ala	
			335					340					345			
GAT	GAA	GCT	GTT	TCT	TAC	GTC	GAA	AGA	GCT	CTT	ACT	CGT	CCA	AAC	CTT	1107
Asp	Glu	Ala	Val	Ser	Tyr	Val	Glu	Arg	Ala	Leu	Thr	Arg	Pro	Asn	Leu	
			350				355				360			364		
TAGAAGCTTG GCTGTTTTGG C																1128

