



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95944 (13) C2

(51) МПК

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/38 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА З АКТИВНІСТЮ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИЛТРАНСФЕРАЗИ

1

(21) а200810768
(22) 23.01.2007
(24) 26.09.2011
(86) PCT/GB2007/000178, 23.01.2007
(31) 0601901.2
(32) 31.01.2006
(33) GB
(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.
(72) ЦОРЦИС ГЕОРГИОС, GB, ГОУЛАС АТАНАСИОС К., GB, ГОУЛАС ТЕОДОРΟΣ, GB
(73) КЛАСАДО ІНК., РА
(56) DATABASE UniProt [Online] 1 March 2001 (2001-03-01), "Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23)." XP002429540 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9F4D6 Database accession no. Q9F4D6. DATABASE EMBL [Online] 26 October 2000 (2000-10-26), "Bifidobacterium bifidum gene for beta-galactosidase (3701 bp)" XP002429539 retrieved from EBI accession no. EMBL:AJ224434 Database accession no. AJ224434.
WO 2005/003319 A, 13.01.2005.
(57) 1. Фермент β-галактозидаза з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2, що кодується ДНК з послідовністю SEQ ID NO: 1.
2. Фермент β-галактозидаза, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2.
3. Реконбінантний вектор, що містить ДНК з послідовністю SEQ ID NO: 1.
4. Вектор за п. 3, де вказаний вектор є вектором експресії.
5. Клітина-хазяїн, що містить послідовність ДНК за п. 1.
6. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 3 або п. 4.
7. Клітина-хазяїн за будь-яким з п. 5 або п. 6, де вказана клітина є бактеріальною клітиною, дріжджовою або грибовою клітиною.
8. Клітина-хазяїн за п. 7, де вказана клітина вибрана з групи, що складається з Bifidobacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus і Aspergillus.
9. Клітина-хазяїн за п. 8, де клітина вибрана з групи, що складається з Bifidobacterium bifidum, Bacillus subtilis, Bacillus circulans і Aspergillus niger.
10. Застосування ферменту β-галактозидази з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 2 для одержання суміші олігосахаридів, що містить β-

2

зв'язані галактоолігосахариди і α-зв'язаний галактоолігосахарид Gal(α 1-6)Gal.
11. Застосування за п. 10, де суміш містить дисахариди Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal і Gal(α 1-6)Gal.
12. Застосування за п. 10 або п. 11, де суміш містить трисахариди Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, і пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.
13. Застосування ферменту β-галактозидази за п. 1 або 2 або клітини за будь-яким з пп. 5-9 для одержання суміші олігосахаридів, призначеної для того, щоб бути частиною продукту, вибраного з групи, що складається з молочних продуктів, таких як рідке молоко, висушений молочний порошок, дитячі молочні суміші, дитячі поживні суміші, морозиво, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти, напоїв, таких як фруктовий сік, дитячого харчування, круп'яних продуктів, хліба, печива, кондитерських виробів, тортів, харчових добавок, дієтичних добавок, пробіотичних харчових продуктів, пребіотичних харчових продуктів, корму для тварин, корму для птиці і медикаментів.
14. Застосування за п. 13, де суміш включає дисахариди Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal і Gal(α 1-6)Gal, трисахариди Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc і пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.
15. Застосування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 5-9 для одержання продукту, вибраного з групи, що складається з молочних продуктів, таких як рідке молоко, висушений молочний порошок, дитячі молочні суміші, дитячі поживні суміші, морозиво, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти, напоїв, таких як фруктовий сік, дитячого харчування, круп'яних продуктів, хліба, печива, кондитерських виробів, тортів, харчових добавок, дієтичних добавок, пробіотичних харчових продуктів, пребіотичних харчових продуктів, корму для тварин, корму для птиці і медикаментів.
16. Спосіб одержання ферменту за будь-яким з пп. 1 або 2, що включає культивування клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 5-9 у відповідному культуральному середовищі в умовах, які допускають

(13) C2

(11) 95944

(19) UA

експресію вказаного ферменту і виділення ферменту, що утворюється, з культури.

17. Спосіб одержання суміші олігосахаридів, що містить дисахариди Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal і Gal(α 1-6)Gal, трисахариди Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид

Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc і пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, що включає контактування ферменту за будь-яким з пп. 1 або 2 або клітини-хазяїна за будь-яким з пп. 5-9 з матеріалом, що містить лактозу.

Даний винахід стосується β -галактозидази з трансгалактозилюючою активністю, здатної перетворювати лактозу у суміш олігосахаридів, які зв'язані β -зв'язком, і несподівано продукувати дисахарид α 1-6-галактобіозу з α -зв'язком. Зокрема, винахід стосується β -галактозидази, виділеної з нещодавно відкритого штаму *Bifidobacterium bifidum*.

Зокрема, винахід стосується послідовностей ДНК, що кодує виділений фермент β -галактозидазу, ферменту, що кодується послідовністю ДНК, і клітини-хазяїна, що містить послідовність ДНК або рекомбінантний вектор, який включає послідовність ДНК. Даний винахід також стосується застосування ферменту, що кодується послідовністю ДНК, або клітини-хазяїна, що містить послідовність ДНК або рекомбінантний вектор, для виробництва олігосахаридів.

Біфідобактерії природним чином колонізують нижній відділ кишкового тракту, середовище якого містить незначну кількість моно- і дисахаридів, оскільки такі цукри переважно споживають хазяїн і мікроорганізми, які є присутніми у верхньому відділі кишкового тракту. Для того, щоб існувати у нижньому відділі кишкового тракту, біфідобактерії продукують різні поверхнево-зв'язані екзо- і ендоглікозидази і/або позаклітинні форми, за допомогою яких вони можуть утилізувати різні вуглеводи.

Нарівні з гідролазною активністю деякі ферменти біфідобактерій володіють трансферазною активністю. Ця трансглікозилююча активність глікозидаз широко використовується для ферментативного синтезу різних олігосахаридів, які виявилися здатними діяти як фактори, що стимулюють ріст біфідобактерій.

Відомо, що представники біфідобактерій продукують ферменти β -галактозидази, які беруть участь у бактеріальному метаболізмі лактози. Moller, P.L. et al у Appl & Environ. Microbial, (2001), 62, (5), 2276-2283 описують виділення і дають характеристики трьох β -галактозидазних генів зі штаму *Bifidobacterium bifidum*. Вони знайшли, що всі три β -галактозидази здатні каталізувати утворення бета-зв'язаних галактоолігосахаридів за допомогою трансгалактозилювання.

Dumortier et al у Carbohydrate Research, 201, (1990), 115-123 описали утворення бета-зв'язаних олігосахаридів за реакцією трансгалактозилювання при гідролізі лактози *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Їх аналіз структури суміші олігосахаридів, що продукуються, показав, що ці зв'язки були β -(1 \rightarrow 3)-, β -(1 \rightarrow 6)- і β -(1 \rightarrow 4)-D-галактозилними зв'язками. Dumortier припустив, що сполуки, які

продукуються *Bifidobacterium bifidum*, необхідні для адгезії бактерій у товстому кишечнику.

Був виявлений штам *Bifidobacterium bifidum*, здатний продукувати активний фермент галактозидазу, що перетворює лактозу у нову суміш галактоолігосахаридів, яка, як несподівано було виявлено, містить до 35% дисахаридів, включаючи галабіозу (Gal(α 1-6)-Gal). Відомо (див. Paton, J C and Paton, A W (1998), Clin. Microbiol. Revs., 11, 450-479; Carlsson, K A (1989), Ann. Reviews Biochem., 58, 309-350), що цей дисахарид є антиадгезивом, здатним запобігати адгезії токсинів, наприклад, токсину Shiga, і патогенів, таких як *E. coli*, до стінок кишечника.

Цей штам *B. bifidum* 31 березня 2003 року був депонований у Національній колекції промислових і морських бактерій, Абердин, Великобританія (Eng). Він також описаний у патенті UK №2412380.

Було виявлено, що штам *B. bifidum* продукує декілька β -галактозидаз, одна з яких несподівано демонструє активність α -галактозилтрансферази. Цей фермент продукує ряд різних олігосахаридів, які зв'язані β -зв'язками, але також продукує і α -зв'язаний дисахарид галабіозу.

Даний винахід стосується послідовності ДНК, що кодує білок з амінокислотною послідовністю, представленою у SEQ ID NO: 2, або у жорстких умовах гібридизується з послідовністю ДНК, що кодує цей білок. У SEQ ID NO: 1 наведена ця послідовність ДНК або її фрагмент або вироджене похідне.

Термін «вироджене похідне» означає послідовність ДНК, яка гомологічна SEQ ID NO: 1 не менш ніж на 50%, переважно, на 50-98%, найбільш переважно, на 75-95%.

Така послідовність ДНК може містити нуклеотидні заміни, вставки або делеції, які у результаті дають менше 60%, переважно менше 45%, більш переважно менше 25% змін в амінокислотній послідовності, показаній у SEQ ID NO: 2. Нуклеотидні заміни можуть у результаті давати консервативні заміни амінокислот.

