



УКРАЇНА

(19) UA (11) 97353 (13) C2

(51) МПК

C12N 9/40 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A23L 1/09 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54)  $\alpha$ -ГАЛАКТОЗИДАЗА З ТРАНСГАЛАКТОЗУЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) a200809397  
(22) 19.12.2006  
(24) 10.02.2012  
(86) PCT/GB2006/004796, 19.12.2006  
(31) 0525857.9  
(32) 20.12.2005  
(33) GB  
(46) 10.02.2012, Бюл.№ 3, 2012 р.  
(72) ЦОРЦИС ГЕОРГИОС, GB, ГОУЛАС АТАНАСИОС К., GB, ГОУЛАС ТЕОДОРΟΣ, GB  
(73) КЛАСАДО ІНК., PA  
(56) EP 1227152 A, 31.07.2002  
WO 2004074496 A, 02.09.2004  
WO 2005003329 A, 13.01.2005  
DATABASE Geneseq [Online] 19 November 2002, "Bifidobacterium longum NCC2705 DATABASE UniProt [Online] 1 November 1999, "Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22)." retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9XCX2 Database accession no. Q9XCX2  
DATABASE UniProt [Online] 27 September 2005, "Glycoside hydrolase, clan GH-D." retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q40Z83 Database accession no. Q40Z83  
SCALABRINI P ET AL: "CHARACTERIZATION OF BIFIDOBACTERIUM STRAINS FOR USE IN SOYMILK FERMENTATION" INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 3, 1998, pages 213-219  
VAN LAERE K M J ET AL: "Transglycosidase activity of Bifidobacterium adolescentis DSM 20083 alpha-galactosidase" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 52, no. 5, November 1999, pages 681-688  
LAMOUREUX L ET AL: "PRODUCTION OF OLIGOSACCHARIDES IN YOGHURT CONTAINING BIFIDOBACTERIA AND YOGURT CULTURES" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 85, no. 5, May 2002, pages 1058-1069  
GEORGE TZORTZIS ET AL: "Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171"

2

APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 68, no. 3, 1 August 2005, pages 412-416  
DATABASE UniProt [Online] 30 May 2006, "Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22)." retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q1KTD9 Database accession no. Q1KTD9  
DATABASE UniProt [Online] 20 December 2005, "Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22)." retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q2XQ11 Database accession no. Q2XQ11  
GOULAS A ET AL.: "Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\alpha$ -galactooligosaccharides from Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171" INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, vol. 17, no. 6, June 2007 (2007-06), pages 648-656  
(57) 1. Послідовність ДНК, яка кодує  $\alpha$ -галактозидазу, де послідовність вказана в SEQ ID NO: 1.  
2. Фермент  $\alpha$ -галактозидаза, який кодується ДНК-послідовністю за п. 1.  
3. Фермент  $\alpha$ -галактозидаза, який містить амінокислотну послідовність за SEQ ID NO: 2.  
4. Фермент  $\alpha$ -галактозидаза, який має послідовність, вказану в SEQ ID NO: 2.  
5. Рекombінантний вектор, який містить послідовність ДНК за п. 1.  
6. Вектор за п. 5, де вказаний вектор являє собою вектор експресії.  
7. Клітина-хазяїн, яка містить ДНК-послідовність за п. 1.  
8. Клітина-хазяїн, яка містить вектор за п. 5 або 6.  
9. Клітина-хазяїн за п. 7 або 8, де вказана клітина являє собою бактерійну клітину, дріжджову клітину або грибову клітину.  
10. Клітина-хазяїн за п. 9, де вказана клітина вибрана з групи, яка складається з Bifidobacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus і Aspergillus.  
11. Клітина-хазяїн за п. 10, де вказана клітина вибрана з групи, яка складається з Bifidobacterium bifidum, Bacillus subtilis, Bacillus circulans і Aspergillus niger.

(13) C2

(11) 97353

(19) UA

12. Застосування ферменту  $\alpha$ -галактозидази за п. 3 для отримання  $\alpha$ -галактобіозних дисахаридів.

13. Застосування ферменту  $\alpha$ -галактозидази за п. 3 для отримання  $\alpha$ -галактобіозних дисахаридів, які є частиною продукту, вибраного з групи, яка складається з молочних продуктів, таких як рідке молоко, сухе молоко, молочні суміші, суміші для дитячого харчування, морозиво, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти, напої, таких як фруктові соки, продуктів для дитячого харчування, зернових, хліба, крекерів, кондитерських виробів, випічки, харчових добавок, дієтичних добавок, харчових продуктів з пробіотиками, харчових продуктів з пребіотиками, кормів для тварин, кормів для домашньої птиці і лікарських засобів.

14. Застосування клітини-хазяїна за п. 7 для отримання продукту, вибраного з групи, яка складається з молочних продуктів, таких як рідке молоко,

сухе молоко, молочні суміші, суміші для дитячого харчування, морозиво, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти, напої, таких як фруктові соки, продуктів для дитячого харчування, зернових, хліба, крекерів, кондитерських виробів, випічки, харчових добавок, дієтичних добавок, харчових продуктів з пробіотиками, харчових продуктів з пребіотиками, кормів для тварин, кормів для домашньої птиці і лікарських засобів.

15. Спосіб отримання ферменту  $\alpha$ -галактозидази за п. 3, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 7 у відповідному культуральному середовищі при умовах, які дозволяють експресувати вказаний фермент і діставати отриманий в результаті фермент з культурального середовища.

16. Спосіб отримання дисахариду, який включає контактування ферменту за п. 3 або клітини-хазяїна за п. 7 з розчином мелібіози.

Винахід належить до нової  $\alpha$ -галактозидази з трансгалактозуючою активністю, здатною перетворювати мелібіозу в  $\alpha$ -галактобіозні дисахариди. Зокрема, винахід належить до  $\alpha$ -галактозидази, виділеної з нещодавно відкритого штаму *Bifidobacterium bifidum*.

Винахід, зокрема, належить до послідовностей ДНК, які кодують виділений фермент  $\alpha$ -галактозидазу, до ферменту, який кодується такою послідовністю ДНК, і до клітини-хазяїна, що містить послідовність ДНК або містить рекомбінантний вектор, що вбудовує послідовність ДНК. Винахід також належить до застосування ферменту, який кодується послідовністю ДНК, або клітини-хазяїну, що містить послідовність ДНК або рекомбінантний вектор для отримання  $\alpha$ -галактобіози.

Біфідобактерії звичайно населяють нижній відділ кишечника, і таке середовище бідне моно- і дисахаридами, оскільки вказаний цукор, переважно, споживається хазяїнами і мікробами, присутніми у верхньому відділі кишечника. Для виживання в нижньому відділі кишечника біфідобактерії продукують різні види екзо- і ендоглікозидаз, поверхнево зв'язаних і/або таких, що знаходяться у вигляді позаклітинних форм, які здатні утилізувати різні вуглеводи.

Крім гідролізоїдної активності, деякі ферменти біфідобактерій володіють трансферазною активністю. Така трансглікозилуюча активність глікозидаз інтенсивно використовується для ферментативного синтезу різних олігосахаридів, які, як було доведено, виконують функції чинників, стимулюючих зростання біфідобактерій.

Відомо, що деякі види біфідобактерій продукують  $\beta$ -галактозидазні ферменти, які беруть участь в бактерійному метаболізмі лактози. Так в Mollet, P.L. et al in Appl & Environ Microbial., (2001), 62, (5), 2276-2283 описано виділення і характеристики трьох генів  $\beta$ -галактозидази з штаму *Bifidobacterium bifidum*. Автори виявили, що всі три  $\beta$ -галактозидази здатні каталізувати утворення бета-зв'язаних галактоолігосахаридів в результаті трансгалактозиляції.

Відомо, що деякі види біфідобактерій, на відміну від *B. bifidum* продукують  $\alpha$ -галактозидази, а також  $\beta$ -галактозидази.  $\alpha$ -Галактозидази належать до групи глікозилгідролаз і можуть бути класифіковані на дві групи за специфічністю до субстрату, тобто одна з таких груп володіє специфічністю до малих сахаридів, таких як *p*-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозид, мелібіоза і рафіноза, а інша група здатна вивільняти галактозу з галактоманаз таких, як гуарова камедь, крім інших малих субстратів.

