

(19)



(10) **LT 3957 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3957**

(51) Int. Cl.⁵: **C12N 15/55**

(21) Paraiškos numeris: **IP1527**

C12N 9/16

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 12 06**

A23K 1/165

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 06 26**

C12N 1/21

(45) Patento paskelbimo data: **1996 05 27**

C12N 1/15

(60) SU duomenys: **SU 4895487, 1991 05 24**

C12N 1/19

(31, 32, 33) Prioritetas: **89202436, 1989 09 27, NL**
90202231, 1990 08 17, NL

(72) Išradėjas:

Robert Franciscus Maria van Gorcom, NL
Willem van Hartingsveldt, NL
Petrus Andreas van Paridon, NL
Annemarie Eveline Veenstra, NL
Rudolf Gijsbertus Marie Luiten, NL
Gerardus Cornelis Maria Selten, NL

(73) Patento savininkas:

GIST-BROCADES N. V., Wateringseweg 1, P. O. Box 1, 2600 MA Delft, NL

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

CBS 155.89, NL

(54) Pavadinimas:

Bakterinės fitazės klonavimas ir ekspresija

(57) Referatas:

Išradimas susijęs su fitazės gamyba mikrobiologiniu būdu, konkrečiai DNR, koduojančios fitazę, išskyrimu ir išgryninimu. Šios DNR sekos išskyrimas ir klonavimas atliekamas specifinių nukleotidinių zonų, sukonstruotų specialiai šiam išradimui, pagalba. Šis išradimas taip pat apima ekspresijos vektoriaus, kuriame yra bent dalis DNR, koduojančios fitazę, sukonstravimą. Aprašytas ląstelės, pageidautina bakterijų, transformuotos šiuo vektoriumi, gavimas.

Išradimas yra skirtas fitazės mikrobiologiniam gavimui.

Fosforas yra nepakeičiamas elementas, reikalingas bet kokio organizmo augimui. Gyvulininkystėje, norint kad greitai augtų gyvūnai su paprastu skrandžiu (pavyzdžiui, kiaulės, žuvis, naminiai paukščiai), pašaras yra praturtinamas neorganiniu fosforu.

Atvirkščiai, į atrajojančių gyvūnų pašarus fosforas nėra dedamas, nes didžiajame skrandyje esantys mikroorganizmai produkuoja fermentus, kurie katalizuoja fitato (mioinozitolheksakis-fosfato) pavertimą į inozitolą ir neorganinį fosfatą.

Fitatas yra rezervinis fosforo šaltinis beveik visuose augaliniuose maisto produktuose (žiūr. apžvalgą: *Phytic acid, Chemistry and applications*, E.Graf (ed), Pilatus Press, Minneapolis, MN, USA, 1986). Fitato kiekis riešutuose, grūdinėse, ankštinėse ir aliejinėse kultūrose, sporose ir žiedadulkėse yra 1-3 %. Sudėtinės fitinės rūgšties druskos vadinamos fitiniais. Laikoma, kad fitinė rūgštis blogina virškinimą, nes ji yra chelatuojantis agentas tokiems elementams, kaip kalcis, cinkas, geležis ir magnis, ir be to, gali reaguoti su baltymais, ir tokiu būdu susilpnėja jų įsisavinimas ir sumažėja mineralinių elementų kiekis pašare.

Fitate esantis fosforas praeina per gyvūnų su vienskilčiais skrandžiais virškinimo traktą ir pasišalina su ekskrementais. Nors storojoje žarnoje vyksta dalinė fitato hidrolizė, išsilaisvinęs neorganinis fosforas neturi maistinės vertės, nes jis gali rezorbuotis tik plonajame žarnyne. Todėl tokie gyvūnai neįsisavina didelės fosforo dalies, kuris turi didelę maistinę vertę, nors ir gauna ją su maistu.

Fitate esančio fosforo išsiskyrimas su ekskrementais turi savas pasekmes. Paskutiniaisiais dešimtmečiais labai padaugėjo naminių gyvulių, kartu padaugėjo ir mėšlo kiekis, o tai sudaro grėsmę aplinkai įvairiuose rajonuose. Dalinai tai apspręsta fosforo, esančio mėšle, susikaupimu paviršiniuose vandenyse, ir taip eutrofikuojami vandens telkiniai.

Mikroorganizmų sintetinami fermentai, kurie katalizuoja fitato skilimą į inozitolą ir neorganinį fosforą, žinomi kaip fitazės. Mikroorganizmai, kurie produkuoja šiuos fermentus yra bakterijos: *Bacillus subtilis* (V.K.Paver and V.J.Jagannathan, 1982, J. Bacteriol., 151, 1102-1108) ir *Pseudomonas* (D.J.Cosgrove, 1970, Austral. J. Biol. Sci., 23, 1207-1220), melės: *Saccharomyces cerevisiae* (N.R. Nayki and P. Markakis, 1984,

Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 17, 24-26), grybai: *Aspergillus terreus* (K.Yamada, Y. Minoda and S. Yamamoto, 1986, Agric. Biol. Chem., 32, 1275-1282). Fitazę produkuoja ir kitos *Aspergillus* rūšys, tarp kurių *Aspergillus ficuum* sintetina didelio specifinio aktyvumo termostabilų fermentą, palyginus su fitazėmis iš kitų mikroorganizmų (nepublikuoti duomenys).

Idėja pridėti bakterinę fitazę į gyvūnų su paprastu skrandžiu pašarus buvo išsakyta ne kartą (žiūr., pvz., Ware I.H., Bluff L. and Shien T.R., 1967, US Patent No.3297548; Nelson T.S., Shien T.R., Wodzinski R.J. and Ware I.H., 1971, J. Nutrition, 101, 1289-1294), bet iki šiol jos praktinis pritaikymas buvo ekonomiškai netikslingas dėl didelės mikrobiologinės fermentų gamybos kainos (Y.W. Han, 1989, Animal Feed Sci.& Technol.,24, 345-350). Dėl ekonominio netikslingumo iki šiol pridedamas neorganinis fosforas į gyvūnų su paprastu skrandžiu pašarus.

Bakterinės fitazės turi kitą pritaikymą žemės ūkyje. Kaip pavyzdį galima paminėti pramoninę krakmolo gamybą iš grūdinių kultūrų, tokių kaip kukurūzai ir kviečiai. Malant produktus, gaunami gliutenai, parduodami gyvūnų pašarams. Mirkant pašarus, įdedama fitazės; technologinės sąlygos ypatingai palankios fitazėms iš grybų (temperatūra apie 50°, pH 5,5) (žiūr. paraišką Europos patentui Nr.0321004 Alno Ltd.). Svarbi aprašytojo metodo ypatybė yra ta, kad iš gamybos atliekų galima gauti gyvūnams pašarus, kuriuose yra fosfatas vietoj fitato.

Taip pat pasiūlyta panaudoti fitazę perdirbant soją (Finas TM Enzymes by Alno - informacinė brošiūra išleista kompanijos Alno Ltd., Rajamani, Suomija). Sojų pupelės turi daug fitato - faktoriaus, kuris blogina virškinimą; sojos baltymų negalima naudoti vaikų maitinimui, taip pat žuvų, veršiukų ir neatrajojančių gyvūnų pašarams. Praturtinus šį svarbų baltymų šaltinį atitinkamais fermentais, padidėja šios medžiagos komercinė ir maistinė svarba.

Buvo atlikti bandymai įvairioms fitazėms charakterizuoti, patobulinti jų gavybos būdus ir praktinį pritaikymą. Ullak pasiūlė fitazės iš laukinio kamieno *Aspergillus ficuum* valymo metodą, taip pat ištyrė galutinio valymo produkto biocheminius parametrus (Ullak A., 1988a, Preparative Biochem., 18, 443-458). Šio autoriaus gauti rezultatai pateikti 1 lentelėje.

Aminorūgščių seka iš N-galo *A. ficuum* fitazės buvo pateikta Ullak du kartus: Ullak A., 1987, Enzyme and Engineering Conference IX, October 4-8, 1987, Santa Barbara, California (poster presentation) ir Ullak A., 1988b, Prep. Biochem., 18, 459-471. Šio autoriaus nustatyta aminorūgščių liekanų seka pateikta Fig.1A (seka E).

Iš Ullak gautų duomenų seka kelios įdomios išvados. Pirmiausia, "išvalytas" preparatas, jo aprašytas 1988a ir 1988b, elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu metu duoda dvi baltymo juostas. Mes nustatėme, kad išgrynintoje iš *A. ficuum* fitazėje yra pašalinė medžiaga, kuri elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje metu duoda vieną iš dviejų juostų, kurią Ullak identifikavo kaip fitazę.

Iš Ullak publikuotos (1987, 1988a; palyginkite sekas A ir B su seka C Fig.1A) aminorūgščių sekos galima padaryti analogiškas išvadas. Mes parodėme, kad viena iš vidinio fitazės peptido aminorūgščių sekų, kuri aprašyta Ullak (žiūr. Fig.1B, seka E), iš tikrųjų yra pašalinis baltymas, kurio molekulinė masė 100kD (Fig.1C), kuris randamas preparate, gaunamame pagal Ullak metodą, ir duoda vieną iš dviejų juostų elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu metu (Ullak, 1988a, 1988b). Ullak nepripažįsta, kad yra tokia pašalinė medžiaga, o tą juostą priskiria kitai fitazės formai. Tarp kitko, šis pašalinis komponentas apsunkina atranką ir identifikavimą tos nukleotidų sekos, kuri koduoja fitazės biosintezę. Be to, jo buvimas sumažina santykinį testuojamo baltymo aktyvumą.

Tęsiant Ullak duomenų analizę, reikia pažymėti, kad buvo nustatyta, kad 12-toji aminorūgštis liekana yra glicinas. Naudojant baltymų ir DNR sekvenavimą, mes parodėme, kad šioje vietoje iš tikrųjų yra ne glicinas, o cisteinas (žiūr. Fig.6 ir 8).

Pagaliam, pagal Ullak, fitazės molekulinė masė yra 85 kD, kuri po deglikozilinimo sumažėja iki 61,7 kD (Ullak, 1988c). Ši reikšmė mažesnė, nei to paties autoriaus pateikta - 76 kD (Ullak A. and Gibson D., 1988, Prep. Biochem., 17(1), 63-91), kuri buvo nustatyta pagal santykinį polisacharidų kiekį, išsiskiriantį hidrolizuojant, ir natyvaus baltymo molekulinę masę, kuri nustatoma elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu pagalba. Mūsų tyrimuose buvo nustatyta, kad glikozilintos fitazės molekulinė masė vienareikšmiškai yra 85 kD, tuo tarpu kai neglikozilinto baltymo molekulinė masė yra nuo 48 iki 56,5 kD, priklausomai nuo deglikozilinimo laipsnio.

Mullancy et al. (Filamentous Fungi Conference, April, 1987, Pacific Grove, California, poster presentation) pranešime taip pat pateikiama fitazės iš *A. ficuum* charakteristika. Ir šiame darbe elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu metu buvo gautos dvi juostos: vienos molekulinė masė - 85 kD, kitos - 100 kD, ir abi "išvalytame" preparate. Autoriai identifikavo šias juostas kaip dvi skirtingas fitazės formas. Bet šiame darbe neaprašoma bakterijų ląstelių-recipientų transformacija. Klonavimo, DNR sekos, klonuojančios fitazę, išskyrimo metodų aprašymų taip pat nėra.

Akivaizdu, kad rentabilaus fitazės gamybos būdo sukūrimas yra labai svarbus, dalinai gaminant pramoniniu būdu pašarus gyvulininkystei. Vienas šio tikslo pasiekimo būdų yra rekombinantinė DNR technika, kurios pagalba galima sustiprinti fermento ekspresiją įvairiose mikroorganizmų rūšyse, kurie produkuoja didelio aktyvumo peptidus ir baltymus. Tačiau šiuo metu nėra sukurta išskyrimo ir klonavimo DNR sekų, koduojančių fitazę, būdų.

Šis išradimas yra DNR sekos, koduojančios fitazę, gavimo ir valymo būdas. Tokios sekos išskyrimas ir klonavimas buvo atliekamas, naudojant specifinius nukleotidinius zondus, kurie buvo specialiai susintetinti šiam tikslui. Reikalinga DNR seka, koduojanti fitazę, buvo gauta iš grybų, konkrečiai iš *Aspergillus* siūlinių grybų šeimos.

Kitas išradimo tikslas yra vektoriaus, turinčio ekspresijos faktorių, gavimo būdas; šiame vektoriuje turi būti mažiausia viena replika, mažiausiai viena (pageidautina homologinė) DNR, kuri koduoja fitazę. Tokia DNR seka funkciškai surišta su atitinkama reguliavimo sritimi, kuri užtikrina didelį peptidų arba baltymų su fitazės aktyvumu ekspresijos lygį tinkamuose šiam tikslui ląstelėse-šeimininkuose.

Ekspresijos faktorius, pagal šį išradimą, gali būti įterptas į vektorių, pageidautina į plazmidę, kuris sugebėtų transformuoti bakterinio recipiento ląsteles ir įsijungti į genomą.

Dar vienas šio išradimo tikslas - transformuotų ląstelių gavimo būdas, pageidautina bakterijų, transformuojamų vektoriais, kuris aprašytas ankstesniame paragrafe. Pagal išradimą tokiomis transformuojamomis ląstelėmis gali būti siūliniai grybai šių genčių: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* ir *Penicillium*, mielės: *Kluyveromyces* ir *Saccharomyces* arba bakterijos *Bacillus*. Geriausia naudoti recipientais siūlinius grybus *Aspergillus*.

Transformuotos ląstelės sugeba pramoniniu mastu sintetinti daug rekombinantinės fitazės su pakankamu rentabilumu.

Kiti išradimo aspektai - tai rekombinantiniai baltymai ir peptidai, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, tiek glikozilinti, tiek ir neglikozilinti; tokių neglikozilintų baltymų ir peptidų gavimo būdai; baltymai ir peptidai, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, be pašalinių priemaišų; monokloniniai antikūnai, sugebantys reaguoti su šiais rekombinantiniais arba išgrynintais baltymais.