Відповідно до другого аспекту винахід стосується ферменту, що кодується послідовністю ДНК, визначеною вище. Такий фермент може містити амінокислотну послідовність, наведену у SEQ ID NO: 2, або її фрагмент.

Відповідно до третього аспекту винахід стосується рекомбінантного вектора, переважно, вектора експресії, що містить послідовність ДНК, визначену вище. Такий вектор може бути частиною клітини-хазяїна, такої як бактеріальна, дріжджова або грибова клітина. Альтернативно, послідовність ДНК може бути частиною такої клітини-хазяїна. Відповідна клітина-хазяїн може бути виб-

пана з *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* (наприклад, *Bacillus subtilis* або *Bacillus circulans*), *Escherichia* і *Aspergillus* (наприклад, *Aspergillus niger*).

Використовуючи лактозу як субстрат, фермент, що кодується послідовністю ДНК, визначеною вище, продукує суміш дисахаридів, що включає Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal і Gal(α 1-6)Gal. У цій суміші олігосахаридів також присутні трисахариди Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc і пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.

Фермент клітини-хазяїна, описаний вище, можна використовувати для продукування суміші дисахаридів, включаючи Gal(α 1-6)Gal (галабіозу), що може скласти частину продукту, призначеного для поліпшення стану здоров'я кишечника. Такий продукт може бути вибраний з групи, що складається з молочних продуктів (наприклад, рідке молоко, сухий молочний порошок, такий як порошок незбираного молока, порошок знежиреного молока, молочні порошки, збагачені жиром, порошки молочної сироватки, молоко для дітей, дитячі молочні суміші, морозиво, дитячі харчові продукти, йогурт, сир, ферментовані молочні продукти), напоїв, таких як фруктовий сік, дитячого харчування, круп, хлібу, печива, кондитерських виробів, тортів, харчових добавок, дієтичних добавок, симбіотичних харчових продуктів, пребіотичних харчових продуктів, корму для тварин, корму для птахів або взагалі будь-яких інших харчових продуктів або напоїв.

Альтернативно, олігосахариди, вироблені таким чином, можна використовувати для приготування медикаменту (наприклад, у формі таблетки або капсули) для запобігання адгезії патогенів або токсинів, що продукуються патогенами, до стінки кишечника. Цей медикамент можна вводити пацієнту, наприклад, після курсу лікування антибіотиком, що часто змінює або навіть ушкоджує нормальну здорову кишкову флору.

Відповідно до подальшого аспекту, винахід стосується способу виробництва ферменту, визначеного вище, що включає культивування клітини-хазяїна, визначеної вище, у відповідному культуральному середовищі в умовах, що дозволяють експресію цього ферменту, і виділення продукowanego ферменту з цієї культури.

Винахід також стосується способу одержання суміші олігосахаридів, включаючи дисахарид Gal(α 1-6)-Gal (галабіозу), що включає контактування ферменту, визначеного вище, або клітини-хазяїна, визначеної вище, з матеріалом, що містить лактозу, в умовах, які ведуть до утворення цієї суміші олігосахаридів.

Придатний матеріал, що містить лактозу, може бути вибраний з комерційно доступної лактози, незбираного молока, напівзнежиреного молока, знежиреного молока, молочної сироватки і молока, збагаченого жиром, фільтрату молочної сироватки. Такі молочні продукти можуть бути одержані від корів, буйволиць, овець або кіз. Молоко, збагачене жиром, визначають як незбиране молоко, з

якого видалили молочний жир, який потім замінили додаванням рослинного жиру або олії.

Короткий опис фігур

На фігурі 1 показана нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO: 1) β -галактозидази *Bifidobacterium bifidum* за винаходом; і

На фігурі 2 показана амінокислотна послідовність (SEQ ID NO: 2), що відповідає нуклеотидній послідовності фігури 1;

На фігурі 3 представлений графік, що показує проходження у часі реакції при синтезі галактоолігосахариду з β -галактозидазою і 40% за масою лактози як субстрату в 0,1 М фосфатному буфері при pH 6,0; і

На фігурі 4 представлена високоефективна аніонобінна хроматограма суміші галактоолігосахаридів, синтезованих β -галактозидазою з *B. bifidum* NCIMB 41171 з використанням 40% за масою лактози як субстрату в 0,1 М фосфатному буфері при pH 6,0. (Glc = глюкоза, Gal = галактоза, Lac = лактоза, α (1-6)галактобіоз, DP = ступінь полімеризації).

Геномну ДНК виділяли зі штаму *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) з використанням способу Lawson et al. (1989) *Fems Microbiol Letters*, 65, (1-2), 41-45. ДНК обробляли ферментами рестрикції, і фрагменти з максимальним розміром 15 т.п.н. лігували з вектором pSP72, який піддався дії тих ферментів рестрикції. Клітини *E. coli* трансформували вектором, що містить вставки, які складаються з хромосомної ДНК *B. bifidum*, обробленої (рестриктазами) PstI, Eco RI, Bam HI, KpnI, SmaI або HindIII. Клоні з β -галактозидазною активністю відібрали на агарових середовищах Лурія-Бертані, що містять п-нітрофенол, X- β -Gal (5-бром-4-хлор-3-індоліл- β -D-галактозид) та ізопропіл- β -D-тіогалактозид (IPTG). Лігуючі суміші з хромосомної ДНК, перевареної Bam HI, дали сім клонів, позитивних на β -галактозидазу, один з яких був ідентифікований як pB1.

Секвенування вставленого фрагмента ДНК B1 проводили з використанням дидезоксинуклеотидного методу термінації ланцюга за Сенгером (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 B1 показана на фігурі 1 (SEQ ID NO: 1).

Відкриту рамку зчитування (ORF) ідентифікували за допомогою програми ORF Finder з NCBI (National Center of Biotechnology Information). Нуклеотидна послідовність Фігури 1 була трансьована у всіх шести можливих рамках зчитування і була ідентифікована одна відкрита рамка зчитування (1052 амінокислот), що кодує передбачувану β -галактозидазу. Трансляція показана на Фігурі 2 (SEQ ID NO: 2).

Нижче даний винахід описаний з посиланнями на наведені далі приклади.

Приклад 1

Матеріали і методи

Усі хімічні реагенти і препарати середовищ, використані у цій роботі, були одержані від Sigma (Dorset, UK), Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid

(Basingstoke, UK), Qiagen (West Sussex, UK) і Promega (Southampton, UK).

Бактеріальні штами

Штам *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) зберігали на криогенних гранулах у пробірках Microbank при -70°C . Для подальших експериментів штам оживляли на агарі Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, UK) і середовищі TRY (середовище Триптиказа з фітоном і дріжджовим екстрактом) і вирощували анаеробно (склад CO_2 і N_2 - 80% і 20% відповідно) при 37°C протягом 48 годин. Морфологію колоній і відсутність забруднень перевіряли забарвлюванням за Грамом.

Штами *E. coli*

Штам *Escherichia coli* DH5a, використаний у цій роботі, звичайно інкубували в аеробних умовах при 37°C на агаровому середовищі Лурія-Бертані (LB) або бульйоні (Sambrook J. and Russell W. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) і за необхідності додавали антибіотики (100 мкг/мл ампіциліну і/або 15 мкг/мл хлорамфеніколу) і 40 мкл 2% X- β -Gal, 7 мкл 20% ізопропіл- β -D-тіогалактози (IPTG), що наносили на поверхні заздалегідь приготованих 90-мм агарових чашок.

Штам *E. coli* DH5a (Invitrogen, Paisley, UK) (ре-нотип: F^{-} ϕ 80lacZAM A(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^{-} , m_k^{-}) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^{-}) є штамом, позитивним за α -галактозидазою, і його використовували в експериментах з експресії і для інших генетичних маніпуляцій.

Екстракція геномної ДНК з *Bifidobacterium bifidum*

Геномну ДНК виділяли зі штаму *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) з використанням наведеного нижче способу, в якому хромосомну ДНК готували з клітинного осаду, зібраного зі 100 мл анаеробного бульйону WC. Клітини ресуспендували у 10 мл TES-буфера (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8) і обробляли 200 мкл суміші лізоциму з мутанолізином (4:1, лізоцим 10 мг/мл, мутанолізін 1 мг/мл) протягом 30 хвилин при 37°C . Потім клітини обробляли 200 мкл протеїнази K (при 20 мг/мл) і 200 мкл РНКаз (обидві 10 мг/мл), перемішували та інкубували 1 годину при 65°C . Остаточну клітини обробляли 2 мл 10% ДДС та інкубували 15 хв. при 65°C . Додавали 12 мл фенолу з хлороформом і екстракцію повторювали доти, доки водна фаза не починала легко відділятися від проміжної фази. Геномну ДНК осаджували ізопропанолом і ресуспендували у 10 mM Tris-HCl - 1 mM EDTA (pH 8). Потім геномну ДНК переварювали з ферментами рестрикції, проводили лігування в рSP72, переварені тими ж ферментами, і обробляли лужною фосфатазою. Переварювання геномної ДНК *B. bifidum* проводили, використовуючи EcoRI, PstI, BamHI, SmaI і KpnI. Лігуючі суміші використовували для трансформування *E. coli* DH5a; клони, позитивні за β -галактозидазою, ідентифікували як сині колонії на пластинках, що містять X-Gal.