Було виявлено, що штам *Bifidobacterium bifidum* здатний продукувати фермент з галактозидазною активністю, яка перетворює лактозу в нову суміш галактоолігосахаридів, яка, як несподівано було відмічено, містить до 35% дисахаридів, включаючи галабіозу (Gal ( $\alpha$  1-6)-(Gal)). Відомо, що такий дисахарид (див. Paton, J.S. & Paton A.W. (1989), Clin. Microbial. Revs, 11, 450-479; Carisson, K.A. (1989), Ann. Reviews Biochem, 58, 309-350) володіє антиадгезивною здатністю запобігати адгезію токсинів, наприклад, токсину Shiga і таких патогенів, як *E. coli*, на стінки травного тракту.

Штам *B. bifidum* депонований під номером доступу NCIMB 41171 в the National Collection of Industrial & Marine Bacteria, Aberdeen, UK 31 березня 2003 р. Крім того, він також описаний в патенті США No.2412 380.

Було виявлено, що штам *B. bifidum* продукує  $\alpha$ -галактозидазу, здатну перетворювати мелібіозу в  $\alpha$ -галактобіозні дисахариди.

Даний винахід належить до послідовності ДНК, яка кодує білок з амінокислотною послідовністю, приведеною в SEQ ID NO:2 або яка гібридизується в жорстких умовах з послідовністю ДНК, яка кодує білок, що розглядається. Послідовність ДНК приведена в SEQ ID NO:1 або може містити фрагменти або вироджену послідовність.

Термін «вироджена» належить до послідовності ДНК, яка гомологічна послідовності SEQ ID NO:1 щонайменше на 50%, більш переважно на 50-98%, найбільш переважно, на 75-95%.

Така послідовність ДНК може містити нуклеотидні заміни, вставки або делеції, здатні змінювати амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2 менше ніж на 60%, переважно, менше ніж на 45%, більш переважно, менше ніж на 25%. Нуклеотидні заміни можуть давати консервативні заміни в амінокислотних послідовностях.

У другому аспекті даний винахід належить до ферменту, який кодується вказаною вище послідовністю ДНК. Такий фермент може містити амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2 або її фрагмент.

У третьому аспекті даний винахід належить до рекомбінантного вектора, переважно, експресуючого вектора, що містить вказану вище послідовність ДНК. Такий вектор може вводитися в клітину-хазяїн таку, як бактерія, дріжджі або грибки. Як альтернатива, послідовність ДНК може бути введена в таку клітину-хазяїн. Відповідна клітина-хазяїн може бути вибрана з *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, наприклад, *Bacillus subtilis*, або *Bacillus circulans*, *Escherichia* і *Aspergillus*, наприклад, *Aspergillus niger*.

При використанні як субстрата мелібіози, фермент, який кодується вказаною вище послідовністю ДНК, продукує суміш олігосахаридів, головним чином,  $\alpha$ -галактобіозних дисахаридів.

Вказаний вище фермент або клітина-хазяїн можуть використовуватися для отримання  $\alpha$ -галактобіозних дисахаридів, які можуть бути частиною продукту, призначеного для стабілізації діяльності шлунково-кишкового тракту. Продукти такого типу можуть бути вибрані з групи, яка складається з молочних продуктів (наприклад, таких як рідке молоко, сухе молоко, наприклад, сухе збиране молоко, сухе знежирене молоко, сухе повножирне молоко, суха сироватка, молочні суміші для дитячого харчування, суміші для дитячого харчування, морозиво, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти) а також напоїв, таких як фруктові соки, продукти для дитячого харчування, зернові, хліб, крекери, кондитерські вироби, випічка, харчові добавки, дієтичні добавки, харчові продукти з пробіотиками, харчові продукти з пребіотиками, корми для тварин, корми для домашньої птиці, а також інших харчових продуктів або напоїв.

Як альтернатива, отримані таким чином дисахариди можуть використовуватися для отримання лікарських засобів у вигляді таблеток або капсул для запобігання адгезії на стінках кишкового тракту патогенів або токсинів, продуктованих патогенами. Лікарські засоби такого типу можуть застосовуватися пацієнтом, наприклад, після курсу лікування антибіотиками, яке часто порушує нормальну флору травного тракту.

Також даний винахід належить до описаного вище способу отримання ферментів, який включає культивування клітин-хазяїнів у відповідному культурному середовищі в умовах, які забезпечують експресію ферменту і діставання отриманого в результаті ферменту або продуктів ферментації з культурного середовища.

Таким чином, винахід також належить до способу отримання галактобіозних дисахаридів, який

включає контактування описаних вище ферменту або клітини-хазяїна з матеріалом, який містить мелібіозу, в умовах, які приводять до утворення дисахаридів.

Прийнятні матеріали, ті, які містять мелібіозу можуть бути вибрані з комерційно доступних мелібіоз, рафіноз, стахіоз або соєвих екстрактів.

На фігурі 1 приведена нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:1)  $\alpha$ -галактозидази *Bifidobacterium bifidum* з ініціюючим або термінуючим кодоном, вказаним жирним курсивом;

на фігурі 2 приведена нуклеотидна послідовність згідно з фігурою 1 з амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:2) ферменту;

на фігурі 3 приведені перші 540 амінокислот амінокислотної послідовності (SEQ.ID. NO:2) згідно з фігурою 2;

на фігурі 4 приведений графік, що демонструє кінетику реакції під час синтезу галактоолігосахариду  $\alpha$ -галактодизази з використанням 40% (мас/мас) мелібіози в 0,1 М фосфатному буфері як субстрату; і

на фігурі 5 приведена хроматограма, отримана високоефективною аніонообмінною хроматографією суміші  $\alpha$ -галактоолігосахаридів, синтезованою за допомогою  $\alpha$ -галактозидази з *B. bifidum* NCIMB 41171 з використанням 40% (мас/мас) мелібіози в 0,1 М фосфатному буфері як субстрату при pH 6,0. (Тут Glc = глюкоза; Gal = галактоза, Mel = мелібіоза; СП = ступінь полімеризації). Стрілки, позначені пунктирними лініями, визначають положення галактоолігосахаридних продуктів.

Геномну ДНК виділяли з штаму *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) з використанням способу Lawson et al. (1989) *Fems Microbiol Letters*, 65, (1-2), 41-45. ДНК обробляли рестрикційними ферментами, і фрагменти з максимальним розміром 15 т.п.н. лігували вектором PBluescript KS(+). Клітини *E. coli* трансформували вектором, який містить інсерції, що складаються з PstI обробленої ферментами хромосомної ДНК з *B. bifidum*. Клоні з  $\alpha$ -галактозидазною активністю піддавали селекції на пластинах з агаром Luria Bertani, який містить п-нітрофеніл  $\alpha$ -D-галактопіронозид і ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозид (IPTG). Ідентифікували два  $\alpha$ -галактозидазних позитивних клони (pMeIA1 і pMeIA2).

Два отриманих позитивних клони, оброблені ферментами EcoRI, PstI і Bam HI, продемонстрували аналогічні рестрикційні карти, що вказує на те, що обидва вони містять однакові ДНК-вставки. Секвенування вставленого фрагмента ДНК MeIA1 здійснювали за допомогою Sanger дідеокси методу обриву ланцюга (Russel P., 2002 *iGenetics*, Pearson Education Inc., San Francisco, 187-189) з використанням набору для циклічного секвенування BigDye Terminator V.3.0. (Applied Biosystems, USA). Послідовність ДНК MeIA1 представлена на фігурі 1 (SEQ ID NO:1).

Відкриту рамку читування (ORF) локалізували з використанням ORF finder від NCBI (National center of Biotechnology information). Використовували генетичний код бактерії і визначили довжину рамки читування в 300 пн. Нуклеотидну послідовність, показану на фігурі 1 транслювали в шість

можливих рамок і була виявлена одна відкрита рамка читування з 759 амінокислот, яка кодує с передбачувану  $\alpha$ -галактозидазу (трансляція показана на Фігурі 2 SEQ ID NO:2).

Наступні приклади ілюструють даний винахід.