1 lentelėje palygintos fitazės, gautos Ullak iš laukinio kamieno *A. ficcum* ir papildomai išgrynintos fitazės iš *A. ficuum* laukinio tipo, gautos pagal šį išradimą, biocheminės charakteristikos. Reikia atkreipti dėmesį į santykinį aktyvumą, kuris mūsų gauto fermento yra du kartus didesnis, nei fitazės, aprašytos Ullak.

Šis išradimas tai nukleotidų seka, koduojanti baltymus su fitaziniu aktyvumu, taip pat šių baltymų aminorūgščių sekos. Gautas sekas galima panaudoti oligonukleotidų zondų sukūrimui, kurie naudojami hibridizacijos skryninge fitazės genams kituose šaltiniuose identifikuoti, ypač įvairiuose mikroorganizmuose, kurie po to gali būti išskirti ir klonuoti.

Sekos, gautos pagal šį išradimą, gali būti panaudotos kaip pradinė medžiaga, konstruojant “antros kartos” fitazes. “Antros kartos” fitazės - tai fitazės, pakeistos mutageniniais faktoriais (konkrečiai kryptingos mutagenezės metodas) ir pasižyminčios savybėmis, kurios skiriasi nuo laukinių arba rekombinantinio tipo fitazių savybių, pavyzdžiui, nuo gaunamų šiame išradime. Optimizuojant vieną arba kitą procesą, keičiami jo parametrai, tokie kaip temperatūra ir optimali pH reikšmė, santykinis baltymų aktyvumas arba giminingumas substratams.

Terminas “fitazė” šiame išradime apjungia šeimą fermentų, kurie katalizuoja reakcijas, kurių dėka pašalinamas neorganinis fosforas iš įvairių mioinozitolfosfatų.

Fitazės aktyvumui nustatyti yra daug metodų, jų pasirinkimas neapribojamas šiuo išradimu. Iliustracijai galima pateikti kiekybinį fermento aktyvumo nustatymo metodą pagal fermento sunaudojamą kiekį, reikalingą neorganinio fosforo atskėlimui iš 1,5 mM natrio fitato, kai greitis yra 1 μ M/min, 37° temperatūroje, esant pH 5,50.

Taip pat reikia turėti omenyje, kad terminas “fitazė”, naudojamas šiame aprašyme, apima visus baltymus ir poilpeptidus, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu. Šis teiginys

ilustruojamas Fig.1A, kurioje palyginamos A ir B sekos (mūsų tyrimuose nustatytos sekos) su C seka, nustatyta Ullak (1988b). Figūra. parodo, kad mūsų metodu galima gauti baltymus, kuriuose nėra natyvos fitazės iš *A. ficuum* pirmųjų 4 aminorūgščių liekanų (Baltymas, kurio seka A, neturi 7 pirmųjų aminorūgščių liekanų). Tačiau šie nurodyti baltymai vistiek turi fitazinį aktyvumą. Pilna fitazės baltymo aminorūgščių seka, gauta analizuojant nukleotidų seką, pateikta Fig.8.

Fitazės, gaunamos pateikiamu būdu, gali būti panaudotos įvairiuose procesuose, kuriuose reikia fitatą paversti į inozitolą ir neorganinį fosforą.

Atskiru atveju, naudojant fitazę, gautą pagal šį išradimą, galima sumažinti jos mikrobiologinės gamybos kainą ir užtikrinti rentabilumą, naudojant ją pašarų gyvūnams gamyboje ir galų gale pasiekti tokį pat efektyvumą, kaip ir naudojant pašarų priedais neorganinį fosforą. Be to, žymiai sumažėja fosforo kiekis mėšle.

Fitazės gamyba tokiomis pat kainomis kaip ir neorganinio fosforo, pridedamo į pašarus, praplės pašarų gamybos galimybes ta prasme, kad padidės kokybiškų pašarų asortimentas. Pavyzdžiui, pašarų praturtinimas fitaze įgalina atsisakyti nuo neorganinio fosforo ir padidinti juose fitato turinčių komponentų dalį.

Be gaunamos pagal šį išradimą fitazės panaudojimo kaip priedo gyvūnų pašarams ir panaudojimo perdirbant soją (žiūr. aukščiau), ji gali būti pritaikyta šiose pramonės šakose:

- skystų pašarų gamyboje kiaulėms ir naminiams paukščiams. Šiuo metu plačiai taikomas pašarų mirkymas kelias valandas prieš šėrimą. Per šį laiką fitazė paverčia fitatą į inozitolą ir neorganinį fosforą;

- inozitolo arba inozitolfosfato pramoninė gamyba iš fitato;

- kiti pramoniniai procesai, kuriuose naudojami fitatą turintys substratai, tokie kaip krakmolo gamyba ir fermentacija, įskaitant ir alaus gamybą. Metalų jonų surišimas į chelatus fitato pagalba gali padaryti juos neprieinamus mikroorganizmams. Fitato fermentinė hidrolizė pašalina šią problemą.

Šie ir kiti šio išradimo privalumai tampa dar akivaizdesni detaliau aprašius šį išradimą.

Trumpas figūrų aprašymas

Fig.1A. Išgrynintos fitazės aminorūgščių liekanų seka iš N-galo. Aminorūgščių liekanų sekos, pažymėtos raidėmis A ir B, nustatytos naudojant fitazės poformas, kurių izoelektriniai taškai, atitinkamai, yra 5,2 ir 5,4. Seka C pateikiama pagal Ullak publikacijas (1987, 1988b). Pagal mūsų duomenis 12-tos aminorūgšties liekana sekose A ir B nėra glicinas (ženklas * reiškia abejonę, o ženklas ** - nustatomos liekanos nebuvimą).

Fig.1B. Viduryje esančių fragmentų N-galų aminorūgščių liekanų seka po suskaldymo CNBr. Aminorūgščių sekos, pažymėtos raidėmis A ir B, kurių apytikrės molekulinės masės atitinkamai yra 2,5 ir 36 kD, nustatytos mūsų tyrimuose. Sekos C ir E pateikiamos pagal Ullak (1988c).

Fig.1C. Aminorūgščių liekanų seka iš N-galo baltymo, kurio molekulinė masė yra 100 kD, kuris pagal šiuos tyrimus randamas nevalytuose fitazės preparatuose.

Fig.2A. Oligonukleotidiniai zondai, sukonstruoti pagal Fig.1A duomenis (peptidai A-B).

Fig.2B. Oligonukleotidiniai zondai, sukonstruoti pagal Fig.1B duomenis (peptidai A ir B).

Fig.3. Oligonukleotidiniai zondai, naudojami geno, koduojančio rūgštinę fosfatazę, išskyrimui.

Fig.4. Bakteriofago lambda AF 201, turinčio fitazės *A. ficuum* lokusą, restrikcinius žemėlapis. Rodykle nurodomas fitazės genas ir transkripcijos kryptis. Klonas # nurodo subklonus, kurie gaunami nurodytų restrikcijos fermentų pagalba iš fago AF 201 plazmidėje pAN 8-1 (subklonui pAF 28-1) ir plazmidėje pVC 19 (visiems kitiems subklonams).

Fig.5. Plazmidės pAF 1-1 fizinis žemėlapis. Fragmentas BamHI, kurio ilgis 10 kilobazių, įterptas į pVC19, jame yra pilnas genas, kuris koduoja rūgštinę fosfatazę iš *A. ficuum*.

Fig.6. Plazmidžių pAF 2-3, pAF 2-8 ir pAF 2-7 nukleotidų sekos su fitazės chromosominiais geno lokusais. Fitazę koduojanti sritis yra tarp 210 ir 1713 nukleotido. Intronas chromosominiame gene yra tarp 254 ir 355 nukleotido. Parodyti ir kiti reikšmingi požymiai: pradinis ir galinis fitazės kodonai, restrikcijos vietos ir introno padėtis.

Fig.7. Detalus sekvenuoto chromosominio fitazės lokuso fizinis žemėlapis. Rodyklėmis pažymėta sritis, kuri koduoja fitazę, dviejų egzonų lokalizacija.

Fig.8. Fitazės kDNR transliacinės zonos fragmento nukleotidų seka ir atitinkama jai aminorūgščių liekanų seka. Pradžia subrendusios baltymo molekulės pažymėta +1 padėtimi. Vidinio baltymo, kurio molekulinė masė 36 kD, N-galo pradžia yra 241 padėtyje, o baltymas, kurio molekulinė masė yra 2,5 kD, prasideda nuo 390 padėties.

Fig.9. Fitazės ekspresijos bloko pAF 2-2S fizinis žemėlapis. Rodyklėmis parodytos genų transkripcijos kryptys.

Fig.10. Fitazės superekspresijos transformuotose ląstelėse *A. ficuum* NRRL3135 įrodymas izoelektrofokusu ir elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje. Tie patys kiekiai kultūrinio skysčio *A. ficuum* (juosta 1) ir transformuotų ląstelių pAF 2-2S SP7 (juosta 2) augintos vienodomis sąlygomis, analizuotos elektroforezės sistemoje Phast (Farmacia) elektrofokusu ir elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje, kai pH yra nuo 4,5 iki 6,0. Palyginimui buvo analizuojama homogeninė fitazė iš *A. ficuum* arba atskirai (juosta 4) arba mišinyje su kultūriniu skysčiu (juosta 3). Geliai buvo dažomi arba

selektyviai (tik fosfatazė), arba bendras baltymas (Coomasie Brilliant blue, B). Fitazės juostos pažymėtos žvaigždutėmis.

Fig.11. Fitazės superekspresijos transformuotose ląstelėse *A. niger* CBS 513.88 įrodymas izoelektrofokusu ir elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje. Tie patys kultūrinio skysčio kiekiai tėvinio kamieno *A. niger* (juosta 1) ir transformuotų ląstelių pAF 2-2S # 8 (juosta 2), pFYT3 # 205 (juosta 3) ir # 232 (juosta 4) buvo analizuojamos izoelektrofokusu ir elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje, figūroje aprašytomis sąlygomis. Geliai buvo dažomi tik bendram fosfatazės aktyvumui (A) ir bendram baltymui (B). Fitazės juostos pažymėtos žvaigždutėmis.

Fig.12. Plazmidės pAB 6-1 fizinis žemėlapis. HindIII DNR iš plazmidės pVC19 intarpas, kurio dydis 14,5 kilobazių, kuriame yra pilnas gliukoamilazės iš *A. niger* lokusas.

Fig.13. Promotoriaus AG ir fitazės geno sujungimo polimerazinės grandininės reakcijos schema. Visų pradmenų nukleotidinės sekos nurodytos tekste.

Fig.14. Fitazės ekspresijos bloko pAF 2-2S H fizinis žemėlapis.

Fig.15. Fitazės ekspresijos tarpinių blokų pXXFYT1 ir pXXFYT2 ir bloko pXXFYT3, kuriuose XX - lyderinė seka (L), fiziniai žemėlapiai. Į plazmidės p18FYT# ir p24FYT# įterptos lyderinės sekos AG 18 aa ir 24 aa, tuo tarpu plazmidėje pFYT# kaip lyderis panaudota fitazė.

Fig.16. Plazmidės pFYT3 amdS fizinis žemėlapis.

Fig.17. Plazmidės pFYT3INT fizinis žemėlapis.

Fig.18. Pakeičiančio fitazę/AG vektoriaus pREPFYT3 fizinis žemėlapis.

Fig.19. Chromosominės DNR autoradiografija po skaldymo PvuII (A) ir BamHI (B) ir hibridizacijos, zondų naudojant su ³²P žymėtą fitazės iš *A. ficuum* kDNR, šių mikroorganizmų: *S. cerevisiae* (juosta 2), *B. subtilis* (juosta 3), *K. lactis* (juosta 4), *P. erysogenus* (juosta 5), *P. aeruginosa* (juosta 6), *S. lividans* (juosta 7), 1 µg *A. niger* (juosta 8), 5 µg *A. niger* (juosta 9), kontrolė (juosta 10), *C. thermocellum* (juosta 11). Juosta 1 - markerinė DNR.

Genų, koduojančių tam tikrus baltymus, kurie produkuojami mikroorganizmuose, klonavimas gali būti atliktas įvairiais būdais. Vienas iš jų: reikalingo baltymo išgryninimas, nustatymas jo aminorūgščių liekanų sekos iš N-galo, pasirinkto mikroorganizmo genomines bibliotekos skyringas, naudojant DNR oligonukleotidinį zondą, kuris sintetinamas pagal nustatytą aminorūgščių liekanų seką iš baltymo N-galo. Kaip sėkmingą pavyzdį galima pateikti izopenicilin-N-sintetazės iš *Cephalosporium aeremonium* geno klonavimą (S.M. Samson et al., 1985, Nature, 318, 191-194) ir geno, koduojančio TAKA amilazę iš *Aspergillus oryzae*, išskyrimą (Boel et al., 1986, Europos paraiška patentui Nr.0238023).

Naudojantis šia strategija, mes pamėginome išskirti geną, kuris koduoja fitazę iš *Aspergillus ficuum*. Baltymas buvo kruopščiai išgrynintas ir nustatytos jo biocheminės

savybės. Gauti duomenys buvo palyginti su Ullak tyrimų duomenimis (1988a). Abiejų tyrimų rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė

Parametras	Šio išradimo duomenys	Ullak duomenys
Santykinis aktyvumas*	100 v/mg baltymo	50 v/mg baltymo
Išgryninimo laipsnis pagal elektroforezės duomenis	85 kD	85/100 kD
Išgryninimo laipsnis pagal izofokusavimo duomenis	3 arba 4 juostos	nebuvo nustatyta
K_M (giminingumo konstanta)	250 μM	40 μM
Specifiškumas:		
inozitolas-1-P	neaktyvi	neaktyvi
inozitolas-2-P	$K_M = 3,3 \text{ mM}$	5 % aktyvumo
pH optimumas	2,5 ir 5,5	2,5 ir 5,5
Optimali temperatūra, °C	50	58
Molekulinė masė, kD **	85	85 ir 100
Neglikozilinto baltymo molekulinė masė, kD **	56,5	61,7
Izoelektrinis taškas ***	5,0-5,4	4,5

* Ullak fitazės aktyvumas buvo nustatomas 58° temperatūroje, o ne 37°. Vienas fitazės aktyvumo vienetas - tai toks fermento kiekis, kuris reikalingas neorganinio fosforo atpalaidavimui iš 1,5 mM natrio fitato, kai greitis yra 1 $\mu M/min$, 37° temperatūra ir pH 5,50. Fermentacijos intensyvumo ir santykinio aktyvumo palyginimui su Ullak nustatytomis reikšmėmis, tos reikšmės buvo koreguojamos, įvertinant temperatūrų skirtumą. Ši korekcija remiasi aktyvumo skirtumais, matuojant 37° ir 58° temperatūrose; šie Ullak duomenys (1988b) pateikti 3 lentelėje.