Приготування векторної ДНК

У цій роботі як вектор для клонування та експресії використовували рSP72 (Promega, UK)

(Krieg, P.A. and Melton, D. A. (1987). *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*. 155: 397-415).

Цей вектор вибрали внаслідок відсутності комплементарної активності α -фрагмента β -галактозидази, який не кодований у рSP72. Цей вектор не несе короткий сегмент ДНК *E. coli*, що містить регуляторну послідовність і кодує інформацію для перших 146 амінокислот β -галактозидази, що, у комбінації зі штамми *E. coli* (тобто DH5a), які експресують C-кінцеву частину цієї β -галактозидази, дає активну β -галактозидазу (α -комплементация).

Вектор переварювали наступними рестрикційними ферментами: PstI, BamHI, HindIII, SmaI, KpnI та EcoRI відповідно до інструкцій виробника, з використанням десятикратного надлишку ферменту стосовно ДНК (одиниці ферменту: мікрограм ДНК дорівнює 10 одиницям ферменту на один мкг плазмідної ДНК або 10 одиницям ферменту на 0,5 пмоль плазмідної ДНК). Після термоінактивації ферментів (20 хв. при 65°C) рестрикційну картину аналізували за допомогою електрофорезу у горизонтальному гелі. Присутність єдиного фрагмента у гелі означало повне переварювання вектора і його єдиний сайт рестрикційного переварювання.

Достатність переварювання вектора перевіряли також трансформацією нелігованих молекул у компетентні клітини *E. coli* DH5a. Кількість утворених колоній на пластинках LB-агару з доданням ампіциліном (100 мкг/мл) служила показником непереверених молекул і очікуваного фону при подальших експериментах.

Вектори додатково дефосфорилювали телячою кишковою лужною фосфатазою CIAP (Promega, Southampton, UK) відповідно до інструкцій виробника. Ефективність цієї обробки перевіряли за самолігуванням (з ДНК-лігазою бактеріофагу T4 відповідно до інструкції виробника) після трансформації у клітини DH5a. Кількість утворених колоній показувала кількість молекул, повторно замкнених у кільця (неклонований вектор), а віднімання від неї числа утворених колоній без обробки вектора CIAP давало кількість недефосфорилизованого вектора.

Побудова бібліотеки геномної ДНК

Геномну ДНК частково переварювали шістьма ферментами рестрикції, які пізнають гексануклеотидні послідовності, що часто зустрічаються, у прокаріотичній ДНК. EcoRI, BamHI, PstI, KpnI, SmaI і HindIII є рестрикційними ендонуклеазами типу II, що специфічно пізнають послідовності 5'/GAATTC3', 5'/CATCC3', 5'/CTGCA/G3', 5'/GGTAC/G3', 5'/CCC/GGG3' і 5'/AGCTT3' відповідно і роблять двохніткові розриви у цих послідовностях, утворюючи 5'-оверхенги з чотирьох нуклеотидів, AATT, GATC, AGCT для EcoRI, BamHI і HindIII відповідно, і 3'-оверхенги, ACGT, GTAC для PstI і KpnI відповідно і тупі кінці для SmaI.

Усі ці ферменти були активними і здатними розщеплювати ДНК тільки у присутності іонів магнію. Ці іони були єдиним необхідним кофактором.

Рестрикційне переварювання ДНК

Переварювання зразків ДНК усіма рестриктазами проводили при інкубації протягом 2 годин при

37°C з кінцевою термоінактивацією при 65°C протягом 20 хвилин. Реакційні суміші потім охолоджували до кімнатної температури і додавали відповідну кількість робочого буфера з подальшим обережним перемішуванням запаюним скляним капіляром. Потім розчини завантажували в ямки 0,8% агарозного гелю (при напрузі 4-5 вольт/см протягом 14-16 годин) і розмір перевареної ДНК оцінювали за допомогою 1-тпо стандартів ДНК (Promega, UK) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002)).

Очищення фрагментів, утворених після переварювання рестриктазами

З реакційних сумішей і агарозних гелів фрагменти очищали за допомогою набору для екстракції з гелів QIAEX від Qiagen (West Sussex, UK). Протоколи докладно описані в інструкції виробника.

Лігування ДНК і трансформація

Після очищення фрагментів ДНК за допомогою набору для екстракції з гелів QIAEX їх лігували з вектором pSP72, обробленим CIAP. Для лігування відповідні кількості ДНК переносили у стерильні мікроцентрифужові пробірки, як показано у Таблиці 1.

Таблиця 1

Пробірка	Днк
A	Вектор (15 фмоль [~29,7 нг])
B	Вектор (15 фмоль [~29,7 нг]) плюс вставка (сторонні 15 фмоль ~69,3 нг)
C	pUC контроль (0,056 фмоль [~100 пг])

Молярне співвідношення плазмідного ДНК-вектора до фрагмента ДНК, що вставляється, у реакції лігування повинне бути ~1:1. Кінцева концентрація ДНК повинна бути ~10 нг/мкл.

Таблиця 1. Суміші лігування. Пробірка А показує кількість самолігуючої векторної ДНК, яку слід відняти від загальної кількості трансформантів після трансформації. Пробірка В показує лігування вектора з фрагментами ДНК, а пробірка С показує контроль для розрахунку ефективності трансформації.

Перед кожним лігуванням фрагменти ДНК нагрівали при 45°C протягом 5 хвилин для розплавлювання будь-яких липких кінців, що були піддані повторному відпалу при приготуванні фрагмента. Молярне співвідношення вектор:вставка ДНК було вибране на рівні 1:1 для всіх реакцій лігування, які проводили за інструкціями Promega.

У пробірки А і В додавали по 1,0 мкл 10-кратного буфера лігування і 0,5 одиниць Вейса ДНК-лігази T4 (Promega, UK) і об'єм доводили до 10 мкл водою молекулярно-біологічної чистоти. У пробірку С додавали 1,0 мкл 10-кратного буфера лігування і об'єм лігування доводили до 10 мкл водою молекулярно-біологічної чистоти.

У пробірки додавали фрагменти ДНК з водою і нагрівали до 45°C протягом 5 хвилин для розплавлювання всіх липких кінців, що були піддані повторному відпалу при приготуванні. Перед додаванням інших реагентів лігування ДНК охолоджували до 0°C і реакційні суміші інкубували протягом ночі при 16°C (Sambrook and Russell, 2001).

Після осадження етанолом і очищення лігуючих фрагментів (для видалення лігуючої суміші, що знижує ефективність трансформації) прово-

дили трансформацію за інструкціями Hanahan. ~50 нг лігуючої ДНК у 5 мкл розчину додавали до 100 мкл компетентних клітин E. coli DH5a. Після термообробки та експресії гена резистентності до ампіциліну клітини розподіляли по поверхні чашок середовища LB, що містить ампіцилін (100 мкг/мл), X-β-Gal (40 мкл 2% X-β-Gal) та IPTG (7 мкл 20% IPTG).

Визначали кількість трансформантів з кожної реакції лігування. Звичайна кількість трансформантів, одержуваних з пробірки С, складала 2×10^5 - 1×10^6 КУО/мкг, тоді як з пробірки А одержували 500-600 КУО/мкг. Кількість трансформантів у пробірці А була показником ефективності векторної ДНК. Кількість трансформантів у пробірці В була у діапазоні 2 - 4×10^6 КУО/мкг.

Кількість трансформантів

Лігуючі суміші з хромосомної ДНК, перевареної PstI, дали 13 клонів, позитивних на β-галактозидазу з ~2500 проскринованих трансформантів, тоді як після переварювання BamHI одержано 7 позитивних клонів (~1500 проскринованих трансформантів), обробка EcoRI дала 3 позитивних клони (~1300 проскринованих трансформантів), KpnI - 7 позитивних клонів (~2000 проскринованих трансформантів), SmaI - 3 позитивних клони (~1600 проскринованих трансформантів) і HindIII - 2 позитивних клони (~1200 проскринованих трансформантів).

Переварювання позитивних клонів

Для ідентифікації різних генів β-галактозидази плазміди, виділені з позитивних клонів, піддавали переварюванню відповідно до наведеної нижче таблиці.

Таблиця

	Зразки	Ферменти
1-е переварювання	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	BamHI
2-е переварювання	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	PstI
3-є переварювання	pP12, pP13, pP14	PstI
4-е переварювання	pE1, pE2, pE3	EcoRI
5-е переварювання	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3.....	PstI і EcoRI
6-е переварювання	pS1, pS2, pS3	SmaI
7-е переварювання	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	PstI і SmaI
8-е переварювання	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	KpnI
9-е переварювання	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	PstI і KpnI

Перша буква (p) позначає плазмиду і вставний ген, а друга буква (P, B, E, S, K) позначає фермент рестрикції, який використовували для виділення відповідного клону з геномної ДНК.