#### Приклад 1

##### Матеріали і методи

Всі хімічні реагенти і препарати середовищ, використані в цій роботі, були отримані від Sigma (Dorset, UK), Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid (Basingstoke, UK), Qiagen (West Sussex, UK) і Promega (Southampton, UK).

##### Бактерійні штами

Штам *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) зберігали на криогенних умовах в пробірках Microbank при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для подальших експериментів штам оживляли на агарі Wilkinson Chalgren (WC) агарі (Oxoid, UK) і середовищі TPY (середовище, Триптиказу з фітоном і дріжджовим екстрактом) і вирощували анаеробно (склад  $\text{CO}_2$  і  $\text{N}_2$  - 80% і 20%, відповідно) при  $37^{\circ}\text{C}$  протягом 38 годин. Морфологію колоній, і відсутність забруднень перевіряли фарбуванням по Граму.

##### Штами *E.coli*

Штам *Escherichia coli* RAIr і DH5a, використаний в цій роботі, звичайно інкубували в аеробних умовах при  $37^{\circ}\text{C}$  на агаровому середовищі Лурія-Бертані (LB) або бульйоні (Sambrook J. and Russel W.D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York) і при необхідності додавали антибіотики (100 мкг/мл ампіциліну і/або 15 мкг/мл хлорамфеніколу) і 40 мкл 2% X- $\alpha$ -галактопіранозиду (X- $\alpha$ -Gal), 7 мкл 20% розчини IPTG (ізопропіл- $\beta$ -D-тіогалактозиду), які наносили на поверхні заделегідь приготованих підготовленої 90-мм агарових чашок.

У експериментах по експресії використовували дефіцитний по  $\alpha$ -галактозидазі штам *E.coli* RA11r (Hanatani et al., 1983, J.Biol. Chem., 259(3) (генотип: melA<sup>B+</sup> recA<sup>-</sup>, lacZ<sup>Y</sup>), отриманий з *E.coli* K12. Штам *E.coli* DH5a (Invitrogen, Paisley, UK) (генотип: F<sup>+</sup>80lacZ $\Delta$ M $\Delta$  (lacZYA-argF)U169 recA1 і endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>; m<sub>k</sub><sup>-</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -) використовували у всіх інших генетичних експериментах.

Вибір штамів *E.coli* RAIr для експериментів по експресії проводили відповідно до генотипу. Вибраний штам не кодує активну  $\alpha$ -галактозидазу за рахунок melA мутації в його власній ДНК. Однак штам, що розглядається містить активний переносник мелібіози, який необхідний для перенесення цукру (мелібіози) в цитоплазму і, отже, для їх метаболізму активною  $\alpha$ -галактозидазою. На даному етапі досліджень не можна зробити висновок про те, чи протікає експресія  $\alpha$ -галактозидази *Bifidobacterium bifidum* внутрішньоклітинно або позаклітинно. Таким чином, наявність активного переносника мелібіози є істотним чинником для ідентифікації  $\alpha$ -gal позитивних клонів і, отже, для виділення генів, що кодуєть  $\alpha$ -галактозидазу.

Потрібно зазначити, що в тому випадку, коли штам, який розглядається, являє собою мутант recA, який мінімізує рекомбінацію введеної ДНК під

впливом ДНК хазяїна, спостерігається підвищення стабільності інсерції.

Екстракція Геномної ДНК з *Bifidobacterium bifidum*.

Геномну ДНК виділяли з штаму *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) з використанням методу Lawson et al. (1989).

Згідно з описаним способом клітини збирали з пластин в пробірки Еппендорфа місткістю 1,5 мл, які містять 0,5 мл TES буфера. Вводили 10 мкл суміші лізозим/мутанолізін (4:1, лізозим 10 мг/мл; мутанолізін 1 мг/мл) і далі отриману суміш перемішували і інкубували протягом 30 хвилин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Далі клітини обробляли 10 мкл протеїнази K (в концентрації 20 мг/мл) і 10 мкл рибонуклеази (10 мг/мл), перемішували і інкубували протягом 1 години при  $65^{\circ}\text{C}$ . Після інкубації в систему додавали 100 мкл 10% розчину SDS і клітинні лізати обережно перемішували методом інверсії і інкубували ще протягом 15 хвилин при  $65^{\circ}\text{C}$ , після чого додавали 0,62 мл суміші фенолу/хлороформу перемішували методом інверсії до утворення емульсії. Далі клітинні лізати центрифугували з швидкістю 6500 об./хв. протягом 10 хвилин, і верхній шар рідини переносили в чисту пробірку Еппендорфа, використовуючи для цієї операції випалені ширококанальні піпетки. Екстракцію (етап депротейнізації) повторювали до повного видалення клітинних фрагментів. ДНК осаджували додаванням 1 мл крижаного етанолу, після чого проводили інкубацію щонайменше протягом 30 хвилин на льоду або, зберігаючи протягом ночі в морозилці при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ . Геномну ДНК виділяли центрифугуванням при швидкості 13000 об./хв. протягом 5 хвилин, і після сушіння ресуспендували в 5 мкл стерильній суміші з 1 мМ Трис-Cl при pH 8.

Екстраговану ДНК аналізували методом гелелектрофорезу і її концентрацію вимірювали при 260 нм. Зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  або  $-70^{\circ}\text{C}$  протягом тривалого періоду часу, уникаючи багаторазового відтавання і заморожування для зниження можливості руйнування.

##### Векторний ДНК препарат

У цьому дослідженні використовували pBluescript KS(+) (Stratagen, North Torrey Road). Вибір цього клонуєного засобу зумовлений тим, що lac промотор кодуєчої плазмиди pBluescript KS(+) необхідний для ініціації транскрипції генів, втрачаючи власний промотор.

Вектор перетравлювали в присутності наступних рестрикційних ферментів: PstI, BamHI і EcoRI відповідно до інструкцій виробника, використовуючи десятиразовий надлишок ферменту відносно кількості ДНК (ферментативні одиниці: мкг ДНК еквівалентно десяти одиницям ферменту на один  $\mu\text{g}$  плазмідної ДНК або десяти одиницям ферменту з розрахунку на 0,5 пікомоль плазмідної ДНК). Після термоінактивації ферменту (20 хвилин при  $65^{\circ}\text{C}$ ) аналізували карту рестрикції методом горизонтального гелелектрофорезу.

Далі вектори дефосфориливали з використанням кишкової лужної фосфатази теляти CIAP (Promega, Southampton, UK) відповідно до інструкцій виробника. Ефективність обробки тестували само-лігуванням вектора (*Bacteriophage* T4 ДНК ліга-

зою відповідно до інструкцій виробника) після чого проводили трансформацію DH5a клітин.

Наявність єдиного фрагмента гелю є свідченням повного перетравлення вектора і його одиничного рестрикційного перетравлення. Ступінь перетравлення вектора тестували трансформацією нелігованих молекул компетентних клітин *E. coli* DH5a. Число колоній, які утворилися на пластинах LB агару, що додатково містять ампіцилін (100 мкг/мл), служило показником числа неперетравлених молекул і могло слугувати фоном сигналом для подальших експериментів.

Конструювання бібліотеки геномних ДНК

Геномні ДНК частково перетравлювали в присутності трьох рестрикційних ферментів, здатних розпізнавати гекса-нуклеотидні послідовності, які часто зустрічаються, в які включена прокаріотна ДНК. *EcoRI*, *BamHI* і *PstI* являють собою ретриктивні ендонуклеази типу II послідовності типу, які специфічно розпізнають 5'/GAATTC'3, 5'/GATCC'3 і 5'/CTGCA/G'3 відповідно, це явище супроводжується двонитковим розривом, який призводить до формування 5' виступаючих кінців з чотирьох нуклеотидів AATT, GATS для *EcoRI* і *BamHI*, відповідно, а також 3' виступаючих кінців при використанні ACGT для *PstI*.

Було встановлено, що всі ферменти володіли активністю і були здатні розщеплювати ДНК тільки в присутності іонів двовалентного магнію. Такі іони слугували єдиним необхідним кофактором.