** Molekulinė masė nustatyta elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu būdu.

*** Pagal izoelektrofokusavimo ir elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje duomenis.

Geno, koduojančio fitazę, išskyrimui iš pradžių buvo sintetinami oligonukleotidiniai zondai, kurių konstravimas aprašytas aukščiau (Fig.2A), remiantis nustatyta aminorūgščių liekanų seka. Viso proceso kontrolei tokiu pat būdu buvo išskirtas genas, koduojantis rūgštinę fosfatazę, naudojant šiam tikslui Ullak ir Cummins (Prep. Biochem., 17, 397-422, 1987) nustatytas baltymo charakteristikas. Rūgštinės fosfatazės geno išskyrimas nebuvo sudėtingas. Visai kitaip buvo su fitazės geno išskyrimu. Nežiūrint daugelio mėginimų naudojant zondus, gautų pagal nustatytą aminorūgščių liekanų seką

baltymo N-gale, nepasisekė išskirti kDNR genominių fragmentų ar genominės bibliotekos klonų, kuriuose vienareikšmiškai galima būtų įrodyti esant fitazę koduojantį geną.

Šio uždavinio sprendimui fitazė buvo suskaldyta CNBr, išskirti gauti baltymo fragmentai, nustatytos šių fragmentų aminorūgščių liekanų sekos iš N-galo (Fig.1B).

Panaudojant gautus duomenis, buvo konstruojami nauji oligonukleotidiniai zondai (Fig.2B). Šių nukleotidinių zondų pagalba buvo galima identifikuoti specifinius DNR fragmentus ir panaudoti šiuos zondus reikalingų genominės bibliotekos klonų atrankai. Nepavyko kryžminė hibridizacija tarp gautų naujų klonų arba DNR fragmentų ir oligonukleotidinių zondų pirmo rinkinio arba klonų, kurie buvo atrinkti, panaudojant pirmą zondų rinkinį.

Todėl antras zondų rinkinys taip pat gali būti naudojamas koduojančių atitinkamas fitazes sekų identifikavimui.

Naujai atrinkti klonai buvo hibridizuojami (Northern blot hybridization). Diskretines iRNR galima buvo nustatyti tik tais atvejais, kai jos buvo išskiriamos iš micelio, produkuojančio fitazę. Hibridizacijos signalo nebuvo, kai iRNR būdavo skiriama iš micelio, kuris neprodukuoja fitazės. iRNR ilgis apytikriai buvo 1800 bazių ir teoriškai galėjo produkuoti baltymą, kurio maksimali molekulinė masė galėjo būti apie 60 kD. Ši molekulinės masės reikšmė atitinka neglikozilinto baltymo ir molekulinei masei baltymo, kuri apskaičiuojama iš DNR sekos.

Be to, transformuojant tokia iRNR grybų ląsteles, buvo stebimas fitazinio aktyvumo padidėjimas. Tai neabejotinai įrodo, kad buvo gauta nukleotidų seka, kuri koduoja fitazę. Aminorūgščių liekanų seka išgrynintos fitazės ir baltymų fragmentų, gautų suskaldant baltymą CNBr, buvo tokia pati, kaip aminorūgščių liekanų seka, nustatyta iš klonuojamo geno nukleotidų sekos. Nukleotidų seka ir iš jos išvesta aminorūgščių liekanų seka pateiktos Fig.6 ir 8, tai yra papildoma klonuojamo geno, koduojančio fitazę, struktūros iliustracija.

Nukleotidų sekos, koduojančios fitazę, išskyrimas yra prielaida fitazės gavimui pramoniniu mastu, naudojant dabartinę rekombinantinės DNR technologiją, kuri susideda iš tokių operacijų, kaip geno amplifikavimas, reguliacinių elementų pakeitimas (promotorių, sekrecijos signalų) arba įvairių metodų kombinacija.

Todėl šio išradimo objektas yra transformuotos ląstelės-šeimininkai, kuriose vyksta su didelėmis baltymo koncentracijomis efektyvi baltymų ir peptidų, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, ekspresija, o taip pat (jei to reikia) - efektyvi rūgštinių fosfatazių ekspresija. Tokios ląstelės gali būti ir iš šių siūlinių grybų genčių: *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichoderma* ir *Penicillium*, mielės: *Kluyvermyces* ir *Sacharomyces* ir bakterijos, priklausančios *Bacillus* genčiai. Rekomenduojama recipientais naudoti tokias mikroorganizmų formas, kuriose gali vykti intensyvi savų endogeninių baltymų sekrecija.

Ypatingai idomūs pramoniniai *Aspergillus* kamienai, tokie kaip *A. niger*, *A. ficuum*, *A. awamori*, *A. oryzae*. Kaip alternatyvą, galima naudoti *Trichoderma reesei*, *Mucor michei*, *Kluyvermyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

Transformuotose ląstelėse yra nukleotidų sekos, kurios koduoja norimą baltyminių produktą, taip pat jose įterpiama signalinė sekrecijos seka, sugebanti funkcionuoti tame šeimininke, kurios dėka sintetinamas peptidas arba baltyminis produktas yra sekretuojamas.

Pagal šį išradimą, galima naudoti įvairias signalines sekas. Pirmiausia, galima naudoti signalines sekas, kurios yra homologinės klonuotai ekspresuojamai nukleotidų sekai. Iš kitos pusės, homologinės rekombinacijos optimizacijai galima naudoti signalinę seką, kuri yra pilnai homologinė arba dalinai homologinė signalinei sekai atitinkamam recipiento geno lokusui. Be to, galima naudoti specialiai sukonstruotą signalinę seką norimo produkto sekrecijos padidinimui, pavyzdžiui, aprašytą darbuose Von Heyne (1983), Eur. J. Biochem., 133,17-21, Perlman & Halverson (1983) J. Mol. Biochem., 167. DNR seka, koduojanti signalinę seką, gali būti prijungta tiesiogiai prie koduojančios procesingo signalą (skėlimo vietos atpažinimo sritis) sekos arba per trumpą intarpą, kurio ilgis paprastai būna ne didesnis, nei dešimt kodonų.

Pagal šį išradimą pageidautina naudoti signalines sekas, homologines klonuojamai ekspresuojamai nukleotidų sekai, 18 aminorūgščių liekanų gliukoamilazės (AG) signalinę seką arba 24 aminorūgščių liekanų gliukoamilazės (AG) signalinę seką. Abi šios sekos gali būti homologinės arba heterologinės ekspresuojamai nukleotidų sekai.

Ekspresijos produktu arba reikalinga nukleotidų seka gali būti DNR, kuri gali būti homologinė arba heterologinė pasirinktam recipientui.

Šiame išradime terminas “homologinė” DNR suprantama kaip ląstelių, kurios yra tos pačios genties kaip ir recipientas, DNR. Pavyzdžiui, *Aspergillus* grybų ląstelės transformuojamos DNR iš *Aspergillus* grybų genties. Toks būdas įgalina pagerinti pasirinktos genties grybų savybes, suteikiant jiems tokias savybes, kurios nėra būdingos pasirinktam organizmui be transformavimo.

“Heterologinė” DNR - tai DNR, gauta iš kelių mikroorganizmų genčių ląstelių (pagal pavyzdį, pateiktą ankstesniame paragrafe, heterologine DNR gali būti DNR iš kitų nei *Aspergillus* mikroorganizmų, kuri naudojama ekspresijai *Aspergillus* ląstelėse).

Nukleotidų sekas, koduojančias baltymus su fitaziniu aktyvumu, pageidautina išskirti iš grybų. Pirmenybė teikiama nukleotidinėms sekoms, koduojančioms fitazę, iš grybų *Aspergillus ficuum* arba *Aspergillus niger*.

Atviroje 5' skaitymo rėmelio srityje turi būti reguliacinė, inicijuojanti transkripciją, zona (arba promotorius). Galima panaudoti bet kurią recipiento funkcijai aktyvią nukleotidų seką, tame tarpe promotorių ir homologinę ekspresuojamą nukleotidų seką, kuri koduoja fitazinį aktyvumą. Bet daugeliu atvejų naudojama sritis homologinė lokuso sričiai-taikiniui. Tai įgalina pakeisti lokuso-taikinio ekspresijos produktą. Šiuo atveju reguliacinė transkripcijos iniciavimo sritis patenkina keliamus reikalavimus ta prasme, kad yra pasiekiamas baltymo, koduojamo lokusu-taikiniu, ekspresijos ir sekrecijos lygis, ir pasiekama efektyvi baltymo produkcija. Tačiau kai kuriais atvejais gali būti reikalingas didesnis transkripcijos lygis, negu tas, kuris pasiekiamas su lokusu-taikiniu, arba, iškilus būtinybei, ekspresijos produktą gauti naudojant specifinį indukcijos faktorių. Tokiais atvejais naudojama transkripcijos iniciavimo reguliacinė sritis, kuri skiriasi nuo srities, esančios pasirinkto geno lokuse-taikinyje. Žinoma daug funkciškai aktyvių transkripcijos iniciavimo reguliacinių sričių iš įvairių siūlinių grybų rūšių. Tokios sritys yra tos, kurios koduoja gliukoamilazę (AG), grybų amilazę, rūgštinę fosfatazę, GAPDH, TrpC, AmdS, AleA, AldA, histoną H2A, PyrG, PyrY, izopenicilin-N-sintetazę, FGK, rūgštinę proteinazę, aciltransferazę ir kt.

Pageidautina, kad lokusas-taikinys koduotų didelio ekspresijos lygio baltymo geną, t.y. geną, kurio ekspresuojamo produkto koncentracija būtų ne mažesnė, nei 0,1 g/l (fermentacijos pabaigoje). Tokio proceso trukmė, be kitų faktorių, gali priklausyti nuo produkuojamo baltymo prigimties. Tokio geno pavyzdys gali būti genas, koduojantis

gliukoamilazę (AG). Kiti dominantys genai: grybų alfa-amilazės, rūgštinės fosfatazės, proteinazės, lipazės, fitazės ir celobiodegradazės. Ypatingai vertingi glikoamilazės iš *A. niger* geno lokusai, amilazės iš *A. oryzae*, celobiohidrolazės iš *T. reesei*, rūgštinės proteinazės iš *Mucor michei*, laktazės iš *Kluyromyces lactis* ir invertazės iš *Saccharomyces cerevisiae*.

Transkripcijos pabaigos reguliacinė sritis gali būti gauta iš panaudojamo geno, lokuso-taikinio arba kita tinkama seka. Esant ląstelėje dviems sekoms, einančioms po naudojamą geną (pagal transkripcijos kryptį), transkripcijos pabaigos sritis, jei ji homologinė lokusui-taikiniui, turi būti žymiai trumpesnė, nei homologinė flankuojanti sritis.

Paprastai naudojamas selektyvumo markeris, kuris yra transformuojamo ekspresuojamo genomo dalis, arba atskiras nuo transformuojamos srities, ko pasekoje jis gali būti įterptas už panaudojamo geno ribų. Kadangi rekombinantinės molekulės, pagal šį išradimą, transformuojamos į pramoninius mikroorganizmų kamienus, tai selektyvumo markeriai, kurie naudojami transformacijos kontrolei, turi būti dominuojantys. Jų įterpimas į recipientų ląsteles neturi iššaukti mutacijų. Pavyzdžiu markerių, kurie apsprendžia transformuotų ląstelių augimą selektyvioje terpėje, gali būti *A. nudulans* amdS genas, kurio dėka transformuotos *A. niger* ląstelės gali augti tik esant acetamidui, kaip vieninteliam maitinimo komponentui; markerių, įgalinančių augti ląsteles, esant antibiotikams, pavyzdys gali būti blc genas, suteikiantis atsparumą fleomicinui, arba hph genas, suteikiantis atsparumą higromicinui B.

Selektyvumo genas turi turėti savas reguliacines iniciavimo, transkripcijos ir translacijos sritis, todėl kad tai reikalinga nepriklausomai markerio ekspresijai. Kaip buvo minėta aukščiau, žinoma daugybė transkripcijos iniciavimo reguliacinių sričių, kurias galima panaudoti kartu su markeriniu genu. Tais atvejais, kai naudojamas atsparumas antibiotikams, jų koncentracija gali kisti priklausomai nuo atsparumo genų tipo ir būti nuo 30 iki 300 µg/ml.

Atskiras sekas galima prijungti vienu iš dviejų egzistuojančių būdų, pavyzdžiui, kerpančiomis, komplementariomis restrikcinėmis vietomis junginiuose, liguojant juos, gaunami buki galai, lipnius galus liguojant BaI, pradžios reparacija, mutagenėze *in vitro* ir kt. Esant būtinybei, galima naudoti daugelio ryšių sekas (polilinkerį) ir adapterius. Jie įvedami ir

iškerpami įprastais metodais ekspresijos elementų konstravimui palengvinti. Kiekviename tokių blokų sintezės etapų naudojamas fragmentų klonavimas, restriktinė analizė, sekvenavimas, hibridizavimas ir kitos operacijos. Yra daugybė vektorių klonavimui, bet šių vektorių pasirinkimas neapribojamas šiuo išradimu. Paprastai klonavimas vykdomas *E. coli* ląstelėse.