Гель-електрофоретичний аналіз фрагментів, утворених після переварювання, показав, що кожна плазміда pB1, pP1, pP2 і pP11 має вставку, що кодує іншу β-галактозидазу. Для подальшого аналізу використовували клони, що містять pB1.

Секвенування ДНК

ДНК секвенували, застосовуючи дидезокси-нуклеотидну термінацію за Сенгером, використовуючи набір для циклічного секвенування BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems, USA), і аналізували за допомогою флуоресцентної системи аналізу ДНК ABI Prism 3100, що включає капілярний електрофорез.

5'- і 3'-кінці вставлених фрагментів ДНК секвенували з праймерами, специфічними для векторів. Для подальшого секвенування вставок використовували Genome Priming System (GPS-I) (New England Biolabs, UK). GPS-I є системою, що діє *in vitro*, яка базується на транспозоні TN7 і використовує транспозазу TnsABC для того, щоб випадковим чином вставляти транспозон у ДНК-мішень. Відповідно до інструкції виробника, використовували співвідношення мас донор:ДНК-мішень, що дорівнює 1:4. Кількість плазмід, виділених для секвенування після вставок транспраймера у плазмиду-мішень, складало 25. Ця кількість була розрахована відповідно до інструкцій виробника і припускала 5-кратну глибину покриття.

Для плазмиди pB1 вставка транспозону, який приблизно дорівнює 1699 тпо, у позиції біля 973-ї пари основ нижче множинно клонованого сайта використаного вектора, цілком елімінувала активність β-галактозидази, тим самим демонструючи, що стартовий кодон знаходився між вектором MCS (multiple cloning site) і сайтом транспозону, тоді як введення вставки у позиції 841 нижче MCS вело до утворення активної β-галактозидази, тим самим вказуючи, що стартовий кодон існує між парами основ у позиціях 841 і 973 нижче MCS. Ферментативна активність повністю усувалася введенням вставки у позиції 3586 пар основ нижче MCS, тим самим вказуючи, що термінуючий кодон знаходиться нижче цієї позиції. Більш того, вставки у позиціях 1239 по, 1549 по, 1683 по, 1832 по, 2108 по, 2189 по, 2270

по, 2340 по, 2414 по, 2574 по, 2648 по, 2734 по, 2807 по і 3410 по повністю усували ферментативну активність.

Реакційна суміш секвенування містила приблизно 400-600 нг плазмідної ДНК, 3,2 пмоль розчину праймера і 4 мкл розчину BigDye Terminator.

Ідентифікація відкритої рамки зчитування

Відкрита рамка зчитування (BP3) була виявлена з використанням BP3-шукача від NCBI. Довжина рамки, визначена з використанням бактеріального генетичного коду, складала 100 пар основ. Нуклеотидна послідовність була трансльована у шість можливих рамок, що дозволило ідентифікувати відкриту рамку зчитування 1052 амінокислот, що кодує передбачувану β-галактозидазу (ця трансляція показана на Фігурі 2).

Приклад 2

Синтез за допомогою клонованого ферменту β-галактозидази, виділеної з *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 в *E. coli* як хазяїна (штам PH5a)

Синтез, описаний нижче, проводили, якщо не зазначено інакше, з цілими клітинами *E. coli* DH5a як хазяїна після обробки біомаси *E. coli* (зібраної центрифугуванням при 10000 g) толуолом у концентрації 2000 чм, для збільшення проникності клітини, щоб зробити її нежиттєздатною, зруйнувавши її цитоплазматичну мембрану. Біомасу *E. coli* готували, як описано у п. «Штами *E. coli*» Прикладу 1.

Синтез за допомогою клонованого ферменту

Синтез з β-галактозидазою проводили при початковій концентрації лактози, яка дорівнює 40 мас. %, прийнятій як концентрація субстрату. Розчин для цього синтезу готували в 0,1 М фосфатному буфері при pH 6,8 (або 0,1 М цитратному буфері pH 6,2 або калій-фосфатному буфері pH 6,8). Синтез проводили при 40°C на водяній бані при струшуванні при 150 об./хв. Оптимум pH для цього специфічного ферменту вибрали, базуючись на вимірюваннях активності (з використанням о-нітрофеніл-β-D-галактопіранозиду як субстрату) препарату специфічного ферменту при різних значеннях pH.

Для синтезу галактоолігосахариду 5 мл суспензії клітин *E. coli* DH5a (з активністю 2,2 од./мл) центрифугували (при 10000 g) для збирання біомаси, відкинувши супернатант. Щоб

провести синтез, цю біомасу ресуспендували з 10 г 40% за масою розчину субстрату.

Концентрації різних цукрів, які є присутніми у суміші при синтезі, показані на фігурі 3. На Фігурі 4 показані хроматограми, одержані при високоефективній аніонообмінній хроматографії, поєдна-

ній з пульсуючим амперометричним детектуванням (НРАЕС-PAD), для сумішей галактоолігосахаридів, синтезованих клонованою β -галактозидазою з *B. bifidum* NCIMB 41171. Концентрації цукрів у цій суміші галактоолігосахаридів в оптимальний час синтезу показані у Таблиці 1.

Таблиця 1

Вуглеводний склад синтезу галактоолігосахаридів при початковій концентрації лактози, яка дорівнює 40% за масою, у момент часу, коли спостерігалася максимальна концентрація олігосахаридів

Початкова концентрація субстрату при синтезі	GOS DP>3	GOS DP=2	Lac	Glc	Gal
% за масою	Концентрація (% від загальних цукрів)				
40	20,45	27,64	12,73	25,90	13,28

Позначення: Lac - лактоза, Glc - глюкоза, Gal - галактоза, DP - ступінь полімеризації (degree of polymerisation).

1 ggatccgggtg aacgcgccga gcgcgggtgta cgtgctgcgc tctgtcgcagt cggaggagat
61 cgcggggatc atgccccagt aggagatgtc gcgcagcagc tagatcacgt cgagcaggat
121 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccgggtgtc acatccacga gcccgaaacg
181 gccgggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg
241 gcggaaaccgg cccacagcggg tgttctgtgt gtccacaggg ttgccagca gcgggtcgag
301 aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gattccgggt atcaccgga tgaggcgtt
361 ggcaagcgtc ttgtccacgt ccatgaacac gcgcgggtgt acgaacgtga tgaagaacgt
421 gctcatgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg ccatctctg
481 acccgtgtc cgcgtgggtc gcggccttc ggtcgttcc gtgtgttctg ttgtggatcc
541 gctcatgtg ttgtggcctc ctgacgacct gtaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg
601 atcccgaac gcgtgagat agaacttct tgaanaagla gaaactata ccgctgtctg
661 caaatcatg caacgttctg caaccgcac tccgtgtgga tgagtaaggt tgaagcctg
721 ctgtatgtc tgaatctta agaatccac gtattctga ttttcagggc ctgtgcgc
781 gaaatcgtg aaagaattg cgaatcaag taacatatt tatcttgt gtacaaggaa
841 cccgattcaa cgaggitccc tcatgcgcgc gccaacgacg cgacgcaatc ccatgcgaaa
901 gcgaggacat catgaacaca accgacgac agcggaagaa ccgcatccg atcgtctcc
961 cgtccatacc gacgacggca tggctcgcgc acccgcgcgt gtacgcgggt caccgctcg
1021 accgccatc ccatcatggt tctgtgtctc gctcccatg cgacggcgag agcagcaatc
1081 tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tcccggtcga gacggcgccg accggccgtt
1141 tccccgatg gacgagcgac ggccgggact ggaacagca cgtgtcgcct ctgttcgcc
1201 cggccggatt cgacgattc tctgtctac gcgtgcaggt gccctccat ctggagactg
1261 cgggctgtct tccccgcag tacgtgaac tgcagtacc atgggacgga catgaggacc
1321 cgaaggcccc ggccatccc gacatggcc atgtggcgtt ctaccggcg gagtgcgacg
1381 cggatggcga agtcgcccag gccgtgcgc aaggcgccc ggtgacgctt acctccagg
1441 gcgcggccac agccaictac gtgtggtcga accgctcgt cgttggctac gccaggact
1501 ccttcagcc cagcgagttc gacgtgaagg accgaccaa ggtggacggc aacgtgctg
1561 cgtgtgtctg ctacgagtat tgcagcgca gctgtgtgga ggaacggac ttctggcgtc
1621 tgcacggcct gtccgctcc gtgaactca accgagggcc cggcgccac atcgccgacc
1681 tccatgccga cggcgactgg gatctcgca catcaagggg ttgctctcg ctggatgtc
1741 tgatcgacgg tgcgcgaac gccgcgacgg tgcacttgc actgtgggac aagaacggca
1801 ccacgtctg gcacaccgc acgaagcgg accgaacgt gcacgcgag gccgagatc
1861 atgacgggc gccatggag gccgaacgcc ccgacctgta cagctatcc gtcacctgc
1921 tgcagcgga cggcaaggc ctggagaccg ctgcactcg catcggttc cggcatgtg
1981 ccatcgagga cggcatcctc aagctcaac gcaagcgcct cgtgttcgt ggctcaacc
2041 gccagagt cactgcggc cggcgccggg ccatcaccga agaggacatg ctgtggaca
2101 tccgcttcat gaagcgccac aacatcaac cgggtgcgac ctgcactat ccgaaccagt
2161 cgcgtgtgta cagctgtgtc gacgaatag ccatctact gatcgacgag accatctg
2221 agaccatgg cagctggaac agcccgggg acatcccgt gggaacctc gtccccgtg
2281 acgacgagc ctggtgggc gcgtgcacg accggtgga cagcatgac ctgcgcgacc
2341 gcaacatcc cagctgtctc gtctggctgc tgggcaacga atctacgag gccgaagtc
2401 tcaaggccat gagcgcgac gcgcaccggc tgcacggg tctgtccgtc cactacgaag
2461 gtgtcaactg gaacctgac tgcagggga tgcagactt cgaagccgt atgtacgca
2521 agcggcga gatccaagac tggctgaac accgagcga accggcgag gcgagcaag
2581 cgtgtctgac ctgtgagtag atgcatgca tgggcaactc gtgcggcggc ctgagcgagt