Рестрикційне перетравлення ДНК

Все ретриктивні перевари зразків геномної ДНК інкубували протягом 2 годин при 37°C і інактували при 65°C протягом 20 хвилин. Потім реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і додавали необхідну кількість буфера, піддаючи суміш м'якому перемішуванню з використанням герметизованого скляного капіляра. Далі розчини завантажували в ампули з 0,8% агарозного гелю (підведення потужності 4-5 вольт/см протягом 14-16 годин) і розмір перевареної ДНК визначали з використанням 1 т.п.н. стандартних ДНК (Promega, UK) (Sambrook, J, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002).

Очищення фрагментів, які утворилися після процесу рестрикційного перетравлення

Очищення фрагментів від реакційної суміші і агарозного гелю виконували з використанням набору для екстракції гелю QIAEX від Qiagen (West Sussex, UK). Протоколи аналізу детально викладені в інструкціях виробника.

Лігування і трансформація ДНК

Після очищення фрагментів ДНК з використанням набору для екстракції гелю QIAEX, матеріал піддавали лігуванню з використанням CIAP-обробленого pBluescript KC(+) вектора. З метою лігування певні кількості ДНК переносили в стерильні мікроцентрифугальні пробірки місткістю 0,5 мл, як показано в Таблиці 1.

Таблиця 1

Пробірка	ДНК
A	Кількість вектора (1 фемтомолей) (~29,7 нг)
B	Кількість вектора (1 фемтомолей ~29,7 нг ДНК) плюс вставка (сторонні речовини в 1 фемтомолях ~69,3 нг)
C	pUc контроль (0,056 фемтомолей (~100 пг))

У реакції лігування молярне співвідношення між плазмідним ДНК вектором і вбудовуванім ДНК фрагментом становило ~1:1. Кінцева концентрація ДНК становила ~10 нг/мкл.

Суміші для лігування. Пробірка A показує кількість самолігуючої векторної ДНК, яку потрібно виключити із загальної кількості трансформантів після завершення процесу трансформації. Дані отримані в пробірці B демонструють лігування вектора фрагментами ДНК, а дані з колонки C демонструють контрольні значення, що дозволяють розрахувати ефективність процесу трансформації.

Перед кожною операцією лігування фрагменти ДНК нагрівали при 45°C протягом 5 хвилин до плавлення всіх «липких» кінців, які повторно випаювалися при отриманні фрагмента. Реакцію проводили згідно з інструкцією Promega для всіх реакцій лігування, молярне співвідношення вектор:вставка ДНК вибиралося 1:1.

У пробірці A і B вводили по 1,0 мкл 10-кратних надлишки лігуючого буфера і 0,5 одиниць Weiss T4 ДНК лігази (Promega, UK), і весь об'єм реакційної суміші доводили до рівня 10 мкл за допомогою біологічно очищеної води. У пробірці C вводили 1,0 мкл 10-кратного надлишку лігуючого буфера, і

весь об'єм реакційної суміші доводили до рівня 10 мкл за допомогою біологічно очищеної води.

Фрагменти ДНК додавали в пробірки спільно з водою, після чого суміш нагрівали до 45°C протягом 5 хвилин для плавлення всіх «липких» кінців, які повторно випаювалися при отриманні фрагмента. ДНК охолоджували до 0°C перед доданням реагентів лігування, які залишилися, і реакційну суміш інкубували протягом ночі при 16°C (Sambrook and Russell, 2001).

Після осадження етанолом і очищення лігованих фрагментів (з метою видалення лігуючого середовища, яке може знижувати ефективність трансформаційних перетворень) подальші операції проводили, слідуючи інструкціям Hanap. ~50 нг лігуючої ДНК в 5 мкл розчини додавали до 100 мкл компетентних *E. Coli* RAllr клітин. Після термообробки і експресії в присутності ампіцилін-стійкого гена клітини розподіляли по поверхні LB пластин, які містять ампіцилін (100 мкг/мл), X-α-Gal (40 мкл 2% X-α-Gal) і (7 мкл 20% IPTG).

Вимірювали число трансформацій в кожній реакції лігування. Число трансформантів в пробірці C становило  $2 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  КУО/мкг, в той час як відповідну кількість в пробі B становило 500-600

КУО/мкг. Число трансформантів в пробі А відображає ефективність обробки векторної ДНК. Число трансформантів в пробі В становило  $2-4 \times 10^4$  КУО/мкг.

Число трансформантів

При лігуванні сумішей в присутності PstI хромосомної ДНК отримували два  $\alpha$ -галактозидазних позитивних клони (pMelA1 і pMelA2) з приблизно 2500 скринованих трансформантів, тоді як в присутності хромосомної ДНК, обробленої EcoRI і BamHI, не спостерігалось утворення якого-небудь позитивного клону з приблизно 4000 всіх скринованих трансформантів.

Перетравлення позитивного клону

Два позитивних PstI клони перетравлювали рестрикційними ферментами EcoRI, PstI, BamHI, HindIII, SmaI і KpnI. Рестрикційні ферменти EcoRI, PstI і BamHI показали аналогічну рестрикційну карту, один фрагмент ~5 т.п.н. (цільовий ген) і інший ~приблизно 3 т.п.н. (плазмідна ДНК), яка свідчить про те, що вказані ферменти ріжуть в аналогічних позиціях. HindIII дають фрагмент розміром 6,5 т.п.н. і фрагмент розміром 1,5 т.п.н. тоді як ферменти SmaI і KpnI утворюють лише один фрагмент розміром ~8 т.п.н., що свідчить про розрізання лише в одній позиції. Аналогічні рестрикційні карти для обох плазмід вказують на те, що обидві містять аналогічні ДНК вставки.

Секвенування послідовності ДНК

Секвенування ДНК здійснювали з використанням набору для циклічного секвенування BigDye Terminator V.3.0 (Applied Biosystems, USA) і аналіз проводили з використанням ABI Prism 3100 системи для флуоресцентного аналізу ДНК, який включає методи капілярного електрофорезу.

5'- і 3'-кінці вбудованих фрагментів ДНК секвенували вектор-специфічними праймерами. Вставки додатково секвенували з використанням системи геномного праймування (Genome Priming System (GPS-1)) (New England Biolabs, UK). GPS-1 являє собою *in vitro* систему на основі транспозону TN7, який використовує TnsABC транспозазу для вбудування випадковим чином в цільову ДНК. Донор: була використана цільова ДНК в масовому співвідношенні 1:4 згідно з інструкцією виробника. Кількість виділених плазмід для секвенування після вставки транспраймеру в цільову плазмиду становила 25. Ця кількість була вирахована згідно з інструкціями виробника і виходячи з 5-кратної глибини обхвату it assumes a 5-fold depth of coverage

Унікальні сайти праймування на обох кінцях транспраймерного елемента дозволяють секвенувати обидві нитки цільовий ДНК в позиції вставки.

Суміш для реакції секвенування містила приблизно 400-600 нг плазмідної ДНК, 3,2 пікомольо розчину праймера і 4 мкл розчину термінатора BigDye.

Ідентифікація відкритої рамки зчитування

Відкриту рамку зчитування (ORF) виявляли з використанням ORF finder від NCBI. Використовували генетичний код бактерії і визначили довжину рамки зчитування в 300 пн. Нуклеотидну послідовність транслювали в шість можливих рамок і була виявлена одна відкрита рамка зчитування з 759 амінокислот, що кодує передбачувану  $\alpha$ -

галактозидазу (трансляція показана на фігурі 2). Були підтверджені ініціюючий і термінуючий кодони.

Ген  $\alpha$ -галактозидази Bifidobacterium pMelA1 плазмідой був експресований в *E. coli* при умовах зростання, які в нормі придушують експресію з індукційним *E. coli* lacZ промотором, розташованим у фланкуючій ділянці клонуючого вектора. Ці результати вказують, що ендегенні, внутрішні біфідобактеріальні послідовності, направлені проти гена  $\alpha$ -галактозидази можуть служити сигналом ініціації транскрипції в *E. coli*.

Початок транскрипції вказано жирним курсивом. Приведені вище результати вказують, що ген контролюється власним промотором транскрипції.