Flankuojančiose srityse gali būti tik dalis atviros nuskaitymui lokuso-taikinio srities, ypatingai jos signalinė seka, reguliacinės lokuso-taikinio 5' ir 3' geno sritys gali būti už reguliacinės srities. Paprastai flankuojančios srities ilgis būna ne mažesnis, nei 100 bazių porų, pageidautina ne mažiau 200 bazių porų, bet gali būti 500 bazių porų ir ilgesnė. Flankuojančios sritys pasirenkamos tokiu būdu, kad būtų pertraukiamas genas-taikinys ir tuo būdu jis tampa neekspresuojamu. Šis tikslas gali būti pasiektas, įterpiant ekspresijos bloką (kuriame yra ekspresuojama seka ir, jeigu reikia, tokie papildomi elementai, kaip signalinė seka, reguliacinė transkripcijos iniciavimo sritis ir/arba reguliacinė transkripcijos nutraukimo sritis) į nuskaitymą sritį šalia 5'-srities, pakeičiant geno-taikinio visą arba tik jo dalį sukonstruotu ekspresijos bloku, arba įterpiant sukonstruotą ekspresijos bloką tarp reguliacinės transkripcijos iniciavimo lokuso-taikinio srities ir atviro nuskaitymo rėmelio. Kaip buvo minėta, kai yra homologija tarp reguliacinės transkripcijos nutraukimo srities ir lokuso-taikinio srities, 3'-flankuojančios srities ilgis turi būti žymiai didesnis, nei reguliacinės transkripcijos srities, kuri yra transformuojamame genome.

Šio išradimo objektas taip pat yra pradinės konstrukcijos "antros kartos" fitazių sukūrimui, t.y. fermentų su fitaziniu aktyvumu, kurie savo savybėmis skiriasi nuo iki šiol išskirtų fermentų. Antros kartos fitazės gali būti charakterizuojamos pakeistais pH, temperatūros veikimo optimumais, specifiniu aktyvumu arba giminingumu substratui, o taip pat kitais skirtumais, kurie išplečia jų pritaikymo galimybes įvairiuose procesuose. Geriausias tokių mutacijų, tame tarpe ir kryptingų, objektas yra *E. coli* ląstelės. *E. coli* ląstelės nesugeba pašalinti intronų, kurie gali būti fitazės gene. Ekspresijai šiuose organizmuose geriausia naudoti klonuotą fitazės iDNR. Klonuota iDNR seka lengvai paveikiama žinomais būdais atliekamų mutacijų, po to mutuotas genas gali būti įterptas į norimą genomą.

Naujai sukonstruotą bloką galima transformuoti į recipientą linijiniu arba žiediniu vektoriumi, o esant būtinybei, jis gali būti pašalinamas iš vektoriaus. Geriausias vektorius

yra plazmidė, kurią paprastai linearizuoja, tam kad įterptų iki 1 kilobazės ilgumo klonuojamo geno seką. Pageidautina įterpti fitazės ekspresijos bloką, gaunamą pagal šį išradimą, į tam tikros mikroorganizmų rūšies genomą.

Yra daugybė transformacijos į siūlinius grybus metodų. Iš jų reikia paminėti protoplastų suliejimą arba transformaciją, elektroperforaciją arba ląstelių mikrobombardavimą. Ypatingai geri rezultatai gaunami protoplastų transformacija, jos naudojimas turi daug privalumų.

Iš pradžių pasirinkto grybo kamieno micelis pervedamas, lizuojant ląstelių sienelės fermentais, į protoplastus, osmozei stabilizuoti naudojant Kcl arba sorbitolą. CaCl_2 panaudojimas palengvina DNR įsijungimą į protoplastus. Analogišku poveikiu pasižymi koncentruotas polietilenglikolio tirpalas, be to, jis sukelia protoplastų agregaciją, kurios metu vyksta DNR įterpimas į protoplastus ir po to įjungiamas transformavimo faktorius. Po to protoplastai regeneruojami agarizuotoje terpėje, kurioje yra osmozės stabilizatoriai, ir esant būtinybei, selektyvumo reagentas, atsparumas kuriam yra koduojamas transformuojančiojoje DNR.

Po transformuotų ląstelių atrankos reikalingo geno įsijungimą galima nustatyti įvairiais būdais. Jei sintetinamas produktas yra hetrologinis recipientui, geno ekspresija nustatoma antikūnų pagalba. Kitas metodas yra vienas hibridizacijos variantas, kurio pagalba galima aptikti įterptą geną arba jo transkripcijos produktą.

Nukleotidų sekos amplifikacija arba transformuoto genomo ekspresija vykdoma standartiniais metodais: kelių transformanto kopijų įvedimas į transformacijos vektorių, selektyvumo markerio amds (žiūr., pavyzdžiui, Weinars et al., 1985, Current Genetics, 9, 361-368) panaudojimas. Amplifikuojama DNR seka gali būti, kaip nurodyta aukščiau, arba homologinė arba heterologinė recipiento DNR.

Atlikus visas šitas operacijas, ląsteles galima auginti įprastoje terpėje. Auginant ląsteles, naudojami nedidelėmis koncentracijomis proteinazių inhibitoriai: fenilmetilsulfonilfluoridas, alfa-2-makroglobulinas, pepstatinas ir kiti. Paprastai šių inhibitorių koncentracijos yra nuo 1 $\mu\text{g/ml}$ iki 1 mg/ml . Norint išvengti baltyminio produkto proteolizės, galima inaktyvuoti proteinazių geną(-us).

Transformuotas ląsteles galima auginti nepertraukiamos arba periodinės fermentacijos būdu, po kurios atskiriamas kultūrinis skystis ir iš jo ekstrahuojamas galutinis produktas.

Išgryninti galutinį produktą galima įvairiais metodais: chromatografija (tame tarpe ir HPLC), ekstrakcija tirpikliais, elektroforeze, taip pat kitais metodais arba jų deriniais.

Šio išradimo objektas taip pat yra baltymo maštabavimas, kurio metu atliekamas kultūrinio skysčio (esant reikalui, iš anksto apdoroto) filtravimas, po šio filtravimo atliekama sterilizuojanti filtracija, po to tirpalas koncentruojamas. Tokiu būdu gautą skystą koncentratą galima apdoroti tokiais būdais:

a) nepertraukiamai maišant, išsodinant fitazę ir kitus baltymus acetonu iki galutinės jo koncentracijos 60% (tūrio procentai). Nuosėdas galima išdžiovinti vakuume 35° temperatūroje. Susmulkinus sausus miltelius, fermentacijos produktas naudojamas praktinio jo pritaikymo bandymuose. Šio būdo galutinio produkto išeiga sudaro 90 %.

b) išdžiovinant purkštuvinėje džiovykloje; išeiga - 80-99 %.

c) sumaišant su užpildais, pavyzdžiui, su kviečių sėlenomis. Gautus mišinius galima išdžiovinti džiovinimo arba verdančio sluoksnio kolonose.

d) stabilizuojant osmotinį slėgį, pridedant, pavyzdžiui, sorbitolo. Apsaugojimui nuo mikroorganizmų augimo naudojami konservantai, pavyzdžiui, benzoinė rūgštis.

Šios aprašytos keturios galutinio produkto formos gali būti parduodamos pusfabrikačių gamintojams, kombinuotų pašarų gamintojams, kitiems vartotojams ir fermeriams.

Pateikiami pavyzdžiai yra išradimo iliustracija ir neapriboja šio išradimo pritaikymo. Šios srities specialistams nesunku suprasti, kad fitazės genas, pagal šį išradimą, gali būti panaudotas heterologinės hibridizacijos eksperimentuose, norint išskirti fitazę koduojantį geną iš kitų mikroorganizmų rūšių.

1 pavyzdys

A. ficuum NRRL 3135 fermentacija

NRRL 3135 *Aspergillus ficuum* kamienas buvo gautas iš Northern Region Research Lab. USDA, 1815, Northern Univ. str. Peoria, JAV. Grybų sporų preparatai buvo paruošiami pagal standartinę metodiką.

Sporos, o po to ir ląstelės, daug kartų buvo persėjamos Erlenmejerio kolbose ir pernešamos į 10 litrų fermentatorių. Po ciklinio kultivavimo, šiame fermentatoriuje išaugusi kultūra buvo naudojama inokuliantu 500 litrų galutinei fermentacijai.

Naudojamos terpės sudėtis: 91 g/l kukurūzų krakmolo (BDH Chemicals Ltd.), 38 g/l gliukozės kristalohidrato, 0,6 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g/l KCl, 0,2 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ir 12 g/l KNO_3 . pH buvo palaikomas $4,6 \pm 0,3$, automatiškai titruojant 4N NaOH ir 4N H_2SO_4 tirpalais.

Ląstelės buvo auginamos 28° temperatūroje, automatiškai reguliuojant įsotinimą deguonimi, palaikant jo 25 %. Maksimali fitazės produkcija nuo 5 iki 10 v/ml buvo pasiekama po 10 dienų nuo fermentacijos pradžios.

2 pavyzdys

Fitazės iš *A. ficuum* išgryninimas ir jos savybės

A. Fitazės iš *A. ficuum* aktyvumo nustatymas

Nufiltravus, 100 μl kultūrinio skysčio (jei reikia, praskiedžiama) arba supernatanto, arba tirpiklio (kontrolei) buvo pridedama į inkubacijos tirpalą:

- 0,25 M natrio acetatinis (pH 5,5) arba glicino-HCl (pH 2,5) buferinis tirpalas,
- 1 mM fitinės rūgšties natrio druska,
- tirpiklis iki bendro tūrio 900 μl .

Mišinys buvo inkubuojamas 30 min. 37° temperatūroje. Reakcija buvo stabdoma, pridedant 1 ml 10% TChA (trichloracto rūgštis) tirpalo. Po reakcijos sustabdymo buvo pridedama 2 ml reagento (3,66 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 ml amonio molibdato tirpale (2,5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ir 8 ml H_2SO_4 , praskiesto 250 ml tirpiklio)). Susidariusios mėlynos spalvos intensyvumas buvo matuojamas spektrofotometru 750 nm ilgio bangoje. Matavimų rezultatai rodo, kad išsiskyrusio reakcijos metu fosfato kiekis buvo nuo 0 iki 1 mM/l (nustatant pagal fosfato kalibracinę kreivę).

Fosfatazės dažymas

Komponentai, kurie pasižymi fosfataziniu aktyvumu, buvo nustatomi izoelektrofokusavimu, naudojant įprastą dažą. Gelis buvo inkubuojamas alfa-naftilfosfato ir Fast Garnet GBC, Sigma (atitinkamai 0,1 ir 0,2 % (svoris/tūris) 0,6 M natrio acetatiniame buferiniame tirpale, pH 5,5. Reakcija, kurios metu susidaro juodos

nuosėdos, sustabdoma metanolio ir acto rūgšties mišiniu, tūrių santykis 30:10 arba, norint išgauti baltymą su fitaziniu aktyvumu, perplaunant distiliuotu vandeniu.

B. Fitazės iš *A. ficuum* išgryninimas

Fitazė buvo gryninama iš *A. ficuum* NRRL 3135 kultūrinio skysčio iki homogeninės. Kultūrinis skystis buvo filtruojamas sterilizuojančios filtracijos būdu. Filtratas buvo koncentruojamas Filtron ultrafiltracijos įrangos pagalba su 30 kD filtrais. Reikalinga joninė jėga ir pH buvo pasiekiami, perplaunant koncentratą 10 mM natrio acetatiniu buferiniu tirpalu, pH 4,5. Šios stadijos metu pasiekiamas 20-ties kartų sukonzentravimas.

Po koncentravimo tirpalas buvo sorbuojamas ant jonų mainų sorbento (kolona HR 16/10, 20 ml, su sorbentu S-sefaroze (Fast-Flow, Pharmacia), chromatografija buvo atliekama su pagreitinta baltymų gryninimo sistema (Waters Preparative 650 Advanced Protein Purification System). Sorbuoti baltymai buvo eliuuojami nuo 0 iki 1 M natrio chlorido koncentracijos gradientu, fitazė desorbavosi, esant 250 mM NaCl koncentracijai. Frakcijos, kuriose buvo fitazinis aktyvumas, buvo koncentruojamos ir nudruskinamos ultrafiltracijos būdu. Gautas tirpalas buvo užpilamas ant jonų mainų sorbento kolonėlės (katijonų mainų Q-sefarozė Fast Flow, HR 16/10, 20 ml, Pharmacia), baltymai buvo eliuuojami natrio acetatiniu buferiu su NaCl koncentracijos gradientu nuo 0 iki 1 M taip, kaip aprašyta aukščiau. Fitazė buvo eliuuojama, kai NaCl koncentracija pasiekdavo 200 mM.

Po šių stadijų produkto santykinis fitazės aktyvumas buvo nuo 40 iki 50 v/mg baltymo, buvo pasiekiamas 25 kartų išgryninimas.

Analizuojant dalinai išgrynintą fitazės preparatą, buvo nustatyta vienintelė priemaiša, kurios molekulinė masė apytikriai buvo lygi 100 kD (Fig.1B, seka E). Izoelektrofokusavimu buvo nustatyti keli fermentai, pasižymintys fitaziniu aktyvumu, tame tarpe 3-4 fitazės formos, kurių izoelektriniai taškai buvo tarp 5,0 ir 5,4 (Fig.1A, sekos A ir B).

Norint gauti homogeninį fosfatazės preparatą, preparatas buvo du kartus gryninamas izofokusavimu sistemos LBB Multiphor pagalba plokštelėse Ampholine PAG (pH intervalas nuo 4,0 iki 6,5). Baltymai su fitaziniu aktyvumu (tame tarpe ir fitazė) buvo nustatomi, dažant bendras fosfatazes, kaip nurodyta aukščiau. Atitinkamos juostos buvo

išpjaunamos iš gelio ir aktyvus baltymas eliuuojamas, 16 valandų inkubuojant gelio gabaliukus 10 mM natrio acetatiniame buferiniame tirpale, pH 5,5. Baltymų frakcijos buvo analizuojamos, norint nustatyti santykinį fitazės aktyvumą pagal 2 pavyzdyje aprašytą metodą ir norint atskirti po analizės fitazę nuo kitų rūgštinių fosfatazių. Galutinis išvalymo laipsnis buvo 60 kartų (santykinis išgryninto baltymo aktyvumas buvo 100 v/mg). Šioje paskutinėje valymo stadijoje pasisekdavo išskirti fitazės izoformas (Fig.1A, sekos A ir B).

Efektyvus išgryninimas buvo pasiekiamas, naudojant monokloninius antikūnus *A. ficuum*. Antikūnai buvo imobilizuojami ant cianobromidu aktyvuotos sefarozės 4B (5 mg/ml sorbento), gautas sorbentas buvo naudojamas imunoafininei chromatografijai. Sorbento imlumas buvo apie 1 mg fitazės 1 ml. Fitazė buvo eliuuojama buferiniu tirpalu, kurio pH 2,5 (100 mM HCl-glicino, 500 mM NaCl), chromatografijos metu nebūdavo aktyvumo nuostolių. Šį valymo būdą galima panaudoti, išgryninant fitazę iki homogeninės iš kultūrinės terpės, vienintelės šios stadijos pagalba. Šio būdo išeiga - 80 %, išvalymo laipsnis - 60 kartų.