Фіг. 1

2641 tcacgacact cgaacggtag gagcgctact ccggcgggtt catctgggat tacatcgacc
 2701 aggggctcgt ccagcgtctg ccgacggga gcaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg
 2761 gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc
 2821 ccagcccaa ggcgcaggag gtcaagcagc tgtattgcc ggtcaagctc gccccgacg
 2881 ggacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccgg caccgacggc tacgtgttcg
 2941 ccgcacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgaactaccgt ttcgacgtgg
 3001 ccgcaggaga tacccaacac catgacatcg ccttcgccga catcgacggc gacggggata
 3061 cgcgcgaagt cacctacgag gtcatctcc tgcctgccga agccaccgca tggcgccgg
 3121 ccggctacga gctcgcgttc ggccaactca ccggcagct caaccggaa caggacatca
 3181 ccgagaccag ccatgacgac gacggcggc caactcgac gctcagccga tggaaacggc
 3241 gcatccggcg cgacgggaa atggtcatcc tgcacgcac tcaggaggcg atcgtctcc
 3301 ggaagtcgca cgaccgggaa atggtcatcc tgcacgcac acctcgcac ttcggccat
 3361 tgaccgaca cgtcgcgggt aaccattccg gttcgaccg tgcgcacatg ttcggcgcg
 3421 gccgatacgc catcgtaac gaaacgaaa tccatgaag cgtgacgggt ctctagcgg
 3481 aataccagta cgaacttgc gatccgaacc acacggcgt gtcctgacac tacatgtca
 3541 actccgatat cgtatgcaa ctgaccgtc aataccggg gaacggcact gacatggca
 3601 gtctgccgc gttcggtagt gaattggagc tgcggcgga atacgacgt ctgcctact
 3661 acggccccg ccccgaggag acctaccgc accgtaagca gggcggcaag ctgggcatc
 3721 gggacggcac cgcgaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc
 3781 acgaggacgt ccgtcggcgc gaagccacc acatcaagg ccacggattg cgcgtaccc
 3841 aacggcgga cgtcacttc accggcagcc tgcctcccg gaacacacac agcatcgagg
 3901 ccgcgcggcg ccacgaggac ctgcccaac cgcgcacaa ctactgcgc ctgctcggg
 3961 ccagatggg cgtcggtagt gacgactct ggggagccc cgtccacac gctaccagc
 4021 tgcggcgcg caggcgcgc acctcgcac tgaacctga acicatctga ccggcaacgg
 4081 cggcgggcat gcaaccaat gccgcggcg gcccgccta cgcgcggcg atcgaggca
 4141 cggcgctgc gggcgggac ggcacggcg agggagggt cgaagcgcg gccacggcg
 4201 tccacggac caccggcag gtcctcgc tcacaccaa cccgatggac gtgatctgc
 4261 gcaacatcg caccgtgcgc gagaagatg caaccggcc cgaatctc gctgcacc
 4321 tcgaaggccc gttctcgc ctcaagtga agggcgcgca cgaatcgaac tgcctcaag
 4381 acccgatgc cgaactcatg gaccgatgc tcgacgcctc gggcgccgac ctgcggcg
 4441 gcaagctcgg gtgcacgc cagatcaca tctgacccc accgactgga ccggccaaca
 4501 cgtctggtgc gccggcgcc aggtggagta aactcttc agcaaatc acggcggtc
 4561 cgcgcgtc gaagcagct ctacgcctg aggaacgaag ctgcgcgc gcaccagtc
 4621 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccg ccgctcatg ttaacccat cgtacagggt
 4681 ggagaacgc atgcgggcca actcctttg atcgatgca tacgaactca cggcgggcg
 4741 cgtgtaccgg gcgatcgact ggtgttcac actcaccag gccaactct cgggaacct
 4801 cagcgcaggt cgttcaacg cctgcaacg cccacggca agcacgtcg cggccacgt
 4861 caaacatcg ggcgtgctc cggcctcag atggtcagc accaactgt ccgcgagac
 4921 atagccgttc tccaggtga acgtgcgga cgaatacacc aatcgtccg ttccaatcc
 4981 cagatgcgc gccactgac ggaacgacag ctgcgaatg tctcgggat agtcatcat
 5041 gccatgatg ctgccacgc cgcgagaaa cgcgatatga ctgcggccc cgcgatcat
 5101 cgcgtccaag gctccagca tctctcga cagatggga cacacggagt cgaacaggc
 5161 cggcgccgga ttcgtctga tgcacagcc atgcgggagc accatagca gggtcgcag
 5221 gtcgcttcg ggaacaccg tggctcccac ggtgatgaac ccatcaact ccgttcgcg
 5281 ttccgtcaac tctgtatg acaacgtgag ctggtccat tcaacgact ccgacgctc
 5341 cgaagaacc ttccgagat cggcgagta cgcgtcctg aattctccc cggcggagg
 5401 cgcacccaac acccgcatg cgggacggaa caggttgcga taccatctt cctgcacac

Фіг. 1 (продовження)

5461 ggcgaacaca cgcgcagcgc tctctctctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg
 5521 tgacaccgtg ctctgcgaca ccccgcccg tcccgcgact tcttgagcg tggccatgac
 5581 atcctccccg caaaccttag taaaggggtt tactacagca taaccggga agggggggtt
 5641 agcggcattg gcggcggtga agttaccga tgactgtag actgcacatg tccgggcaat
 5701 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtcagcaac attcccgta ccttacgatt
 5761 cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttctaatcc acctccggc cgcgcctgca
 5821 gactcaaatg gccatgatgc atagcgacaa tctctgcac tatggataaa cccaatccgt
 5881 gatgagggtga tgcagatccc acatgcgtat ttatctatt atcctcccc ctgttaaaag
 5941 gtgacaggaa atcatctatc ctctatcgg aaagatccat gccgggtattg gatatgtcta
 6001 tcgcaatgca ggactcgctt tctattgcc tgcgttggc taagttatc catacatgtg
 6061 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcttaataag gtttgaatc atctgtctaa
 6121 ttacagagcc atcggttagg atatatgat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat
 6181 ctccgataag ttccatattt tctgaagaa cattcgcaat gatctcagct acattaacct
 6241 ggctaagatc agctcggtt aattgtgaa ctctgacaa ttcgagcaga tgattgacga
 6301 tttaacccc agcatgattt gaagccaaag cctttcgac gaaaggctc caacgtcat
 6361 cgaagagctg gttgtgcagc ggaatctcca atcgggcca agtggccgca agtggatttt
 6421 ttaactcatg tgacgcacgc gcgataaatt cctttcccg actgattgcg ctgttgagat
 6481 cctttaacat gaggttgtat gcggatgcaa tagtgtacgc ctctctgtt tcatatggaa
 6541 taacgatagg ttgccttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat
 6601 tgattcttcg ttgtgtctta gtggcgataa tccaagtat tctccagat aatatgccga
 6661 aaacaatgat gggggctatg ctaccgcca ataccagatc ccgggatttt atgtctctt
 6721 gtccatagt tagcgttaaa gcatacttac cggagtcata cccggcagaa acgtaactct
 6781 taccggagtc aggaggaatg gcttgcgaat tcaaatatg ttgtcatcg gcactcttg
 6841 cctgagtaaa agatttattt acggtcactg ttccagttg ccggttcacg acataaatg
 6901 tcatggcggt caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc
 6961 ttcttctgt agaccactga aacggtaaac gcagtttcgg atggctggaa tggctcccat
 7021 tcgacgaagg atattcagc ttttcatga tatgcgat cctgtccgg gaacggttc
 7081 aatgaaatca gtgattccga ttctgtgcg aatcgcatag attgtgtct tgacgatcc
 7141 tctcgtatga gcgtgatcat cctgccaat ctacgatag agacattccg cactaatcac
 7201 cgcacotgc gccatcatca gcgtctcaa tacggcaagt tctcgttcc caaaccttag
 7261 ttctgcaccg cgaaccgtga t