Приклад 2

Синтез клонованого ферменту  $\alpha$ -галактозидази, виділений з Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171 в клітині-хазяїні *E. coli* (штам RA11)

Синтез, описаний нижче, проводили, якщо не вказано інакше, із з цілими клітинами *E. coli* RA11 як хазяїн після обробки біомаси *E. coli* (зібраної центрифугуванням при 10000 g) толуолом в концентрації 2000 чнм, для збільшення проникності клітини, щоб зробити її нежиттєздатною, зруйнувавши її цитоплазматичну мембрану. Біомасу *E. coli* готували, як описано в п. «Штами *E. coli*» Прикладу 1.

Синтез клонованого ферменту

Синтез  $\alpha$ -галактозидази проводили при початковій концентрації мелібіози в субстраті 40% (мас/мас). Синтезуючий розчин отримували в 0,1 М фосфатному буфері з рН 6,0. Синтез проводили при температурі 40°C на водній бані-шейкері при 150 обертах на хвилину. Оптимальні рН для конкретного ферменту вибирали, виходячи з вимірювань активності (з використанням як субстрату р-нітрофеніл- $\alpha$ -D-галактопіранозиду) специфічного ферментного препарату при різних показниках рН.

Для синтезу  $\alpha$ -галактозидази 2 мл клітинної суспензії *E. coli* RA11 (з активністю 0,3 од/мл) центрифугували (при 10000 g) для збору біомаси, і супернатант вивантажували. Цю біомасу ресуспендували 1 г 40% (мас/мас) розчину субстрату мелібіози для проведення синтезу. На фігурі 4 показана концентрація різного цукру, присутнього в суміші під час синтезу. На фігурі 5 показані хроматограми галактоолігосахаридних сумішей, синтезованих  $\alpha$ -галактозидазою, клонованою з *B. bifidum* NCIMB 41171, отримані високоефективною аніонообмінюючою хроматографією спільно з імпульсним амперометричним детектуванням (HPLC-ECD). У Таблиці 1 приведені концентрації цукру галактоолігосахаридної суміші в момент часу оптимального синтезу.

Таблиця 1

Вуглеводна композиція при синтезі  $\alpha$ -галактоолігосахаридів при 40%

(мас/мас) початкової концентрації мелібіози в момент часу, коли

спостерігається максимальна концентрація олігосахаридів

Синтез, почата, субст.	ГОС СП $\geq 3$	ГОС СП = 2	Mel	Glc	Gal
% (мас/мас)	Концентрація (% від всього цукру)				
40	13,93	6,61	38,06	24,1	17,9

Mel: мелібіоза, Glc: глюкоза, Gal: галактоза, СП: ступінь полімеризації.

#### Список последовательностей

<110> Lindsay, Clare L

<120> Продукт і спосіб

<130> P/13587.WO

<150> GB 0525857.9

<151> 2005-12-20

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 3129

<212> ДНК

<213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> gene

<222> (1)..(6)

<400> 1

```

taaaccttca taaaaggaaa caaaagctgg aagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga      60
actagtggat ccccgggct gcagctcgtg gtgatctacg ttccgttccct caactccgcg      120
ttcggcacca cgcgcgtcgg accgtgggca tgggtcgagt gcatctgect cgcgcgggtc      180
gtactgatcg cctcggaat ctacaaggcg atcatgcgcg ccatcgaccg caagcgcggc      240
atcatggcat aacaatgcca taagcctcca ccggcagtcg gggctcccgc tctccacatc      300
ggaaaacggg agcccttctc ataccgccga atcgctgaat atgcggtgac atgacggaac      360
gatgtcgtag catcgaggcg gaaccatata tcaatggcac gttccgaagg gattcgcaat      420
gtcactcacc gaacaattcc atggcgccgc cgcgatgga acggaactca ccgctattta      480
tgctgagcag ccggctgctg atgtggcggt cgcgctggtc ttccgcggtc acggctcttc      540
gcgcttcgtg cactggggcc gaccgctcgc ggcgcgggga accgtactcg ccgcatacga      600
cgccctgcgg ccgcagcgcg tgtccggcgc gctggacgag accgcctggc caagcatcat      660
gccacgcaa agcgagtcgt ggataggggc accgcgactg gatatccggc gcgcccggct      720
aacgcggttc tgtgcatcca cggtgaccgg catcgcaatc cgtcaggacg aacgccaagg      780
cgttgacgtg tctgacggcg tggacgggtc cgcgcatacc gtcacgcaac aggtgcccgt      840
cgtcaccgtg accgcgtcgg atgccgagca gggcggtgga ctgtcatgga cggccgaact      900
gttgcccggc ggactgatca gacagcgcac cacgctgcgt aatcttcag ccggtaatct      960
tccgacgggt gacttggaag tcggtaaagt cgaactcggc ttcccgctcc cggcacttgc      1020
cacggagata ctaccacca ccggccatca tctgcgcgaa cgcagcccgc agcggcagcc      1080
gctgaccgaa ggacgcttcg agaaggtctc gatggcgggg cggccagggt ttgacgcctc      1140

```

tctgttgctt	tccgcgggag	agcccggcct	cgggttcgag	catggcgagg	tctattcggg	1200
gcatgtgggc	tggagcgga	attccgtgct	gtcggcagag	cgtcagccgt	atacgaccgg	1260
tctgattggc	ggcggcgagg	tgctgctcgg	cggcgaggcc	acgtcgcgcc	gcggcgaaac	1320
gtacaccacc	ccgtggctgt	acgggtcgta	cgggtgacgg	ctcaacgagg	tggctgcgag	1380
attccatgat	tacgtacgct	cctgtcacc	ggatctcgcc	gtcaagccgc	gtccggtgat	1440
tctcaacacg	tgggaggccg	tgtatttcga	ccatgactac	gacacgttga	aggctctggc	1500
cgataaggcc	ggggattccg	gtgtcgaacg	gttcgtggg	gatgacggct	ggttcggctc	1560
ccgccgagac	tccacatccg	ggctcggcga	ctggcaaata	gcgcaggatg	tgtggccgga	1620
cgggccgaag	agcctcaagg	cgtcgcgcga	ttacgtgcac	ggaaaaggca	tggagtccgg	1680
cctgtgggtc	gaaccggaga	tgggtcaacc	ggattccgac	gtggcccgcg	cccaccctga	1740
ctgggtgctg	gcgccgactg	cgaaccgtct	gccgatgcag	ggacgctcgc	agcaagtgct	1800
cgacctgacc	aatcccgacg	cctaccgata	catccatgat	tccatcgatg	cgtcggtcgg	1860
cgagttgggc	atcgactaca	tcaaatggga	ccacaacaaa	ttcgtcaccg	aggcggctct	1920
gccacgtacc	ggcaggcccg	cgggtgcacg	gcagacgctc	gccgtgtacc	ggatgttccg	1980
tgacctcgaa	gtcgcgcac	cgggactgga	gattgagagt	tgcgcacg	gcggcgcccg	2040
tatcgacctg	ggcatactcg	aattcgccag	ccgcgtgtgg	acgtccga	gcgtggaccc	2100
ggtcgagcgg	gccgatattc	agcggtacac	gtcgtgctc	gtccgcct	gcacgatggg	2160
cgagcatgtg	ggggcgagtc	ctgcacattc	cacgcacgc	gccacgagcc	aggagatgcg	2220
catggcgatg	gcgttcttcg	ggcacatggg	cgtcgaatgg	aatctgctca	aggagccgga	2280
cgaggcggtg	aacaagctcg	gcgaatgggt	cgccgaatac	aagaggcacc	gcgcagtgtt	2340
cgcgatcgac	acgtgcgtgc	acgcgatata	cgcgatccg	gccgtccggg	tcgacggcat	2400
gggtcaagccg	gatcgttccg	cggcgttcta	ccggttcacg	caactgacaa	cgtcccagac	2460
tctccctcg	gcgcgattc	gcgtgcccg	tcttgacccc	gatggcacgt	accgcataca	2520
gccgttgtgg	ctggatctcg	atctcgacgg	gcttggtctt	ggcagcggcc	agtcgccgtt	2580
gggctgggtg	accaaagacg	gcgtgctgat	gacgggccgg	gcgctgatga	cctacgggtt	2640
gcgcctcca	tcgctgcac	cggcgagtc	ggtgctgttc	accgccattc	gccaataagc	2700
cagacggcat	cgaacggagc	ataacaatgt	gccggcgcc	cagtcatgga	gtcgcgggca	2760
cattgcgtca	aagaacttgg	gtatcggtc	tagtcgttga	cgtcggcctt	gtagaagttc	2820
acgtaggaa	ggctgggggt	cgggcgcgc	tggccctgat	aatgggagcc	ggtgcccttg	2880
gagccgtaag	ggtgctcggc	cggagagctg	agctggaaga	agcacatctg	cccgatcttc	2940
atgccgggcc	agagcttgac	cggaaagcgc	gacacgttgc	tcaactccag	cgtgatatgc	3000
ccctcgaac	cggggtcgat	gaagccggcc	gtcgaatgtg	tgaggatgcc	cagacggccc	3060



agcgagcttt tgccttccaa gcgtgcgcgc accgtcgcgt cgagcttgac ggtactcccc 3120  
acgtcgagc 3129