C. Fitazės deglikozilinimas

Fitazės iš *A. ficuum* (70 µg baltymo) buvo inkubuojama su 25 vienetais N-glikazės (Genzyme) 0,2 M natrio fosfatiname buferiniame tirpale, pH 6,8, su 10 mM 1,10-fenantrolinu, bendras reakcijos tūris - 30 µl.

Po 18 valandų inkubacijos 37° temperatūroje deglikozilinimo laipsnis buvo įvertinamas elektroforezės sistemos Phast System (Pharmacia) pagalba. Fitazės molekulinė masė sumažėdavo nuo 85 kD iki apytikriai 56,5 kD. Dažant cukrams selektyviu dažu - Šifo reagentu, - norint nustatyti polisacharidų kiekį baltymo juostoje, nebuvo rasta polisacharidų liekanų baltyme. Pilnas angliavandenių nebuvimas papildomai buvo tikrinamas didelio jautrumo metodu - blotuojant lektinu. Natyvi ir deglikozilinta fitazė (po 1,5 µg) buvo analizuojama elektroforezės metodu standartinėmis sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu, baltymai pernešami ant membranos PVDF (Immobilon, Millipore) 25 mM Tris-glicininiame buferiniame tirpale, pH 8,3, su 20% metanolio 16 valandų, esant 30 V įtampai.

Po to membrana buvo inkubuojama su 1 % stambųjų raguočių serumo albuminu fosfatiname buferiniame tirpale, po to konkavalin-A-peroksidazės konjugato (Sigma) (10 µg/ml) tokiame pačiame buferinaime tirpale.

Šiuo jautriu metodu taip pat nebuvo aptikta angliavandenių liekanų deglikozilintoje fitazėje.

Po deglikozilinimo fermentas pilnai netekdavo aktyvumo, matyt dėl molekulių agregacijos.

3 pavyzdys

Fitazės aminorūgščių liekanų sekos nustatymas ir oligonukleotidinių zondu konstravimas

A. Aminorūgščių liekanų sekos nustatymas iš baltymo N-galo

Po elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu ir po izofokusavimo fitazė buvo pernešama ant membranos. Elektroblotingas buvo atliekamas 10 mM CHAPR (3-cikloheksilaminopropansulfoninė rūgštis) buferiniame tirpale, pH 11,0, su metanolio (10 % pagal tūrį) 16 valandų, esant 30 V įtampai, 4° temperatūroje.

Baltymo lokalizacija buvo nustatoma, dažant Kumasi brilianto mėliu. Atitinkama juosta buvo iškerpama, išblukinama metanolyje ir buvo nustatoma seka dujų-fazinio sekvenavimo pagalba. Ši procedūra buvo kartojama keletą kartų, naudojant skirtingus pavyzdžius. Gauti rezultatai pateikti Fig.1A (sekos A ir B).

Lygiagrečiai buvo nustatoma ir 100 kD baltymo, kuris būdavo dalinai išgrynintame preparate, aminorūgščių liekanų seka. Šie duomenys pateikti Fig.1C. Nustatyta aminorūgščių liekanų seka tam tikru laipsniu buvo homologinė fosfatazės, išskirtos iš *Aspergillus niger*, aminorūgščių liekanų sekai, kuri buvo nustatyta (Mac Rac et al., 1988, Gene, 17, 339-348).

B. Aminorūgščių liekanų sekų nustatymas baltymo viduryje

Baltymo skaldymas cianbromidu

Ultracentrifugavimo būdu išvalyta homogeninė fitazė buvo pridėta į 100 mM NaHCO₃ tirpalą, naudojant mikrokoncentratorių Centricon 30 (Amicon). Po to baltymas buvo liofilizuojamas, tirpinamas 70 % (masė/tūris) trifluoracto rūgštyje ir inkubuojama su 300 kartų moliniu CNBr pertekliumi 6 valandas. Reakcija buvo stabdoma, praskiedžiant inkubacijos mišinį vandeniu. Po to mėginys buvo praskiedžiamas elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje su dodecilsulfatu buferiniu tirpalu su DTT (ditiotrietolis), ir pagal nurodytą elektroforezės metodiką buvo įvertinamas baltymo suskaldymas. Analitiniams SDS elektroforezės tikslams buvo naudojamas Phast System (Pharmacia)

elektroforezės aparatas, naudojamo gelio koncentracija buvo 20%. Mažų peptidų funkcionavimo elektroforezės metu padidinimui iš pradžių buvo atliekama elektroforezė be mėginių, tuo būdu gaunama vienoda buferinė sistema gelyje (tai buvo atliekama, prisilaikant gamintojo instrukcijų). Peptidai buvo nustatomi dažant sidabru; toks metodas plačiai taikomas tokiems tikslams, nes dažant Kumasi brilianto mėliu, mažų peptidų nepasiseka nustatyti. Atlikus skaldymo operaciją, buvo nustatyta, kad fitazė pilnai buvo suskaldyta į polipeptidus, kurių molekulinės masės buvo nustatytos 2,5, 36, 57 ir 80 kD.

Šie peptidai buvo išskirti dujų-faziniu sekvenavimu, panaudojant elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje su tricinu ir natrio dodecilsulfatu, kaip aprašyta Schragger & Jagav (1987, Anal. Biochem., 166, 368-379), po to buvo atliekamas elektroblotingas pagal aukščiau aprašytą metodiką.

Fragmento, kurio molekulinė masė 57 kD, aminorūgščių liekanų seka iš baltymo N-galo buvo identiška aminorūgščių liekanų sekai iš fitazės N-galo, kuri buvo aprašyta Ullak (1988c, supra), ji skyrėsi tik tuo, kad nurodytame fragmente nebuvo pirmųjų 4 aminorūgščių liekanų (Fig.1A, seka B). Peptidų, kurių molekulinės masės buvo 2,5 ir 36 kD, aminorūgščių liekanų seka iš N-galo pateikta Fig.1B (sekos A ir B).

Oligonukleotidiniai zondai

Oligonukleotidinių zondu konstravimas rėmėsi nustatytomis aminorūgščių liekanų sekomis (Fig.1A ir 1B). Jų sintezė buvo atliekama DNR sintezatoriumi Applied Biosystems ABI 380B. Šie oligonukleotidai pavaizduoti Fig.2A ir 2B.

4 pavyzdys

Genominių kompleksų ir genominių bibliotekų hibridizacija su pirmuoju oligonukleotidu zondu rinkiniu

Genominės DNR iš *A. ficuum* buvo išskiriamos po micelio susmulkinimo skystame azote pagal standartines metodikas (šiuo atveju naudojant metodiką Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. USA, 1470-1474). Genominė biblioteka buvo konstruojama bakteriofago lambda EMBL3 vektoriuje, panaudojant dalinai restriktuotą Sau3A *A. ficuum* kamieno NRRL 3135 chromosominę DNR (pagal standartinę metodiką, aprašytą Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., N.Y., 1982). Tokiu būdu gauta genominė biblioteka sudaro 60-70 kartinį *A. ficuum*

genomą. Tuščių dėmių be intarpo kontrolė bibliotekoje buvo vykdoma hibridizacijos pagalba su labiau uždaru fago lambda EMBL 3A fragmentu. Hibridizuojant su lambda EMBL 3A zondų dėmės, hibridizuodavosi ne daugiau 1 %. Intarpo dydis buvo 13-17 kilobazių.

Zondų, reikalingų genominės bibliotekos skryningui, sąlygų ir savybių išaiškinimui genominė DNR buvo suskaldyta keliais restrikcijos fermentais, fragmentai atskirti agarozėje ir blotuojami Genescreen aparatu pagal gamintojo rekomendacijas. Gauti preparatai hibridizavosi su visais oligonukleotidiniais zondais. Hibridizacija buvo vykdoma sąlygose, besiskiriančiose limitavimo laipsniu (6xSSC, nuo 40 iki 60° hibridizacijos metu ir iki 0,2xSSC 65° perplaunant). Genominės bibliotekos skryningui buvo pasirinkti zondai 1068 ir 1024 (Fig.2A), nors bendri DNR fragmentai, kurie hibridizuotųsi su abiem zondais, nebuvo rasti. Zondas 1025 šarminei fosfatazei (Fig.3) davė specifinį diskreitinį hibridizacijos signalą. Todėl jis buvo pasirinktas rūgšties fosfatazės genominės bibliotekos skryningui.

Visų trijų zondų pagalba galima nustatyti genominėje bibliotekoje hibridizuojančiąsias dėmes. Hibridizacijos signalas, atitinkantis zondui 1025 (rūgštinės fosfatazės), buvo intensyvus ir atsikartojantis. Zondai 1024 ir 1068 duodavo kintamo intensyvumo hibridizacinius signalus, jie charakterizavo fitazės savybes. Kryžminės reakcijos tarp abiejų serijų nebuvo pastebėtos. Buvo atliktas pakartotinis skryningas visų trijų serijų dėmių, iš aštuonių vienetinių, sugebančių hibridizuotis dėmių, buvo išskirta DNR (Maniatis et al., supra). Kiekvienoje serijoje buvo identifikuoti klonai, turintys identiškus hibridizuojančiuosius fragmentus. Tai įrodo, kad klonuose esantys intarpai dalinai gali persidengti vienoje ir toje pačioje genominės DNR srityje. Bet ir šiuo atveju kryžminės hibridizacijos nebuvo (naudojant dvi serijas specifinių fitazės zondų 1024 ir 1068). Tokiu būdu, nors abu zondai, kurie buvo naudojami dviejų klonų serijų analizei, buvo sukonstruoti pagal baltymo aminorūgščių liekanų iš N-galo seką, identifikavosi ir klonavosi skirtingi genominės bibliotekos DNR fragmentai.

Visos trys klonų serijos hibridizavosi su dėmėmis, kuriose buvo iRNR, išskirtomis iš aktyvuoto ir neaktyvuoto micelio (Northern blots, 6 pavyzdys). Specifiškai rūgštinei fosfatazei klonai ir išskirtas iš šių klonų vidinis fragmentas SaII, kurio ilgis 3,1 kilobazės, hibridizavosi tik su indukuotos iRNR pavyzdžiais. Identifikuotos su specifiniais rūgštinės

fosfatazės zondais iRNR ilgis buvo apytikriai 1800 bazių, tai atitinka žinomam baltymo dydžiui (68 kD pagal Ullak & Cummins, 1987, Prep. Biochem., 17, 397-422). Specifiški fitazei klonai nesihybridizavo su specifiskomis iRNR. Todėl mes padarėme išvadą, kad aprašytosios metodikos pagalba negalima klonuoti geno, koduojančio fitazę. Kita išvada - šis metodas nėra blogas, nes jo pagalba buvo klonuotas genas, koduojantis rūgštinę fosfatazę. Lambda klonas, turintis savyje rūgštinės fosfatazės geną, buvo perduotas saugojimui į Centrinį grybų kultūrų biurą Baarn, Olandija (Central Bureu voor Schimmelentures. Baarn, Netherlands) 1989 m. balandžio 24 d., kuriam buvo suteiktas numeris CBS 214.89. Iš dėmės Z1 buvo išskirtas BamHI fragmentas, kurio ilgis 10 kilobazių, kuris buvo klonuotas į pUC19. Šis paklonis turi pilną geną, koduojantį rūgštinę fosfatazę. Paklonis, pažymėtas pAF 1-1 (Fig.5), buvo perduotas saugojimui 1989 m. balandžio 24 d., jam buvo suteiktas numeris CBS 213.89.

5 pavyzdys

Geno, koduojančio fitazę, išskyrimas, naudojant antrąjį oligonukleotidinių zondų rinkinį

Zondai buvo konstruojami pagal aminorūgščių liekanų sekas iš peptidų fragmentų N-galų, kurie buvo gaunami skaldant baltymą CNBr (Fig.2B, zondai 1295, 1236 ir 1297), ir buvo hibridizuojami, kaip aprašyta aukščiau, su genomine DNR. Šių zondų tinkamumas fitazę koduojančio geno nustatymui buvo tikrinamas, hibridizuojant juos su genominiiais kompleksais (Southern hybridization). Šiuo atveju, naudojant visus tris zondus, buvo gaunami hibridiniai atitinkamo ilgio fragmentai, nežiūrint į tai, kad zondai buvo sukonstruoti iš persidengiančių sričių. Nebuvo hibridizacijos tarp naujo zondų rinkinio ir klonų, atrinktų pirmuoju zondų rinkiniu (4 pavyzdys). Todėl buvo atlikti specialūs pakartotiniai genominės bibliotekos skryningo su trimis zondais bandymai. Taip pat nustatyta pogrupės (lambda AF 201, 219, 241 ir 243) klonų, kurie buvo atrinkti su vienu iš trijų zondų, su kitais dviem zondais hibridizacija. Tai parodo, kad naudojant tris skirtingus zondus, buvo išskirti klonai iš vienos ir tos pačios genomo srities. Buvo pabandyta hibridizuoti naujai atrinktus klonus su zondais 1024 ir 1068. Abiem atvejais nauji klonai su šiais zondais nesihybridizavo tokiose sąlygose, kuriose šie zondai hibridizavosi su klonais, atrinktais šių zondų pagalba (4 pavyzdys). Tai įrodo, kad naujai atrinkti klonai buvo

nehomologiniai zondams, sukonstruotiems pagal fitazės N-galo aminorūgščių liekanų seką.

Klonas lambda-EMBL3, kuris hibridizavosi su visais trimis zondais (1295, 1296 ir 1897), buvo pavadintas lambda-AF201 (Fig.4). Jis buvo perduotas saugojimui 1989 m. kovo 9 d., jam buvo suteiktas numeris CBS 155.89.