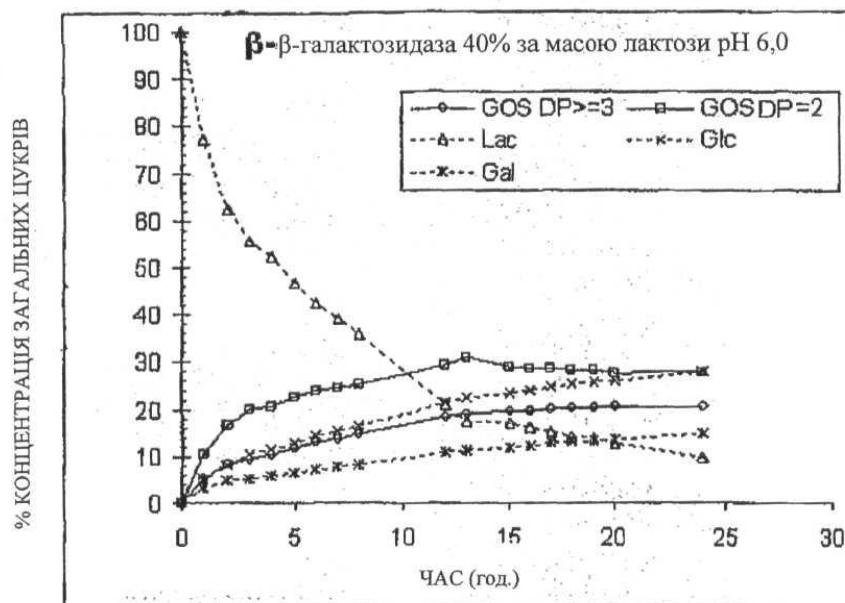
Фіг. 1 (продовження)

```

1  NHTTDDQSKNGDPIVSPSIPPTAWLADPRVYAVNRKLDHSDHACSRSPVDGSESTNLQSLDGEHVRVRETAPTGRFPDGTSDGPDWISDV3PLFAAFGP
101 DDSSFSRVQVPFSLHETAGLLAQYVNVQYPWDGSHEDPKAPAIPEHGHVAVYRREFDADGEVAQAVREGAPVTLTFQGAATAIYVNLNGSFVGYAEDSFTF
201 SETDVTDAIKVDGNVLAVVCYESSASNLDDQDFWRLHGLFRSEVELNARPAHIAOLKADADMDLATSRGSLSDVLI DGAANAATVDFALNDKNGTIVH
301 HTATKADGTLHAAEIKDDAAPNSAERPDLVELSVTLDAOGKVLGTARTRIGFRHVAIEDGILKLNKRLVFRGVNRHEFOCRGRAITEENLWDIRTH
401 KRNINAVRTSHYPNQSRYELCDEYGIYLI DETNLETHGSWNSPGDIPVGTSEVPDDEAMLGACIDALDSEMLDRNHPSEVLVWSLGNESYAGEVLKAM
501 SAHAHRLDPGRPVHYEGVHNWKAYDGISOFESRMYAKPAEQDWLENGDERGEASKPFVSCEYWHAMGNSCGGLSEFIDLERYEYSGGFWDYIQQGLV
601 QRLPDGSERLSVGGENDRPTDYEYFVNGNIVFADRTSPSKAQEVKQLYSPVKLAPDGHGVTIENRNLFACTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGD
701 TQHHDIAPFDIDAGDGTREYTYEVDLLAEATAWAPAGYELAFGLTGLNPEQDITETSHODDGRATRTLSRWNAIRADDEEILLSTQGGIVSWKRD
801 DREHVIKRPFLVTFRPLTDMORGWHSGFORAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPHHTPVSVTYHVNSDMRMQLTVEYFGMATOMASLPA
901 FCIENELPGEYDRLYYGGPGPEETYRDRKQGGKLGINDATAKSMAPYLMVQETGSHEDVSNLEATDIQSGKLRVTQGRDHTFTASLLPWNTYIEAARR
1001 HEDLPKPRHNYLALLAAQMGVGGDDSWGAPVHTAYQLFAGRPFLTLDVNLELI

```

Фіг. 2



Фіг. 3

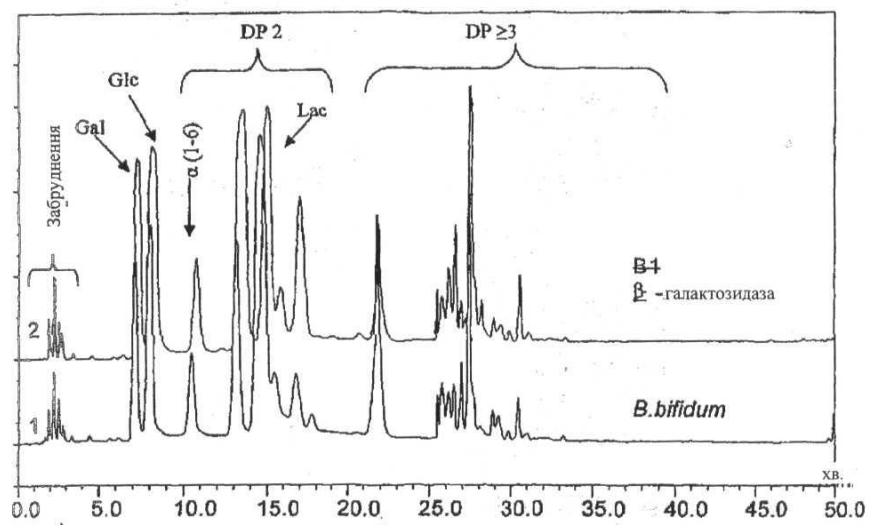


Fig. 4

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> LINDSAY, Clare L
 <120> Продукт і спосіб
 <130> 13906WO:GH
 <150> GB 0601901.2
 <151> 2006-01-31
 <160> 2
 <170> Патент в версії 3.4
 <210> 1
 <211> 7281
 <212> ДНК
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> ГЕХ
 <222> (1)..(7281)

<400> 1
 ggatccggtg aacgcgccga gcgcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat 60
 cgcggggata atgccccagt aggagatgtc gcgcagcgag tagatcacgt cgagcaggat 120
 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag 180
 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg 240
 gcggaaccgg cccacgcggg tggttcgtgt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag 300
 aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gattccggtg atcaccgcga tgaggcgttt 360
 ggcaagcgtc ttgtccacgt cgtgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt 420
 gtcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg cgatcttctg 480
 acccgtgttc cgcgtgggct gcggccttcc ggtcgtttcc gtgtgttgtg tggaggatcc 540
 gtcattggtg tgggtggcctc cttgcgacct gtaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg 600
 atcccgaata gcgtgagtat agaactttct tgaataagta gaaaactata ccgcgtgtcg 660
 caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg 720
 cttgatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttgacaggc cttgtgccgc 780
 gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt tatccttggt gtacaaggaa 840
 cccgattcaa cgagggtccc tctactgcggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgcgaaa 900
 gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcgggaaga cggcgatccg atcgtctccc 960
 cgtccatacc gacgacggca tggctcggcg acccgcgctg gtacgagggt caccggctcg 1020
 acgccccattc cgatcatgcg tgctgggtctc gctccccagt cgacggcgag agcacgaatc 1080
 tcaggcagag cttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgtt 1140
 tccccgatgg gacgagcgac gggccggact ggatcagcga cgtgtcgctt ctgttcgccg 1200
 cgcccggtt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcaggt gccctcgcat ctggagactg 1260