<210> 2  
<211> 759  
<212> PRT  
<213> Bifidobacterium bifidum

<400> 2

Met Ser Leu Ile Glu Gln Phe His Gly Ala Ala Asp Gly Thr Glu  
1 5 10 15

Leu Thr Ala Ile Tyr Ala Glu Gln Pro Ala Ala Asp Val Ala Phe Ala  
20 25 30

Leu Val Phe Ala Gly His Gly Leu Pro Arg Phe Val His Trp Gly Arg  
35 40 45

Pro Leu Ala Ala Pro Gly Thr Val Leu Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Arg  
50 55 60

Pro Gln Arg Val Ser Gly Ala Leu Asp Glu Thr Ala Trp Pro Ser Ile  
65 70 75 80

Met Pro Thr Gln Ser Glu Ser Trp Ile Gly Ala Pro Arg Leu Asp Ile  
85 90 95

Arg Arg Ala Gly Val Thr Pro Phe Cys Ala Phe Thr Val Thr Gly Ile  
100 105 110

Ala Ile Arg Gln Asp Glu Arg Gln Gly Val Asp Val Ser Asp Gly Val  
115 120 125

Asp Gly Ala Ala His Thr Val Thr Gln Gln Val Pro Val Val Thr Val  
130 135 140

Thr Ala Ser Asp Ala Glu Gln Gly Val Glu Leu Ser Trp Thr Ala Glu  
145 150 155 160

Leu Leu Pro Gly Gly Leu Ile Arg Gln Arg Thr Thr Leu Arg Asn Leu  
165 170 175

Pro Ala Gly Asn Leu Pro Thr Gly Asp Leu Glu Val Gly Lys Val Glu  
180 185 190

Leu Gly Phe Pro Leu Pro Ala Leu Ala Thr Glu Ile Leu Thr Thr Thr  
195 200 205

Gly His His Leu Arg Glu Arg Ser Pro Gln Arg Gln Pro Leu Thr Glu  
 210 215 220  
 Gly Arg Phe Glu Lys Val Ser Met Ala Gly Arg Pro Gly Phe Asp Ala  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Leu Leu Ser Ala Gly Glu Pro Gly Phe Gly Phe Glu His Gly  
 245 250 255  
 Glu Val Tyr Ser Val His Val Gly Trp Ser Gly Asn Ser Val Leu Ser  
 260 265 270  
 Ala Glu Arg Gln Pro Tyr Thr Thr Gly Leu Ile Gly Gly Gly Glu Val  
 275 280 285  
 Leu Leu Gly Gly Glu Ala Thr Leu Ala Arg Gly Glu Thr Tyr Thr Thr  
 290 295 300  
 Pro Trp Leu Tyr Gly Ser Tyr Gly Asp Gly Leu Asn Glu Val Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Phe His Asp Tyr Val Arg Ser Cys His Pro Asp Leu Ala Val Lys  
 325 330 335  
 Pro Arg Pro Val Ile Leu Asn Thr Trp Glu Ala Val Tyr Phe Asp His  
 340 345 350  
 Asp Tyr Asp Thr Leu Lys Ala Leu Ala Asp Lys Ala Gly Asp Ser Gly  
 355 360 365  
 Val Glu Arg Phe Val Val Asp Asp Gly Trp Phe Gly Ser Arg Arg Asp  
 370 375 380  
 Ser Thr Ser Gly Leu Gly Asp Trp Gln Ile Ala Gln Asp Val Trp Pro  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Pro Lys Ser Leu Lys Ala Leu Ala Asp Tyr Val His Gly Lys  
 405 410 415  
 Gly Met Glu Phe Gly Leu Trp Phe Glu Pro Glu Met Val Asn Pro Asp  
 420 425 430  
 Ser Asp Val Ala Arg Ala His Pro Asp Trp Val Leu Arg Pro Thr Ala  
 435 440 445  
 Asn Arg Leu Pro Met Gln Gly Arg Ser Gln Gln Val Leu Asp Leu Thr  
 450 455 460

Asn Pro Asp Ala Tyr Arg Tyr Ile His Asp Ser Ile Asp Ala Leu Val  
 465 470 475 480

Gly Glu Leu Gly Ile Asp Tyr Ile Lys Trp Asp His Asn Lys Phe Val  
 485 490 495

Thr Glu Ala Val Ser Pro Arg Thr Gly Arg Pro Ala Val His Gly Gln  
 500 505 510

Thr Leu Ala Val Tyr Arg Met Phe Arg Asp Leu Glu Val Ala His Pro  
 515 520 525

Gly Leu Glu Ile Glu Ser Cys Ala Ser Gly Gly Gly Arg Ile Asp Leu  
 530 535 540

Gly Ile Leu Glu Phe Ala Ser Arg Val Trp Thr Ser Asp Cys Val Asp  
 545 550 555 560

Pro Val Glu Arg Ala Asp Ile Gln Arg Tyr Thr Ser Leu Leu Val Pro  
 565 570 575

Pro Cys Met Met Gly Glu His Val Gly Ala Ser Pro Ala His Ser Thr  
 580 585 590

His Arg Ala Thr Ser Gln Glu Met Arg Met Ala Met Ala Phe Phe Gly  
 595 600 605

His Met Gly Val Glu Trp Asn Leu Leu Lys Glu Pro Asp Glu Ala Leu  
 610 615 620

Asn Lys Leu Gly Glu Trp Val Ala Glu Tyr Lys Arg His Arg Ala Trp  
 625 630 635 640

Phe Ala Ile Asp Thr Cys Val His Ala Asp Ile Ala Asp Pro Ala Val  
 645 650 655

Arg Val Asp Gly Met Val Lys Pro Asp Arg Ser Ala Ala Phe Tyr Arg  
 660 665 670

Phe Thr Gln Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Pro Ala Ala Pro Ile Arg  
 675 680 685

Val Pro Gly Leu Asp Pro Asp Gly Thr Tyr Arg Ile Gln Pro Leu Trp  
 690 695 700

Leu Asp Leu Asp Leu Asp Gly Leu Gly Leu Gly Ser Gly Gln Ser Pro  
 705 710 715 720