Klono AF201 BamHI fragmentas, kurio ilgis 5,1 kilobazių, subklonuotas į pUC19 ir pažymėtas pAF 2-3 (žiūr. Fig.4), hibridizavosi su visais trimis oligonukleotidiniais zondais ir buvo naudojamas blotingui. Šiuose eksperimentuose buvo išskirta diskretinė iRNR, kurios ilgis buvo 1800 bazių. Ši iRNR buvo tik aktyvuotuose miceliuose. Panašūs rezultatai buvo gauti, naudojant oligonukleotidinius zondus. Todėl, naudojant naują zondų rinkinį, buvo identifikuotas bendras DNR fragmentas, kuris specifiškai hibridizavosi su indukuota iRNR. Šios RNR ilgis (1800 bazių) yra pakankamas baltymo, kurio molekulinė masė yra apie 60 kD, kodavimui, t.y. tokio pat dydžio, kaip ir neglikozilintas fitazės baltymas. Akivaizdu, kad išskirtuose fragmentuose yra bent dalis geno, koduojančio fitazę.

6 pavyzdys

“Neindukuotos” ir “indukuotos” iRNR išskyrimas

Iš literatūros žinoma, kad fitazės sintezė *A. ficuum* ląstelėse griežtai kontroliuojama priklausomu nuo fosfato mechanizmu (Han & Callagher, 1987, J. Industr. Microbiol., 1, 295-301). Todėl mes laikėme, kad parodymus panašų reguliacijos mechanizmą išskirtam genui, mes įrodysime šio geno klonavimą.

Norint išskirti iRNR, sintezuojamą produktyviomis ir neproduktyviomis sąlygomis, *A. ficuum* ląstelės (kamienas NRRL 3125) buvo auginamos tokiu būdu. Iš pradžių sporos buvo auginamos per naktį neindukuojančioje terpėje. Kitą dieną buvo surenkamas micelis, perplaunamas steriliu vandeniu ir pernešamas į aktyvuojančią ir neaktyvuojančią terpes, kurios sudėtis: 20 g/l kukurūzų krakmolo, 7,5 g/l gliukozės, 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ir 7,2 g/l KNO_3 . Fitazės indukcijai į terpę buvo pridedama iki 2 g/l kukurūzų ekstrakto, o į neindukuojančią terpę įdedama iki 2 g/l K_2HPO_4 . Micelis buvo auginamas ne mažiau 100 valandų, imant mėginius po tam tikro laiko tarpo. Fitazės produkcija buvo kontroliuojama pagal metodiką, aprašytą 2A pavyzdyje. Denatūruota DNR buvo išskirta elektroforezės ir bloto Genescreen plus aparate būdu. Gautos dėmės buvo

hibridizuojamos su žymėtu ^{32}P pAF 2-3 arba su išskirtu iš pAF 1-1 SaII fragmentu, kurio ilgis 3,1 kilobazių pagal 4 pavyzdį (rūgštinės fosfatazės atveju). Šio eksperimento rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Dėmių hibridizacija su specifiniu fitazei fragmentu BamII, kurio ilgis 5,1 kilobazių (A), arba specifiniu rūgštinei fosfatazei fragmentu SaII, kurio ilgis 3,1 kilobazių (B), naudojamų zondais. Ženklas + parodo esant fitazės iRNR, kurios ilgis 1800 bazių, arba rūgštinės fosfatazės iRNR, kurios ilgis 1800 bazių. Santykinis fitazės aktyvumas buvo nustatomas mėginiuose, gautuose po 24 valandų kultivavimo. Aktyvuotose kultūrose fitazės aktyvumas buvo 10 kartų didesnis, nei neaktyvuotose.

	Laikas	Aktyvuota kultūra	Neaktyvuota kultūra
A	24 valandos	+	-
B	24 valandos	+	-

Hibridizacija tarp specifinio fitazei fragmento BamHI, kurio ilgis 5,1 kilobazių, ir specifinio rūgštinei fosfatazei fragmento SaII, kurio ilgis 3,1 kilobazių, su išskirta iRNR vyko tik tais atvejais, kai ląstelės buvo auginamos indukuojančiomis fitazės ir rūgštinės fosfatazės biosintezę sąlygomis. Iš šių rezultatų buvo padaryta išvada, kad šie išskirti genai yra reguliuojami aprašytais fitazės ir rūgštinės fosfatazės reguliavimo mechanizmais.

7 pavyzdys

Fitazės geno klonavimo įrodymas

Norint neginčijamai įrodyti, kad sėkmingai išskirtas fitazę koduojantis genas ir pademonstruoti galimybę padidinti jos ekspresijos lygį, šis genas buvo subklonuotas į atitinkamą vektorių ir juo buvo transformuotos *A. niger* 402 (ATCC 9092) kamienas. Šiam tikslui buvo išskirtas fitazės genas iš klonuotą lambda AF 201 fragmento NruI pavidalu, kurio ilgis 10 kilobazių, ir jis buvo klonuotas StuI saite vektoriuje pAII 1-3, kuriame selektyvumo markeris buvo atsparumas fleomicinui (Mathern I.E. & Puni P.J., 1988, Fungal Genetics Newsletter, 35, 25). Gautas darinys buvo pavadintas pAF 28-1 (Fig.4) ir buvo transformuotas į *A. niger* 402 kamieną pagal metodiką, aprašytą 9 pavyzdyje, su tuo skirtumu, kad protoplastai buvo užnešami ant minimalios *Aspergillus* kultūrinės terpės, į kurią buvo pridedama 30 $\mu\text{g/ml}$ fleomicino ir kietinama su 0,75 % agaru. Atskiri transformantai po atrankos buvo valomi ir buvo nustatomas jų produktyvumas, auginant

mikrobiologinėse kolbose, kaip aprašyta 1 ir 2 pavyzdžiuose. Kontrolei buvo naudojami transformantai, turintys savyje tik vektorius arba netransformuotas ląsteles-recipientes (3 lentelė). Buvo nustatyta, kad fitazę, susirišančią su specifiniais antikūnais fitazei iš *A. ficuum*, sintetino tik *A. niger* 402 kamienas, kuris turėjo pAF 28-1. Fermentas, kuris rišosi su nurodytais antikūnais, buvo eliuuojamas nuo imunoafininio sorbento esant pH 2,5. Pagal molekulinę masę, glikozilinimo laipsnį, izoelektrinį tašką ir santykinį aktyvumą eliuotas baltymas nesiskyrė nuo fitazės iš *A. ficuum*. Šie duomenys pilnai įrodo, kad ląstelės *A. niger* 402, transformuotos pAF 28-1, ekspresuoja fitazę, praktiškai identišką fermentui iš *A. ficuum*. Analogiška ekspresija kontrolėje nebuvo pastebėta.

3 lentelė

Kamienas	Fitazės aktyvumas, v/ml	Sorbuotos imunosorbentu fitazės kiekis, %
<i>A. niger</i> 402	0,5	0
<i>A. niger</i> 402 pAF 28-1	0,7	10
<i>A. niger</i> 402 pAN 8-1	0,5	0

Grybų kamienai buvo auginami aktyvuojančioje terpėje (6 pavyzdys).

Mėginiai buvo paimami po 96 valandų nuo kultivavimo pradžios.

8 pavyzdys

Fitazės geno charakteristika

Lambda klonai, kuriuose yra fitazės genas, buvo analizuojami įvairių restrikcijos fermentų pagalba. Genominės srities, kurioje yra fitazės genas, žemėlapis pateiktas Fig.4.

Aukščiau (5 pavyzdys) buvo parodyta, kad esančiame pAF 2-3 BamHI fragmente, kurio ilgis 5,1 kilobazių, yra bent dalis fitazės geno. Be to, oligonukleotidiniai zondai 1295 ir 1237 hibridizavosi su SaII intarpu pAF 2-7 (žiūr. Fig.2B; klonų pAF 2 padėtys nurodytos Fig.4), kai zondas 1236, matyt, rišasi su saitų SaII tarp fragmentų pAF 2-6 ir pAF 2-7.

Šių eksperimentų rezultatai parodo, kad koduojanti fitazę seka yra lokalizuota kairėje BamHI intarpo dalyje plazmidėje pAF 2-3.

Sekančių bandymų metu buvo pilnai iššifruota intarpų plazmidėse pAF 2-3, pAF 2-6 ir pAF 2-7 nukleotidų seka. Šiam tikslui buvo naudojama didezoksi-grandžių nutraukimo metodika (Sauger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467) ir

bombardavimo metodika, aprašyta Messing et al., 1981, Nucl. Acids Res., 9, 309-321. Specifiški oligonukleotidai sintetinami pagal nukleotidų sekas, gautas sekvenavimo metu.

Klonų pAF 2-3, pAF 2-6 ir pAF 2-7 pilna nukleotidų seka, įjungiant ir chromosominį fitazės geno lokusą, pateikta Fig.6, o lokuso schema - Fig.7.

Analizuojant ar gali pilna nukleotidų seka koduoti baltymą, buvo nustatyta, kad N-galo aminorūgščių liekanų seka suformuotoje baltymo molekulėje koduojama nukleotide sritimi, kuri yra 381 padėtyje (pagal Ullak duomenis, N-galas lokalizuotas 369 padėtyje). Taip pat nustatyta, kad vidinių peptidų fragmentų, kurių molekulinės masės 53 ir 2,5 kD (žiūr. Fig.1B, sekos B ir A), N-galo seka koduojama nukleotidų sekomis, kurios yra atitinkamai 1101 ir 1548 padėtyse. Atviras skaitymo rėmelis baigiasi 1713 padėtyje.

Šie rezultatai pilnai patvirtina, kad fitazę koduojanti DNR seka yra aprašytame aukščiau chromosominiame lokuse.

Nuskaitytoje sekoje, kuri yra prie atviro nuskaitymo rėmelio subrendusio baltymo sekos, 3' kryptimi nuo chromosominės nukleotidų sekos, kuri koduoja pilną fitazės molekulę, nesurastas startinis kodonas ATG. Tačiau, remiantis šalia esančios zonos tarp egzono ir introno savybėmis, galima postuliuoti, kad yra intronas tarp nukleotidų 254 ir 355. Galima laikyti, kad ATG kodonas yra 210 padėtyje sekos, kuri apima subrendusios fitazės kodavimą. Atkurta aminorūgščių liekanų seka iš nukleotidų sekos baltymo N-galo pilnai atitinka sekai, atsakingai už sekrecijos signalą, kurią nustatė von Heyne (Eur. J. Biochem., 1983, 133, 17-21).

Norint patvirtinti išsakytas hipotezes, buvo pabandyta išskirti fitazės kDNR amplifikacijos pagalba su specifiniu pradmeniu, naudojant kaip matricą bendros populiacijos iRNR/DNR. Procedūra aprašyta žemiau.

Poli-A+RNR išskyrimas iš *Aspergillus ficuum*

Bendra RNR buvo išskirta iš *A. ficuum* NRRL 3135 kamieno, kultivuojamo aktyvuojančioje terpėje, kaip aprašyta 6 pavyzdyje. Sausas micelis buvo užšaldomas skystame azote ir susmulkinamas. Po to milteliai buvo homogenizuojami homogenizatoriuje Ultra-Turrax 1 minutę, maksimaliu greičiu 3M LiCl ir 6M karbamido tirpale, 0° temperatūroje. Homogenizatas buvo paliekamas nakčiai 4° temperatūroje, kaip aprašyta Auffrey & Raugear (Eur. J. Biochem., 1980, 187, 303-314). Bendra ląstelinė RNR buvo gaunama po 30 minučių centrifugavimo, esant 16000 g, ir po dviejų, viena po

kitos einančių, ekstrakcijų fenolio, chloroformo ir izoamilio alkoholio mišiniu (50:48:2). RNR buvo išsodinama etilo alkoholiu ir praskiedžiama iki 1 ml 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu (pH 7,4) su 0,5 % natrio dodecilsulfato. Poli-A+RNR atrankai bendra RNR buvo pašildoma 60° temperatūroje 5 minutes ir užnešama ant oligo(dT)-celiuliozės. Po kelių perplovimų tirpalu, kuriame buvo 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) su 0,5 % natrio dodecilsulfato ir 0,1 M NaCl, poli-A+RNR buvo eliuuojama 10 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu, pH 7,4, su 0,5 % natrio dodecilsulfato.

Fitazės kDNR fragmentų klonavimas

kDNR sekos, koduojančios fitazę, buvo išskirtos dviem fragmentais grandininės polimerazinės reakcijos (GPR) pagalba. Pagal genomine fitazę koduojančią seką, parodytą Fig.6, buvo konstruojami oligonukleotidiniai pradmenys:

oligo 1: 5'-CGG TAG AAT TCA AAA ATG GGC GTC TCT GTC GTT CTA-3'

oligo 2: 5'-AGT GAC GAA TTC GTG CTG GTG GAG ATG GTG TCG-3'

oligo 3: 5'-GAG CAC CAA GCT GAA GGA TCC-3'

oligo 4: 5'-AAA CTG CAG GCG TTG GCT GTG ATT GTT TAA AGC C-3'

Oligo 1 seka yra 5'-kryptimi nuo startinio ATG kodono (padėtys 210-231) ir flankuojančiu per 5' ribą saitą EcoRI. Oligo 2 seka yra prie saito SaII 3'-kryptimi (padėtys 1229-1109) ir taip pat flankuota papildomu saitą EcoRI. Oligo 3 seka yra prie saito BamHI (padėtys 845-865). Oligo 4 seka yra nukleotidų seka 5'-kryptimi nuo fitazės stop kodono (padėtys 1890-1867) ir flankuota papildomai PsaI saitą.

Grandininė polimerazinė reakcija buvo vykdoma pagal Taq polimerazės gamintojų (Cetus) rekomendacijas. Kaip matrica fitazės N-galo sekos amplifikacijos reakcijoje buvo naudojamas aukščiau paminėtų iRNR/kDNR hibridų tirpalas (1,5 μ l), kaip pradmenys buvo naudojami oligo 1 ir oligo 2 (po 0,3 μ g kiekvieno), ir oligo 3 ir oligo 4 C-galo sekos tos pačios kDNR amplifikacijos reakcijoje (žiūr. Fig.3). Po 7 minučių denatūracijos 100° temperatūroje ir pridėjus 2 vientus Taq polimerazės, amplifikacijos reakcija buvo vykdoma 25 ciklus Perkin Elmer amplifikatoriuje (Cetus) (kiekvienas ciklas po 2 minn. 55°, 3 min. 72°, 1 min. 94° temperatūrose). Paskutiniame cikle denatūravimo stadija buvo praleidžiama. Po restrikcijos (EcoRI N-galo kDNR sekai ir BamHI ir PstI C-galo kDNR sekai) abu kDNR fragmentai buvo klonuojami į atitinkamus saitus plazmidėje pTZ18R (P. range).