cggggctgct tgccccgcag tacgtgaacg tgcagtaccc atgggacgga catgaggacc 1320
 cgaaggcccc ggccatcccc gagcatggcc atgtggcggc ctaccggcgc gagttcgacg 1380
 cggatggcga agtcgcccag gccgtgcgcg aagggcgccc ggtgacgctt accttcagg 1440
 gcgcggccac agccatctac gtgtggctca acggctcgtt cgttggctac gccgaggact 1500
 ctttcacgcc cagcgagttc gacgtgacgg acgcgatcaa ggtggacggc aacgtgctgg 1560
 cggtcgtctg ctacgagtat tcgagcgca gctggttgga ggatcaggac ttctggcgtc 1620
 tgcacggcct gttccgctcc gtcgaactca acgcgagggc cgccgcccac atcgccgacc 1680
 tccatgccga cgccgactgg gatctcgcca catcaagggg ttctctctcg ctggatgtgc 1740
 tgatcgacgg tgccgcgaac gccgcgacgg tcgacttcgc actgtgggac aagaacggca 1800
 ccatcgctcg gcacaccgcc acgaaagcgg acggaacgct gcacgccgag gccgagatcg 1860
 atgacgcggc gccatggagc gccgaacgcc ccgacctgta cgagctatcc gtcacctgc 1920
 tcgacgcgga cggcaaggtc ctggagaccg ctgcactcg catcggttc cggcatgtgg 1980
 ccatcgagga cggcatctc aagctcaacg gcaagcgct cgtgttccgt ggcgtcaacc 2040
 gccacgagtt cgactgccgg cgcgccggg ccatcaccga agaggacatg ctgtgggaca 2100
 tccgcttcat gaagcgccac aacatcaacg cgggtgcgcac ctgcactat ccgaaccagt 2160
 cgcgctggta cgagctgtgc gacgaatacg gcatctacct gatcgacgag accaatctgg 2220
 agacctatgg cagctggaac agccccggcg acatccccgt gggaacctcc gtccccggtg 2280
 acgacgaggg ctggctgggc gctgcatcg accggctgga cagcatgac ctgcgcgacc 2340
 gaaccatcc cagcgtgctc gtctggctgc tgggcaacga atctacgcg ggcgaagtcc 2400
 tcaaggccat gagcgcgcac gcgcaccggc ttgatccggg tcgtcccgtc cactacgaag 2460
 gtgtcaactg gaaccatgcc tacgacggga tcagcgactt cgaagccgt atgtaccca 2520
 agccggccga gatccaagac tggctcgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaagc 2580
 cgttcgtcag ctgtgagtac atgcatgcc tgggcaactc gtgcggcggc ctgagcgagt 2640
 tcatcgacct cgaacggtag gagcgctact ccggcgggtt catctgggat tacatcgacc 2700
 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg 2760
 gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcagc 2820
 ccagcccaa ggcgcaggag gtcaagcagc tgtattcgcc ggtcaagctc gccccgacg 2880
 ggcacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccg caccgacggc tacgtgttcg 2940
 ccgcacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgactaccgt ttcgacgtgg 3000
 ccgcaggaga tacccaacac catgacatcg ctttccgga catcgacgcg gacggggata 3060
 cgcgcaagt cacctacgag gtcgatctcc tgctcgccga agccaccgca tgggcggcg 3120
 ccggctacga gtcgcgttc ggccaactca ccggcacgct caacccgaa caggacatca 3180
 ccgagaccag ccatgacgac gacggccgc caactcgac gctcagccga tggaaacgg 3240
 gcatccggc cgacgacgag gaaattctcc tgtacgcac tcaggaggc atcgtctcct 3300

ggaagcgcgga cgaccgggaa atggtcatcc gtcgccccga actcgtcacg ttccgcccatt 3360
 tgaccgacaa cgatcgcggt aaccattccg gtttcgaccg tgccgcatgg ttcgcgcccg 3420
 gccgatacgc catcgtaacc gaaacgaaaa tccatgaaag cgatgacggg ctcgtagcgg 3480
 aataccagta cgaacttgcc gatccgaacc acacgcccgt gtccgtcact taccatgtca 3540
 actccgatat gcgtatgcaa ctgaccgtcg aataccccgg gaacgccact gacatggcca 3600
 gtctgccccg gttcgggtatc gaatgggagc tgccccggga atacgatcgt ctgcgctact 3660
 acggcccccg ccccaggag acctaccgag accgtaagca gggcggaag ctcggcatct 3720
 gggacgccac cggaaggcg agcatggcg cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc 3780
 acgaggacgt ccgctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtaacc 3840
 aacggcgga cgcctacttc acggccagcc tgctgcccgt gaacacctac acgatcgagg 3900
 ccgcgcccg ccacgaggac ctgcccgaac cgcgcccaa ctacctgctc ctgctcgcg 3960
 cccagatggg cgtcgggtga gacgactcct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc 4020
 tgcccccgcg caggccgctc accctcgacg tgaacctga actcatctga ccggcaacgg 4080
 gcggcgccat gcaccaccat gccgcccgg gccccgccta cgacgcggcg atcgaggcca 4140
 cggcgcgctg gggcgcgga ggacccggcg agggggcgtt cgagcgcgcc ggccacgcgg 4200
 tccacggcac caccgcccag gtcctctcgc tcatcaccia cccgatggac gtgatctgcc 4260
 gcaacatccg caccgtgctc gagaagatgg caaccgccc cgacatcctc ggctgccacc 4320
 tcgaaggccc gttcctcgcc ctcaagtga agggcgcgca cgattcgaac tgcctcaaag 4380
 acccgatgcc cgaactcatg gaccgcatgc tcgacgcctc gggcgccgac ctcgccgccg 4440
 gcaagctcgg gtgcatccgc cagatcacca tctcgacccc accgactgga ccgccaaca 4500
 cgtctggtgc gccggccgcc aggtggagta aactccttc agcaaaatcg acgcccgtgc 4560
 cggcgtctc gagacgacgt cttacgcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc 4620
 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccg ccgctcatgc ttcaacccat cgatcagggt 4680
 ggagaacgcc atgcccggca actcccttg atcgatcga tacgaactca gcggcgcgga 4740
 cgtgtaccgg gcgatcgact ggttggtcac actcaccag gccaaactcgt cgggaacctc 4800
 cacgcgcagt gcgttcaacg cctgcaacgc cccaccgca agcacgtcgg cggccacgat 4860
 caaaccatcg ggcgtgctc cggcctcacg atggtcagcc accaactgct ccgcgagacg 4920
 atagccgttc tccacgggtga acgtgccgga cgaatacacc aatccgtccg ttccaatcc 4980
 cagatgcgcg gccactgac ggaacgacg ctgcggaatg tcctcgggat agtcatgcat 5040
 gcccatgatg ctgcccacgc cgccgagaaa cgcatatga ctgcccgcg ccgcgatcat 5100
 cgcgccaag gcgtccagca tcgtctcgga cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg 5160
 cggcgccgga ttcgtgtcga tgcacacgc atgcccggag accatatgca gggctcgag 5220
 gtccgcttcg ggaaacaccg tggctccac ggtgatgaac ccatcaaaact ccgttgcgcg 5280
 ttccgtcaac tcgtgtatgg acaacgtgag ctggtccaat tccaacgact ccgcacgctc 5340

cgcaagaacc ttccgcagat cggcgaagta cgcgtcctgc aattcctccc cggacggagg 5400
 cgcaccaac accgcgatcg cgggacggaa cacgttcga taccatct cctcgacac 5460
 gcgcaacaca cgccgacgcy tctctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg 5520
 tgacaccgtg ctctgcgaca ccccgccccg tcccgcgact tcttgagcg tggccatgac 5580
 atcctccccg caaactttag taaaggggtt tactacagca taaccggga aggggggtt 5640
 aggggcattg gggcggtgga agtttaccga tgactggtag actgcacatg tccggcaat 5700
 aggggcaatg catagggggg tggcgggcat gtgcagcaac attccgta ccttacgatt 5760
 cttatagcgt gtcaggtaaa agaattatga ttctcaatcc accttccggc cgcgcctgca 5820
 gactcaaatg gccatgatgc atagcgacaa tctctcgac tatggataaa cccaatccgt 5880
 gatgaggtga tgcagatccc acatgcgtat ttatcctatt atcctccct ctgttaaaag 5940
 gtgacaggaa atcatctatc ctgcatcgg aaagatccat gccggtattg gatattgcta 6000
 tcgcaatgca ggactcgctt tcgtattgcc tgcgttggc taagtattat catacatgtg 6060
 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tcgtaataag gtttgcaatc atctgtctaa 6120
 ttagcagacc atcggtagg atatatgcat tctccagatt ggtatgtact tgaactctat 6180
 ctccgataag ttccatattt tctgaagaa cattgcgaat gatctcagct acattaactc 6240
 ggctaagatc agctcggtt aattgctgaa ctttcgacaa ttcgagcaga tgattgacga 6300
 ttcaacccc agcatgattt gaagccaaag cttttcgac gaaaggtctg caacgctcat 6360
 cgaaaagctg gttgtgcagc ggaatctcca atgcggccga agtgggcgca agtggtttt 6420
 ttaactcatg tgacgcacg gcgataaatt cttttcccg actgattgcy ctgttgagat 6480
 ctttaacat gaggttgat gcggatgcaa tagtgtacgc ctgctggtt tcatatggaa 6540
 taacgatagg ttgcctttcc aatccagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat 6600
 tgattcttcg ttgtgtccta gtggcgataa tccaagtat tctccagat aatatgccga 6660
 aaacaatgat gggggctatg cttaccgcca atatcagatc ccgggatttt atgtctcctt 6720
 gttccatagt tagcgttaaa gcatccttac cggagtcata cccggcagaa acgtaatcct 6780
 taccggagtc aggaggaatg gcttgcaat tcaactatg ttgttcacg gcatcttctg 6840
 cctgagtaaa agattttatt acgggtcactg tttccagttg ccggttcacg acataatatg 6900
 tcatggcggc caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc 6960
 ttcttcttgt agaccactga aacggtaaac gcagtttcgg atggctggaa tggctcccat 7020
 tcgacgaagg atattcaggc tttttcatga tatgcgatat cttgtccgg gaacggtttc 7080
 aatgaaatca gtgattccga ttttcgtgcy aatcgcatag attgtggtct tgacgattcc 7140
 tctcgatga gcgtgatcat cctgccaat ctcacgatag agacattccg cactaatcac 7200
 cgcacctgc gcctcaatca gcgtctcaa tacggcaagt tctcgtttcc caaactttag 7260
 ttctgcaccg cgaaccgtga t 7281