Leu Gly Trp Trp Thr Lys Asp Gly Val Leu Met Thr Gly Arg Ala Leu  
 725 730 735

Met Thr Tyr Gly Leu Arg Pro Pro Ser Leu His Pro Ala Gln Ser Val  
 740 745 750

Leu Phe Thr Ala Ile Arg Gln  
 755

```

1  taaaccttca taaaaggaaa caaaagctgg aagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga
61  actagtggat ccccgggct gcagctcgtg gtgatctacg ttccgttcc caactccgcg
121  ttccgaccca cgcgcgtcgg accgtgggca tgggtcagat gcactctgct ccgcgcggtc
181  gtactgatcg cctcggaat ctacaaggcg atcatgcgcg ccacgaccg caagcgcggo
241  atcatggcat aacaatgcca taagcctcca ccggcagtea gggctcccgc tctccacatc
301  ggaaaacggg agcccttctc ataccocgga atcgtgaat atgcggtgac atgacggaac
361  gatgtcgtag catcgaggcg gaaccatata tcaatggcac gtccggaagg gattccgaat
421  gtcactcatc gaacaattcc atggcgccgc cgcgatgga acggaactca ccgctattta
481  tgcgtgagcag ccgctgctg atgtggcggt cgcgctggtc ttcccggtc accgtcttcc
541  gcgcttcgtg cactggggcc gaccgctcgc ggcccgggga accgtactcg ccgcatacga
601  cgccctgcgg ccgcagcgcg tgtccggcgc gctggacgag accgcctggc caagatcat
661  gcccacgcaa agcgagtcgt ggtatggggc accgcgactg gatatccgca ggcgcggcgt
721  aacgccttcc tgtgcattca cggtagccgg catcgcaatc cgtcaggacg aacgccaagg
781  cgttgacgtg tctgacggcg tggacgggtc cgcgcatacc gtccagcaac aggtgcgggt
841  cgtaaccgtg accgcgtcgg atgcccagca gggcgtgga ctgtcatgga cggccgaact
901  gttgcctcgg ccgctgatac gacgcgcgac cagcgtcgtt aatcttccag ccggtaatct
961  tccgaacggg gacttggaag tcggtaaaqt cgaactcggc ttcccgctcc cggcacttgc
1021  caccgagata ctaccacca ccggccatca tctgcgcgaa cgcagcccg ccgcgcagcc
1081  gctgacccga ggcgcttcg agaaggtctc gatggcgggg cgcacaggtt ttgacgctc
1141  tctgttgcct tcccgggcg agcccggtt cgggttcgag catggcgagg tctattcggt
1201  gcatgtgggc tggagcgcca attcctgtgt gtcggcagag cgtcagccgt atacgacgg
1261  tctgattggc ggcggcgagg tctgtcctcg cgcgcaggcc acgctcggcc ggcgcgaac
1321  gtacaccacc ccgtggctgt acgggtcgta cggtagcggg ctcaacgagg tggctcgag
1381  attccatgat tacgtacgct cctgtcaccg ggtctcgcg gtcaagccgc gtcgggtgat
1441  tctcaacacg tgggagcgcg tgtatttoga ccatgactac gacaogttga aggtcttggc
1501  cgataaggcc ggggattccg gtgtcgaaag gttcgtgtgt gatgacggct ggttcgctc
1561  ccgcgcgagc tccacatccg ggcctcggcg ctggcaata gcgcaggatg tgtggcggg
1621  cgggcccgaag agcctcaagg cgtcgcgcga ttacgtgcac ggaaaaggca tggagtccg
1681  cctgtgtgtc gaaccggaga tggtaacccc ggattccgac gtyggccgcy ccacccctga
1741  ctgggtgctg cgcgcgactg cgaaccgtct gccgatgcag ggacgctcgc agcaagtgtc
1801  cgacctgacc aatcccgag cctaccgata catccatgat tccatcgatg cgtgtgtcgg
1861  cgagttgggc atcgactaca tcaaatggga ccacaacaaa ttctcaccg aggcggtctc
1921  gccacgtacc ggagggccgg cgggtgcacyg gcagacgctc gccgtgtacc ggtgttccg
1981  tgacctcgaa gtcgcgcac cgggactgga gattgagagt tgcgcacggt ggcggcgcc
2041  tatcgacctg ggcatactcg aattcgcag ccgctgtgtg acgtccgact gctggaccc
2101  ggtcagcgcg gccgatattc agcggtaac gtcgctgtct gtgcgcctct gcatgatggg
2161  cgagcatgtg gggcgagtc ctgcacattc cagcgcacgc gccacgagcc aggagatgcg
2221  catggcgatg gcgttcttgc ggcacatggg cgtcgaatgg aatctgtctc aggagccgga
2281  cgaggcggtg aacaagctcg gcgaatgggt cgcgaatac aagaaggacc ggcacgtgtt
2341  cgcgatcgac acgtgcgtgc acccgatat cgcgatccg gccgtccggg tgcagcgcat
2401  ggtcaagccg gatcgttccg cggcgttcta ccggttcacg caactgacaa cgtccagac
2461  tctccctcgc gcgcgattc gcgtgcccgg tcttgacccc gatggcacgt accgcataca
2521  gccgttgttg ctggatctcg atctcgacgg gcttggctct ggacgcgcc agtogccgtt
2581  gggctgtgtg accaaagacg gcgtgctgat gacgggcggg gcgctgatga cctacgggtt
2641  gcgccttcca tctgtcate cggcgacgtc ggtgtgttcc accgcattc gccaatgaac
2701  cagacggcat cgaacggagc ataacaatgt gcggcgccgc cagtcatgga gtcgcggcca
2761  cattcggtca aagaacttgg gtatcggtc tagtcgttga cgtcggcctt gtagaagtcc
2821  acgtaggaaac ggcgtgggggt cgggcgcgc tggccctgat aatgggagcc ggtgccttgc
2881  gaggccgtaag ggtgctcggc cggagagctg agctggaaga agcacatctg cccgatcttc
2941  atgcggggcc agagcttgac cggaaagcgt gacacgttgc tcaactccag cgtgatatgc
3001  ccctcgaaac cggggctgat gaagccggcc gtcgaatgtg tgaggatgac cagacggccc
3061  agcgagcttt tgccctccaa gcgtgcccgc accgtcgcgt cgaagcttgc ggtactcccc
3121  acgtcagac

```

Фиг. 1

421 atgtcactcatcgacaattccatggcgccgcccgcgatggaacg  
 M S L I E Q F H G A A A D G T  
 466 gaactcacccgtattttatgtgagcagccggctgctgatgtggcg  
 E L T A I Y A E Q P A A D V A  
 511 ttccgctggtcttccgcggtcacggctcttccgcttccgtgcac  
 F A L V F A G H G L P R F V H  
 556 tggggccgaccgctcgcggcgccgggaaccgtactcgcgcgcatac  
 W G R P L A A P G T V L A A Y  
 601 gacgccctgcggccgagcgctgtccggcgcgctggacgagacc  
 D A L R P Q R V S G A L D E T  
 646 gcctggccaagcatcatgcccaacgcaaagcgagtcgtggataggg  
 A W P S I M P T Q S E S W I G  
 691 gcaccgcgactggatatccggcgcgccggcgtaacgccgttctgt  
 A P R L D I R R A G V T P F C  
 736 gcattcacgggtgaccggcatcgcaatccgtcaggacgaacgcca  
 A F T V T G I A I R Q D E R Q  
 781 ggcgttgacgtgtctgacggcggtggacgggtgccgcgcataccgtc  
 G V D V S D G V D G A A H T V  
 826 acgcaacaggtgcccgtcgtcacccgtgacccgctcgatgcccag  
 T Q Q V P V V T V T A S D A E  
 871 cagggcggtggaactgtcatggacggccgaactgttgcggcgccga  
 Q G V E L S W T A E L L P G G  
 916 ctgatcagacagcgacccacgctgcgtaatcttccagccggtaat  
 L I R Q R T T L R N L P A G N  
 961 ctcccgaccgggtgacttggaagtcggtaaagtcgaactcggcttc  
 L P T G D L E V G K V E L G F  
 1006 ccgctcccggcacttgccacggagatactcaccaccaccggccat  
 P L F A L A T E I L T T T G H  
 1051 catctgcgcgaacgcagcccgagcgccagccgctgaccgaagga  
 H L R E R S P Q R Q P L T E G  
 1096 cgcttcgagaaggtctcgtatggcgggcgcccagggttttgacgcc  
 R F E K V S M A G R P G F D A  
 1141 tctctgttgccttcccgcgggcgagcccgcttcgggttcgagcat  
 S L L L S A G E P G F G F E H  
 1186 ggcgaggtctattcgggtgcatgtgggtggagcggcaattccgtg  
 G E V Y S V H V G W S G N S V  
 1231 ctgtcggcagagcgctcagccgtatacgcacgggtctgattggcggc  
 L S A E R Q P Y T T G L I G G  
 1276 ggcgaggtgctgctcggcgcgagggccacgctcgcggcgcgga  
 G E V L L G G E A T L A R G E  
 1321 acgtacaccaccccggtggctgtacgggtcgtagcgtgacgggtc  
 T Y T T P W L Y G S Y G D G L  
 1366 aacgaggtggctgcgagattccatgattacgtacgctcctgtcac  
 N E V A A R F H D Y V R S C H  
 1411 ccggatctcgcgctcaagccgctccgggtgattctcaacacgtgg  
 P D L A V K P R P V I L N T W  
 1456 gaggcggtgtatttcgaccatgactacgacacgttgaaggctctg  
 E A V Y F D H D Y D T L K A L  
 1501 gccgataaggccgggattccgggtgtcgaacgggttcgtgggtggat  
 A D K A G D S G V E R F V V D  
 1546 gacggctgggttcgggtcccgccgagactccacatccgggtcggc  
 D G W F G S R R D S T S G L G  
 1591 gactggcacaatagcgcaggatgtgtggccggacgggcccgaagagc