Abiejų gautų nukleotidų fragmentų sekos buvo nustatomos didezoksi-grandžių nutraukimu (Sanger, supra), naudojant sintetinius oligonukleotidus, sukonstruotus pagal chromosominio fitazės geno seką. Šie oligonukleotidai buvo naudojami pradmenimis, matrica buvo amplifikuota kDNR. kDNR srities seka, koduojanti fitazę, ir pagal ją išvesta šio fermento aminorūgščių liekanų seka pateikta Fig.8.

kDNR analizė patvirtino esant intronus nusakytoje lokalizacijoje, ir parodyta, kad nėra chromosominėje geno sekoje kitų intronų. Fitazės genas koduoja pirminį trasliacijos produktą, kuris susideda iš 487 aminorūgščių liekanų, jo molekulinė masė 51091 D. Po pirminio produkto procesingo, kurio metu atskeliamas signalinis peptidas, susidaro subrendęs baltymas, pasižymintis fitazės aktyvumu, jo sudėtyje yra 444 aminorūgščių liekanos (įskaitant 4 pirmas liekanas, kurias minėjo Ullak), šiuo atveju molekulinė masė yra 49232 D.

9 pavyzdys

Fitazės superekspresija *Aspergillus* genties grybuose po papildomų genominių fitazės DNR sekų įterpimo

Ekspresijos vektoriaus konstravimas

Visi vektoriai buvo konstruojami, naudojant standartinius molekulinės biologijos metodus, kurie aprašyti laboratoriniame klonavimo vadove (Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982).

Ekspresijos vektorius pAF 2-2S buvo gaunamas, subklonuojant pvuII DNR fragmentą, kurio ilgis 6 kilobazės, iš genominio fitazės lambda-AF201 klono į SmaI saitą (Fig.9). Tokiu būdu gauta plazmidė buvo pažymėta pAF 2-2 (Fig.4). Selektyvumo markeriu transformacijoje į *Aspergillus* buvo naudojamas EcoRI/KpnI DNR fragmentas iš plazmidės pGU 325 (Wernars K., Thesis, Agr. Univ. Wageningen, Netherlands, 1986), kurioje yra homologinis amdS genas iš *Aspergillus nidulans*. Šis fragmentas buvo įterptas į EcoRI/KpnI saitą plazmidėje pAF 2-2. Tokiu būdu sukonstruotas ekspresijos vektorius buvo pažymėtas pAF 2-2S. Jis parodytas Fig.9.

A *A. ficuum* NRRL 3135 kamieno fitazės superekspresija

Plazmidė pAF 2-2S buvo įvedama į *A. ficuum* kamieno NRRL 3135 ląsteles transformacijos metodu, aprašytu Tilburn J. et al., (Gene, 1983, 26, 205-221) ir Kelly J. & Hynes M. (EMBO, J., 1985, 4, 457-479) su šiais pakeitimais:

- micelis buvo auginamas grybų *Aspergillus* minimalioje terpėje (Cove D., Biochem. Biophys. Acta, 1966, 113, 51-56), praturtintoje 10 mM arginino ir 10 mM prolino, 30° temperatūroje 16 valandų mikrobiologinėse kolbose, purtomose 300 apsisukimų per minutę dažniu.

- formuojant protoplastus, vietoj chelikazės buvo naudojama Novozym 234 (Novo Industry).

po 30 minučių po protoplastų susidarymo į suspensiją buvo įdedama 1 suspensijos tūris STC (1,2 M sorbitolo, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM CaCl₂) buferinio tirpalo ir centrifuguojama esant 2500 g 4° temperatūroje 10 minučių, po to protoplastai išplaunami ir suspenduojami STC buferiniame tirpale taip, kad ląstelių koncentracija būtų lygi 10⁸ ląstelių 1 ml.

- į 100 μl protoplastų suspensijos buvo pridedama plazmidinė DNR 10 μl TB buferinio tirpalo (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, ir 0,1 mM EDTA).

- po protoplastų suspensijos su DNR 25 minučių inkubacijos 0° temperatūroje lašinant buvo pridedama 200 μl polietilenglikolio tirpalo (25 % polietilenglikolis 4000, Merck) ir 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, su 50 mM CaCl₂). Po to, pastoviai maišant, lėtai pripilama dar 1 ml polietilenglikolio tirpalo (60 % polietilenglikolis 4000, ištirpintas 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, su 50 mM CaCl₂). Po inkubacijos kambario temperatūroje suspensija buvo praskiedžiama STC buferiniu tirpalu, sumaišoma purtant ir centrifuguojama 2000 g 4° temperatūroje 10 minučių. Protoplastai buvo atsargiai resuspenduoti 200 μl STC buferinio tirpalo ir užsluoksniuoti ant minimalios *Aspergillus* grybų auginimui terpės, kurioje papildomai buvo 20 mM acetamido, kaip vienintelio azoto šaltinio, 15 mM CsCl ir 1 M sacharozės; terpė buvo sukietinta 0,75 % bakteriologiniu agaru #1 (Oxoid). Auginama 35° temperatūroje 6-10 dienų.

Buvo atrinkti atskiri transformantai, pažymėti SP4, SP7 ir SP8, išvalyti ir buvo tikrinamas jų sugebėjimas sintetinti fitazę, auginant mikrobiologinėse kolbose, pagal 1 ir 2 pavyzdžiuose aprašytą metodiką. Analogiškos operacijos buvo atliekamos su

transformantais, kuriuose buvo tki vektorius (amdS genas plazmidėje pVC 19), arba su netransformuotais recipientais (kontroliniai bandymai).

Grybų kamienas buvo auginamas aktyvuojančiomis sąlygomis (žiūr. 6 pavyzdį), pavyzdžiai analizei buvo imamai po 96 valandų kultivavimo. Buvo analizuojamas fitazės aktyvumas (4 lentelė) ir vykdomas elektrofokusavimas poliakrilamidiniame gelyje.

4 lentelė

Produkcijos sustiprėjimas po kamieno transformacijos

Kamienas	Fitazės aktyvumas, v/ml
<i>A. ficuum</i>	0,6
<i>A. ficuum</i> + kontrolinė plazmidė	0,6
<i>A. ficuum</i> pAF 2-2S SP8	7,8
<i>A. ficuum</i> pAF 2-2S SP7	6,7
<i>A. ficuum</i> pAF 2-2S SP4	4,3

Mėginių, gautų auginant vienodomis sąlygomis *A. ficuum* ir *A. ficuum* pAF 2-2S kultūras, vienodi tūriai buvo analizuojami izofokusavimu poliakrilamidiniame gelyje (Phast System, Pharmacia) pH intervale nuo 4,5 iki 6,0. Elektroforezė buvo atliekama pagal gamintojo rekomendacijas. Gelis buvo dažomas Kumasii brilianto mėliu bendram baltymui (Fig.10B) arba dažu, selektyviu fosfataziniam aktyvumui, kaip aprašyta 2 pavyzdyje (Fig.10A).

Be to buvo naudojama fitazė iš *A. ficuum*, išgryninta iki homogeniškos imunoafinės chromatografijos pagalba, kaip aprašyta 7 pavyzdyje, viena arba mišinyje su kultūriniu skysčiu.

Kaip buvo pažymėta aukščiau, fitazė atskiruose mėginiuose būna įvairiose izoformose (pažymėtos žvaizdutėmis). Išgryninta fitazė, dažant abiem būdais, duoda gerai matomas juostas 3 ir 4, kurios atitinka dviems fitazės izoformoms (A ir B). Analogiškos juostos gaunamos, dažant fitazę, gautą iš tėvinio kamieno *A. ficuum*. Transformuotame kamiene pAF 2-2S SP7 jos yra intensyvesnės.

B. Fitazės superekspresija grybuose *A. niger* CBS 513.88

Ekspresijos vektorius pAF 2-2 buvo įterptas į ląsteles *A. niger* CBS 513.88, jas transformuojant, kaip aprašyta *A. ficuum* atveju. Transformantai buvo išskiriami, išvalomi ir buvo nustatomas jų sugebėjimas produkuoti fitazę, auginant mikrobiologinėse kolbose indukuojančiose sąlygose, kaip aprašyta 6 pavyzdyje. Ekspresijos lygis atskiruose

transformantuose, pažymėtuose pAF 2-2S #8, #20 ir #33, o taip pat kontroliniuose kamienuose buvo nustatomas, kaip aprašyta 9A pavyzdyje, duomenys pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė

Fitazės produkcija transformuotose su pAF 2-2S *A. niger* CBS 513.88 ląstelėse

Kamienas	Fitazės aktyvumas, v/ml
<i>A. niger</i>	0,2
<i>A. niger</i> + kontrolinė plazmidė	0,2
<i>A. niger</i> pAF 2-2S #8	14
<i>A. niger</i> pAF 2-2S #33	5
<i>A. niger</i> pAF 2-2S #20	4

Fitazės ekspresijos lygis transformuotose *A. niger* ląstelėse buvo panašus ekspresijos lygiui *A. ficuum* kamienuose. Be to, parodyta, kad *A. ficuum* fitazės promotorius yra aktyvus *A. niger* kamienuose.

Tolimesnė analizė buvo atliekama, naudojant transformuotų ląstelių pAF 2-2S #8 kamieno kultūrinį skystį elektroforezės ir izofokusavimo pH intervale nuo 4,5 iki 6,0 poliakrilamidiniame gelyje pagalba elektroforezės aparate (Phast System, Pharmacia) pagal aukščiau aprašytą metodiką. Vienodi supernatanto tūriai tėvinio kamieno *A. niger* ir transformuotų ląstelių pAF 2-2S #8, išaugintų vienodomis sąlygomis, buvo įdedami į gelį, kuris buvo dažomas po elektrofokusavimo, kaip aprašyta aukščiau.

Tėvinis kamienas *A. niger* sintetino labai nedidelį fitazės kiekį ir tokio kiekio nepasisekė aptikti elektroforezės pagalba. Kamienas pAF 2-2S #8 produkavo maždaug 90 kartų didesnį fermento kiekį, nei tėvinis kamienas. Šis skirtumas gerai matomas Fig.11.

Buvo nustatytos kelios fermento formos (pažymėta žvaizdutėmis). Dažant visus baltymus, buvo nustatyta, kad atitinkamų juostų intensyvumas labai padidėja, tuo tarpu kitų baltymų juostos neišryškėja.

10 pavyzdys

Fitazės ekspresija transformuotose ekspresijos vektoriais *A. niger* ląstelėse, kuriose yra fitazės genas iš *A. ficuum*, sujungtas su promotoriumi ir/arba signaline amilogliukozidazės (AG) seka iš *A. niger*

Ekspresijos vektorių konstravimas

Norint pasiekti fitazės superekspresiją *A. niger* ląstelėse, buvo sukonstruoti papildomi ekspresijos blokai, kuriuose fitazės iš *A. ficuum* genas kontroliuojamas amilogliukozidazės (AG) promotoriumi iš *A. niger* deriniuose su skirtingomis signalinėmis sekomis. Plazmidėse p18FYT3 ir p24FYT3 yra atitinkamai 18 ir 24 aminorūgščių liekanos geno AG iš *A. niger* lyderinės sekos, sujungtos su fitazės geno fragmentu, kuris koduoja subrendusį baltymą. Ekspresijos vektoriuje pFYT3 promotoriaus AG seka sujungta su seka, koduojančia fitazę, kurioje yra limituojanti šio baltymo biosintezę seka.

p18FYT3 konstravimas

Promotoriaus AG sujungimas su 18 aa AG-lyderine seka su seka, koduojančia pilnai suformuotą fitazę, buvo atliekamas grandininės polimerazinės reakcijos pagalba. Buvo naudojamos dvi skirtingos matricos: pAF 2-2S, kurioje yra, kaip aukščiau minėta, pilnas fitazės genas, ir pABC-1-plazmidė, kurioje yra pilnas AG lokusas iš *A. niger*, išskirtoje iš *A. niger* plazmidinės bibliotekos, kurioje yra HindII fragmentai, kurių ilgis 13-15 kilobazių, plazmidėje pVC19. Išskyrimui buvo naudojami AG specifiniai oligonukleotidai:

AG-1 5'-GAC ATT GGC TAC ACC AGC ACC GCA ACG GAC ATT GTT TCC CCC-3'
 AG-2 5'-AAC CAG CCA TTG CCC GAA GCC GAT-3'

Abu oligonukleotidai buvo gauti pagal *A. niger* nukleotidų seką (Boel et al., 1984, EMBO J., 3, 1097-1102; Boel et al., 1984, Mol. & Cell. Biol., 4, 1306-1315). Oligonukleotidiniai zondai buvo konstruojami remiantis seka, kuri yra aplink introną 2: oligo AG-1 lokalizuotas 3'-kryptimi introno atžvilgiu ir turi tokį patį poliariškumą, kaip ir AG iRNR, o oligo AG-2 yra 5'-kryptimi nuo introno 2 ir yra antilygiagretus AG iRNR. Plazmidėje pAB 6-1 yra AG genas HindIII fragmente, kurio ilgis yra 14,5 kilobazių.

Kaip amplifikacijos pradmenys buvo naudojami keturi sintetiniai oligonukleotidai tokios struktūros:

Oligo 1 5'-CTC TGC AGG AAT TCA AGG TAC-3' (AG specifinė seka aplink EcoRI saitą, apytikriai 250 kilobazių 3'-kryptimi nuo ATG-startinio kodono)
 Oligo 18-2 5'-CGA GGC CGG GAC TGC CAG TGC CAA CCC TGT GCA GAC-3' subrendusi fitazė 18 AA AG-lyderinė seka
 Oligo 18-3 5'-GTC TGC ACA GGG TTG GCA CTG GCA GTC CCC GCC TCG-3' 18 aa AG -lyderinė seka - subrendusi fitazė
 Oligo 4 5'-GGC ACG AGG ATC CTT CAG CTT-3' (specifinė fitazei seka,

lokalizuota BamHI saite 861 padėtyje)

Grandininė polimerazinė reakcija buvo vykdoma pagal Saiki et al. metodiką (1988, Science, 239, 487-491) su nedideliais pakeitimais (žiūr. 8 pavyzdį).