<211> 1052
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium bifidum

<220>
 <221> ПЕПТИД
 <222> (1)..(1052)

<400> 2

Met Asn Thr Thr Asp Asp Gln Arg Lys Asn Gly Asp Pro Ile Val Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Pro Thr Thr Ala Trp Leu Ala Asp Pro Arg Val Tyr Ala
 20 25 30
 Val His Arg Leu Asp Ala His Ser Asp His Ala Cys Trp Ser Arg Ser
 35 40 45
 Pro Val Asp Gly Glu Ser Thr Asn Leu Arg Gln Ser Leu Asp Gly Glu
 50 55 60
 Trp Arg Val Arg Val Glu Thr Ala Pro Thr Gly Arg Phe Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Asp Gly Pro Asp Trp Ile Ser Asp Val Ser Pro Leu Phe Ala
 85 90 95
 Ala Pro Gly Phe Asp Asp Ser Ser Phe Ser Arg Val Gln Val Pro Ser
 100 105 110
 His Leu Glu Thr Ala Gly Leu Leu Ala Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln
 115 120 125
 Tyr Pro Trp Asp Gly His Glu Asp Pro Lys Ala Pro Ala Ile Pro Glu
 130 135 140
 His Gly His Val Ala Val Tyr Arg Arg Glu Phe Asp Ala Asp Gly Glu
 145 150 155 160
 Val Ala Gln Ala Val Arg Glu Gly Arg Pro Val Thr Leu Thr Phe Gln
 165 170 175
 Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly Ser Phe Val Gly
 180 185 190
 Tyr Ala Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Asp Val Thr Asp Ala
 195 200 205
 Ile Lys Val Asp Gly Asn Val Leu Ala Val Val Cys Tyr Glu Tyr Ser
 210 215 220
 Ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Leu His Gly Leu

225 230 235 240
 Phe Arg Ser Val Glu Leu Asn Ala Arg Pro Ala Ala His Ile Ala Asp
 245 250 255
 Leu His Ala Asp Ala Asp Trp Asp Leu Ala Thr Ser Arg Gly Ser Leu
 260 265 270
 Ser Leu Asp Val Leu Ile Asp Gly Ala Ala Asn Ala Ala Thr Val Asp
 275 280 285
 Phe Ala Leu Trp Asp Lys Asn Gly Thr Ile Val Trp His Thr Ala Thr
 290 295 300
 Lys Ala Asp Gly Thr Leu His Ala Glu Ala Glu Ile Asp Asp Ala Ala
 305 310 315 320
 Pro Trp Ser Ala Glu Arg Pro Asp Leu Tyr Glu Leu Ser Val Thr Leu
 325 330 335
 Leu Asp Ala Asp Gly Lys Val Leu Glu Thr Ala Arg Thr Arg Ile Gly
 340 345 350
 Phe Arg His Val Ala Ile Glu Asp Gly Ile Leu Lys Leu Asn Gly Lys
 355 360 365
 Arg Leu Val Phe Arg Gly Val Asn Arg His Glu Phe Asp Cys Arg Arg
 370 375 380
 Gly Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Leu Trp Asp Ile Arg Phe Met
 385 390 395 400
 Lys Arg His Asn Ile Asn Ala Val Arg Thr Ser His Tyr Pro Asn Gln
 405 410 415
 Ser Arg Trp Tyr Glu Leu Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Tyr Leu Ile Asp
 420 425 430
 Glu Thr Asn Leu Glu Thr His Gly Ser Trp Asn Ser Pro Gly Asp Ile
 435 440 445
 Pro Val Gly Thr Ser Val Pro Gly Asp Asp Glu Ala Trp Leu Gly Ala
 450 455 460
 Cys Ile Asp Arg Leu Asp Ser Met Ile Leu Arg Asp Arg Asn His Pro
 465 470 475 480
 Ser Val Leu Val Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Glu Val
 485 490 495
 Leu Lys Ala Met Ser Ala His Ala His Arg Leu Asp Pro Gly Arg Pro

500 505 510
 Val His Tyr Glu Gly Val Asn Trp Asn His Ala Tyr Asp Gly Ile Ser
 515 520 525
 Asp Phe Glu Ser Arg Met Tyr Ala Lys Pro Ala Glu Ile Gln Asp Trp
 530 535 540
 Leu Glu His Gly Asp Glu Arg Gly Glu Ala Ser Lys Pro Phe Val Ser
 545 550 555 560
 Cys Glu Tyr Met His Ala Met Gly Asn Ser Cys Gly Gly Leu Ser Glu
 565 570 575
 Phe Ile Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Gly Gly Phe Phe Trp
 580 585 590
 Asp Tyr Ile Gly Gln Gly Leu Val Gln Arg Leu Pro Asp Gly Ser Glu
 595 600 605
 Arg Leu Ser Val Gly Gly Glu Trp Gly Asp Arg Pro Thr Asp Tyr Glu
 610 615 620
 Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val Phe Ala Asp Arg Thr Pro Ser Pro Lys
 625 630 635 640
 Ala Gln Glu Val Lys Gln Leu Tyr Ser Pro Val Lys Leu Ala Pro Asp
 645 650 655
 Gly His Gly Val Thr Ile Glu Asn Arg Asn Leu Phe Ala Gly Thr Asp
 660 665 670
 Gly Tyr Val Phe Ala Ala Arg Leu Leu Glu Asp Gly His Glu Ile Trp
 675 680 685
 His Ala Asp Tyr Arg Phe Asp Val Ala Ala Gly Asp Thr Gln His His
 690 695 700
 Asp Ile Ala Phe Pro Asp Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Arg Glu Val
 705 710 715 720
 Thr Tyr Glu Val Asp Leu Leu Leu Ala Glu Ala Thr Ala Trp Ala Pro
 725 730 735
 Ala Gly Tyr Glu Leu Ala Phe Gly Gln Leu Thr Gly Thr Leu Asn Pro
 740 745 750
 Glu Gln Asp Ile Thr Glu Thr Ser His Asp Asp Asp Gly Arg Ala Thr
 755 760 765
 Arg Thr Leu Ser Arg Trp Asn Ala Gly Ile Arg Arg Asp Asp Glu Glu

770 775 780
 Ile Leu Leu Ser Arg Thr Gln Gly Gly Ile Val Ser Trp Lys Arg Asp
 785 790 795 800
 Asp Arg Glu Met Val Ile Arg Arg Pro Glu Leu Val Thr Phe Arg Pro
 805 810 815
 Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Asn His Ser Gly Phe Asp Arg Ala Ala
 820 825 830
 Trp Phe Ala Ala Gly Arg Tyr Ala Ile Val Thr Glu Thr Lys Ile His
 835 840 845
 Glu Ser Asp Asp Gly Leu Val Ala Glu Tyr Gln Tyr Glu Leu Ala Asp
 850 855 860
 Pro Asn His Thr Pro Val Ser Val Thr Tyr His Val Asn Ser Asp Met
 865 870 875 880
 Arg Met Gln Leu Thr Val Glu Tyr Pro Gly Asn Ala Thr Asp Met Ala
 885 890 895
 Ser Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu Trp Glu Leu Pro Gly Glu Tyr Asp
 900 905 910
 Arg Leu Arg Tyr Tyr Gly Pro Gly Pro Glu Glu Thr Tyr Arg Asp Arg
 915 920 925
 Lys Gln Gly Gly Lys Leu Gly Ile Trp Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser
 930 935 940
 Met Ala Pro Tyr Leu Met Val Gln Glu Thr Gly Ser His Asx Asp Val
 945 950 955 960
 Arg Trp Leu Glu Ala Thr Asp Ile Gln Gly His Gly Leu Arg Val Thr
 965 970 975
 Gln Arg Gly Asp Arg His Phe Thr Ala Ser Leu Leu Pro Trp Asn Thr
 980 985 990
 Tyr Thr Ile Glu Ala Ala Arg Arg His Glu Asp Leu Pro Lys Pro Arg
 995 1000 1005
 His Asn Tyr Leu Arg Leu Leu Ala Ala Gln Met Gly Val Gly Gly
 1010 1015 1020
 Asp Asp Ser Trp Gly Ala Pro Val His Thr Ala Tyr Gln Leu Pro
 1025 1030 1035
 Ala Gly Arg Pro Leu Thr Leu Asp Val Asn Leu Glu Leu Ile

1040

1045

1050