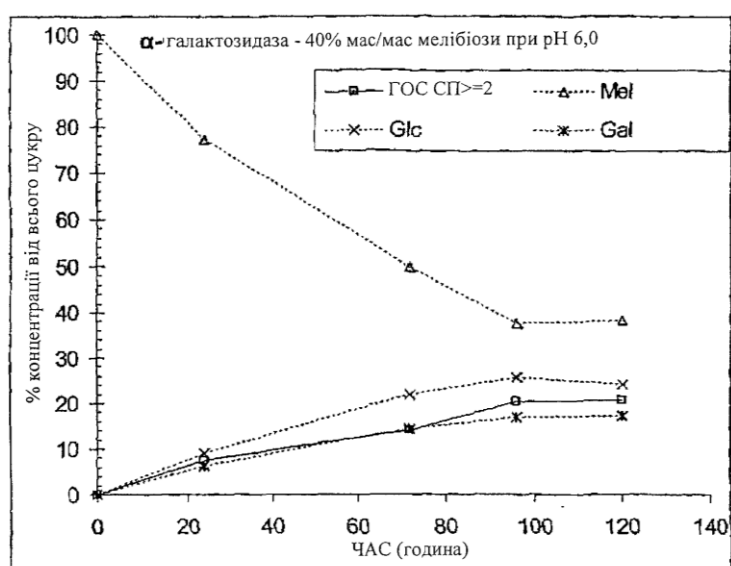
Fig. 2

D W Q I A Q D V W P D G P K S  
 1636 ctcaaggcgctcgccgattacgtgcacggaaaaggcatggagttc  
 L K A L A D Y V H G K G M E F  
 1681 ggccctgtggttcgaaccggagatggtcaaccggattccgacgtg  
 G L W F E P E M V N P D S D V  
 1726 gcccgcgccaccctgactgggtgctgcgcccgaactgcgaaccgt  
 A R A H P D W V L R P T A N R  
 1771 ctgccgatgcagggacgctcgcaagtgctcgacctgaccaat  
 L P M Q G R S Q Q V L D L T N  
 1816 cccgacgcctaccgatacatccatgattccatcgatgcgctggtc  
 P D A Y R Y I H D S I D A L V  
 1861 ggcgagttgggcatcgactacatcaaattgggaccacaacaattc  
 G E L G I D Y I K W D H N K F  
 1906 gtcaaccgagcggtctcgccacgtaccggcaggccggcggtgcac  
 V T E A V S P R T G R P A V H  
 1951 ggccagacgctcgccgtgtaccgatgttcggtgacctcgaaatc  
 G Q T L A V Y R M F R D L E V  
 1996 gcgcatccgggactggagattgagagttgcgcatcgggcgcgccg  
 A H P G L E I E S C A S G G G  
 2041 cgtatcgacctgggcatactcgaattcgccagccgctgtggacg  
 R I D L G I L E F A S R V W T  
 2086 tccgactgcgtggaccgggtcgagcgggccgatattcagcggtac  
 S D C V D P V E R A D I Q R Y  
 2131 acgtcgctgctcggtcgccgctgcgatgaggcgagcatgtgggg  
 T S L L V P P C M M G E H V G  
 2176 gcgagtcctgcacattccacgcacgcgcacgagccaggagatg  
 A S P A H S T H R A T S Q E M  
 2221 cgcattggcgatggcggttcttcgggcacatggcgctgaatggaat  
 R M A M A F F G H M G V E W N  
 2266 ctgctcaaggagccggacgagcggttgaaacaagctcggcgaaatgg  
 L L K E P D E A L N K L G E W  
 2311 gtcgocgaatacaagaggcaccgocgatggttcgcatcgacacg  
 V A E Y K R H R A W F A I D T  
 2356 tgcgtgcacgccgatatcgccgatccggcogtccgggtcgaoggc  
 C V H A D I A D P A V R V D G  
 2401 atggtcaagccggatcggttcgocggcggttctaccggttcacgcaa  
 M V K P D R S A A F Y R F T Q  
 2446 ctgacaacgtcccagactctccctgocggcgccgattcgcgtgcc  
 L T T S Q T L P A A P I R V P  
 2491 ggtcttgaccccgatggcacgtaccgcatacagccggttggtgctg  
 G L D P D G T Y R I Q P L W L  
 2536 gatctcgatctcgacgggcttggtcttgccagcgccagtcgccg  
 D L D L D G L G L G S G Q S P  
 2581 ttgggctggtggaccaaagacggcggtgctgatgacgggcccggcg  
 L G W W T K D G V L M T G R A  
 2626 ctgatgacctacgggttgccgacctccatcgctgcacccggcgag  
 L M T Y G L R P P S L H P A Q  
 2671 tcggtgctgttcacccgacattcgccaataa 2700  
 S V L F T A I R Q \*

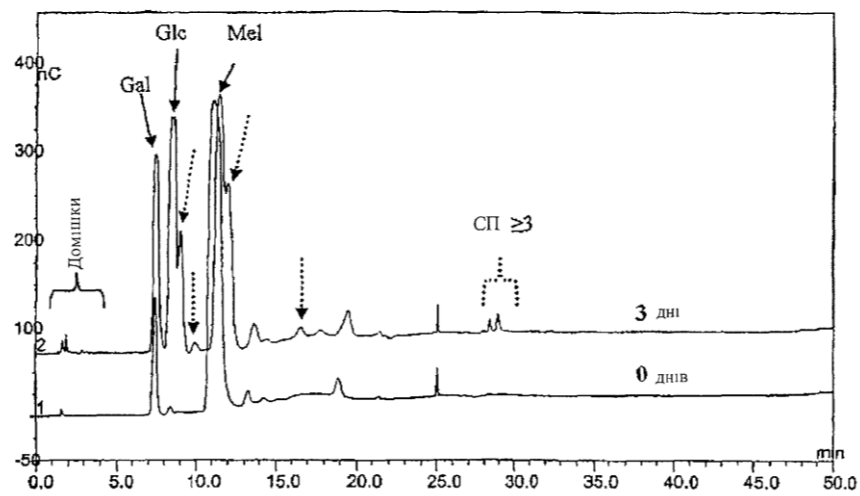
Фіг. 2 (продовження)

MSLIEQFHGAAADGTELTATYAEQPAADVAFALVFAGHGLPRFV  
 HWGRPLAAPGTVLAAYDALRPQRVSGALDETAWPSIMPTQSESWIGAPRLDIRRAGVTPFCFTVTG  
 IAIRQDERQGVSDVSDGVDGAAHTVTQQVPVVTVTASDAEQGVELSWTAELLPGGLIRQRTTLRNLP  
 AGNLPTGDLEVGKVELGFPLPALATELTTTGHHLRERSPQRQPLTEGRFEKVSMAGRPGFDASLLS  
 AGEPRGFGFEHGEVYSVHVGWSGNSVLSAERQPYTTGLIGGGEVLLGGEATLARGETYTPWLYGSY  
 GDGLNEVAARFHDYVRSCHPDLAVKPRPVILNTWEAVYFDHDYDTLKALADKAGDSGVERFVDD  
 GWFGRRDSTSGLDWQIAQDVWPDGPKSLKALADYVHGKGMFGLWFEPEMVNPDSDVARAHP  
 DWVLRPTANRLPMQGRSQQLDLTNPDAYRYIHDSIDALVGELGIDYIKWDHNKQVTEAVSPRTGR  
 PAVHGQTLAVYRMFRDLEVAHPGLEIESCASSGG

Фиг. 3



Фиг. 4



Фіг. 5