Sujungimui AG sekos su fitazę koduojančia seka buvo atliekamos dvi atskiros grandininės polimerazinės reakcijos. Pirmojoje - amplifikacijai DNR fragmentui, kurio ilgis 300 bazių porų, kuriame yra 3' AG sritis - promotoriaus ir 18 aa AG lyderinė seka, flankuota 3' gale fitazės geno nukleotidais, pradmenimis buvo naudojami oligonukleotidai 1 ir 18-2, kaip matrica buvo naudojama pAB 6-1. Antrojoje reakcijoje buvo naudojama matrica pAF 2-2 ir oligonukleotidai 18-3 ir 4 kaip pradmenys, amplifikuojant DNR fragmentą, kurio ilgis 600 bazių porų, ir kuriame yra fitazės geno 5'-sritis, flankuota 5' gale 18 signalinio peptido AG nukleotidų. Amplifikacijos procedūra schematiškai pavaizduota Fig.13.

Tokiu būdu gauti DNR fragmentai buvo valomi elektroforezės poliakrilamidiniame gelyje pagalba, išsodinama etanoliu, o po to jie buvo naudojami kaip matricos trečiojoje grandininėje polimerazinėje reakcijoje su oligonukleotidais 1 ir 4, kaip pradmenimis, sujungiant AG-fitazės sekas. Susidaręs DNR fragmentas buvo skaldomas EcoRI ir BamHI ir subklonuojamas į plazmidę pTZ18R. Gautas kompleksas buvo sekvenuojamas ir pažymėtas p18FYT1.

Kita AG promotoriaus seka, einanti 3'-kryptimi, kurios ilgis 3,5 kilobazių, buvo gauta, skaldant plazmidę pAB 6-1 KpnI ir dalinai EcoRI, po to sujungta su EcoRI/BamHI fragmentu iš plazmidės p18FYT1, kurio ilgis 1,1 kilobazės, ir klonuotas į KpnI/BamHI saitus plazmidėje pTZ18R. Tokiu būdu gauta plazmidė pavaizduota Fig.15. Papildomas HindII saitas buvo įterpiamas, įvedant sintetinį fragmentą:

5'-	AAT TCA AGT TTG	3'
3'-	GT TCG AAC TTA A	5'

į EcoRI saitą, kuris flankuoja amdS geną plazmidėje pAF 2-2S. Tokiu būdu gauta plazmidė buvo pažymėta pAF 2-2S (Fig.14) ir ji buvo naudojama pradine plazmide, pakeičiant fitazės promotoriaus seką DNR fragmentais, gautais polimerazinės grandininės reakcijos pagalba sulietomis AG ir fitazės sekomis.

Paskutiniame konstravimo etape plazmidės p18FYT2 ir pAF 2-2S buvo skaldomos KpnI ir dalinai BamHI. Plazmidės p18FYT2 DNR fragmentas, kurio ilgis 4,6 kilobazių, ir

plazmidės pAF 2-2S fragmentas, kurio ilgis 11 kilobazių, po išskyrimo buvo valomi elektroforezės pagalba, po to buvo liguojami ir pernešti į *E. coli*. Tokiu būdu gautas ekspresijos vektorius buvo pavadintas p18FYT3 (Fig.15).

Plazmidės p24FYT3 konstravimas

Promotoriaus ir 24 aa AG lyderinės sekos su seka, koduojančia subrendusį fitazės baltymą, sujungimas buvo vykdomas polimerazinės grandininės reakcijos pagalba pagal metodiką aprašytą aukščiau, konstruojant plazmidę p18FYT3, su tuo skirtumu, kad pradmenimis buvo naudojami kiti oligonukleotidai:

Oligo 24-2: 5'- CGA GCC CGG GAC TGC CAG GCG CTT GGA AAT CAC ATT-3';
subrendusi fitazė; 24 aa AG - lyderinė seka

Oligo 24-3: 5'-AAT GTG ATT TCC AAG CCC CTG GCA GTC CCC CCC TGC-3';
24 aa AG - lyderinė seka - subrendusi fitazė

Buvo vykdomos dvi skirtingos polimerazinės reakcijos. Pirmosios reakcijos metu buvo naudojama matrica pAB 6-1, o oligonukleotidai 1 ir 24-2 naudojami kaip pradmenys, amplifikuojant DNR fragmentą, kurio ilgis 313 bazių porų, kuriame yra promotoriaus AG 3'-sritis ir 24 aa AG lyderinė seka, flankuota 3'-gale fitazės geno 18 nukleotidų. Antrojoje reakcijoje matrica buvo naudojama plazmidė pAF 2-2S, o nukleotidai 24-3 ir 4 naudojami kaip pradmenys, amplifikuojant DNR fragmentą, kuriama fitazės geno 5'-sritis, flankuota 5'-gale 18 nukleotidų 24 aa AG lyderinės sekos. Amplifikacijos procedūra schematiškai pavaizduota Fig.13.

Ekspresijos vektoriaus p24FYT3 galutiniame konstravimo etape, naudojant plazmidės p25FYT1 ir p24FYT3, buvo klonuojama ta pačia klonavimo metodika, kaip aprašyta konstruojant vektorių p18FYT3 per tarpines p18FYT1 ir p18FYT2 konstravimo stadijas (Fig.15).

Plazmidės pFYT3 konstravimas

Sujungimas AG-promotoriaus su fitazės geno seka, kuriame yra lyderinė seka, buvo atliekamas amplifikacijos grandininės polimerazinės reakcijos pagalba, kaip aprašyta aukščiau, konstruojant plazmidę p18FYT3, tik su tuo skirtumu, kad buvo naudojami šie oligonukleotidai:

Oligo fyt2: 5'- AAC AGC AGA GAC GCC CAT TGC TGA GTT GTA ATG ATG-3';
lyderinė seka, AG-promotorius

Oligo fyt3: 5'- CAT CAT TAC ACC TCA GCA ATG GGC CTC TCT GCT GTT-3';
AG-promotorius, lyderinė seka

Buvo atliekamos dvi atskiros grandininės polimerazinės reakcijos. Pirmojoje reakcijoje matrica buvo naudojama plazmidė pAB 6-1, o nukleotidai 1 ir fyt2 naudojami kaip pradmenys, amplifikuojant DNR fragmentą, kurio ilgis 282 bazių poros, kuriame yra promotoriaus AG 3'-sritis, flankuota 3'-gale 18 nukleotidų iš lyderinės fitazės sekos. Antrosios reakcijos metu buvo naudojama matrica pAF 2-2S, o oligonukleotidai fyt2 ir 4 naudojami kaip pradmenys, amplifikuojant DNR fragmentą, kuriame yra fitazės 5'-geno 5'-sritis (su lyderine seka) ir flankuota 5'-gale 18 AG-promotoriaus nukleotidais. Amplifikacijos procedūra schematiškai pavaizduota Fig.13.

Ekspresijos vektoriaus pFYT3 galutiniame konstravimo etape per tarpines plazmides pFYT1 ir pFYT2 buvo klonuojama ta pačia klonavimo metodika, kaip aprašyta konstruojant vektorių p18FYT3 per tarpines p18FYT1 ir p18FYT2 konstravimo stadijas (Fig.15)

Fitazės, kontroliuojamos AG promotoriumi, ekspresija *A. niger* grybuose

Iš aprašytų aukščiau fitazės ekspresijos blokų, skaldant HindIII, buvo pašalinamos *E. coli* sekos. Po to *A. niger* kamienas CBS 513.88 (atiduotas saugojimui 1988 m. spalio 10 d.) buvo transformuojamas 10 µg DNR fragmentu tokiu pat būdu, kaip 9 pavyzdyje. Iš kiekvieno ekspresijos bloko buvo išskirti individualūs *A. niger* transformantai. Grybų sporos buvo pasėjamos ant selektyvių acetamid-agarinių plokštelių. Kiekvieno transformanto sporos buvo surenkamos po 3 dienų auginimo agarizuotose lėkštelėse, esant 0,4 % bulvių dekstrozės (Oxoid, England) 37° temperatūroje. Fitazės produkcija buvo įvertinama, auginant grybus mikrobiologinėse kolbose šiomis sąlygomis.

Apytikriai 10^8 sporų buvo įdedama į 100 ml pradinės terpės, kurioje yra: 1 g/l K_2HPO_4 , 30 g/l maltozės, 5 g/l mielių ekstrakto, 10 g/l kazeino hidrolizato, 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ir 3 g/l Tween 80. pH buvo nustatomas 5.5.

Po kultivavimo per naktį mikrobiologinėse kolbose 34° temperatūroje, 1 ml augančios kultūros buvo pridedamas į 100 ml pagrindinės terpės: 2 g/l K_2HPO_4 , 70 g/l maltodekstrino (Maldex MDO₃ Amylum), 12,5 g/l mielių ekstrakto, 25 g/l kazeino hidrolizato, 2 g/l K_2SO_4 , 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/l $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ir $FeSO_4$. Mišinio pH nureguliuojamas 5,6.

Micelis buvo auginamas ne mažiau 140 valandų. Fitazės produkcija buvo įvertinama pagal 2 pavyzdyje aprašytą būdą. Šio įvertinimo rezultatai, atsitiktinai pasirinkus transformantus iš kiekvieno ekspresijos bloko, pateikti 6 lentelėje.

6 lentelė

Fitazės produkcija kai kuriuose *A. niger* CBS 513.88 kamienuose, transformuotuose plazmidėmis, kuriose yra fitazės iš *A. ficuum* genas, kontroliuojamas AG promotoriumi iš *A. niger* su įvairiomis lyderinėmis sekomis

Ekspresijos vektorius	Transformantas	Fitazės aktyvumas, v/ml
p18FYT3 (AG-promotorius/18 aa AG-lyderinė seka)	p18FYT3#240	82
	p18FYT3#242	84
	p18FYT3#243	62
	p18FYT3#244	43
	p18FYT3#245	80
	p18FYT3#246	82
	p18FYT3#250	110
p24FYT3 (AG-promotorius/24 aa AG-lyderinė seka)	p18FYT3#256	8
	p24FYT3#257	30
	p24FYT3#258	13
	p24FYT3#259	33
	p24FYT3#260	17
	p24FYT3#261	28
	p24FYT3#262	18
pFYT3 (AG-promotorius/fitazės lyderinė seka)	p24FYT3#265	12
	pFYT3#205	50
	pFYT3#282	280
	pFYT3#299	96
	pFYT3#302	220
	pFYT3#303	175
	pFYT3#304	150
	pFYT3#305	150
	pFYT3#312	140

Šie duomenys įtikinamai patvirtina didelį fitazės ekspresijos lygį transformuotose *A. niger* ląstelėse, kuriose fitazės genas kontroliuojamas AG-promotoriumi iš *A. niger*. Taip pat šie duomenys demonstruoja, kad fitazės maksimali ekspresija pasiekama, kai naudojamas pFYT3 ekspresijos vektorius, kuriame yra lyderinė fitazės seka. Naudojant panašius ekspresijos vektorius, kuriuose yra fitazės genas be intronų (po transformacijos į *A. niger*), ekspresijos lygis buvo panašus, kaip ir *A. niger* grybuose, transformuotuose plazmide.

Papildomai ląstelių, transformuotų pFYT3#205 ir #282, kultūros supernatantas buvo analizuojamas izofokusavimu poliakrilamidiniame gelyje pH intervale nuo 4,5 iki 6,0. Vienodi supernatantų kiekiai tėvinės *A. niger* grybų kultūros ir abiejų transformantų, išaugintų vienodomis sąlygomis, buvo pridedami į gelį ir po izofokusavimo gelis buvo dažomas, kaip aprašyta 9 pavyzdyje. Tėvinis *A. niger* kamienas sintetino nedidelį fitazės kiekį. Kamienai pFYT3#205 ir #282 sintetino atitinkamai 250 ir 1400 kartų daugiau fitazės, nei tėvinis kamienas (palyginkite fitazės produkciją su tėviniu kamieniu ir fitazės produkciją pagal 4 ir 5 lentelėse pateiktais duomenimis). Šis skirtumas gerai iliustruojamas Fig.11. Identifikuotos kelios fitazės izoformos (pažymėtos žvaigždutėmis). Dažant bendrą baltymą, atsirasdavo labai intensyvios fitazės juostos, tačiau kitų baltymų juostos neišryškėdavo.

11 pavyzdys

Fitazės iš *A. ficuum* ir *A. niger* superekspresija, kultivuojant gamybinėmis sąlygomis

A. A. ficuum

A. ficuum kamienai pAF 2-2S#4 ir NRRL 3135 buvo kultivuojami taip, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Abu transformuotų ląstelių tipai sintetino 50 kartų daugiau fitazės, nei laukinio to paties grybo kamienas.

7 lentelė

Fitazės superekspresija transformuotose *A. ficuum* ląstelėse, kuriose yra pasikartojantis fitazės genas. Ląstelės buvo kultivuojamos pagal 1 pavyzdį

Auginimo laikas, val	Fitazės aktyvumas, v/ml kultūrinio skysčio	
	<i>A. ficuum</i> NRRL 3135	<i>A. ficuum</i> pAF 2-2S#4
0	0	0
24	0	0
92	2	142
141	5	270

B. A. niger

A. niger kamienas pAF 2-2S#8, gautas transformuojant *A. niger* CBS 513.88 kamieną, ir tėvinis *A. niger* kamienas buvo kultivuojami taip, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Transformuotos ląstelės sintetino apytikriai 1000 kartų daugiau fitazės, nei pradinis tėvinis kamienas.

8 lentelė

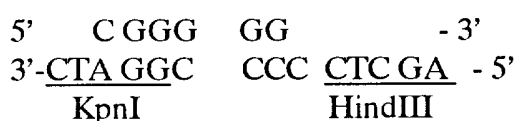
Fitazės superekspresija transformuotose *A. niger* ląstelėse (CBS 513.88), kuriose yra pasikartojantis fitazės genas. Ląstelės buvo kultivuojamos pagal 1 pavyzdį

Auginimo laikas, val.	Fitazės aktyvumas, v/ml kultūrinio skysčio	
	<i>A. niger</i> CBS 513.88	<i>A. niger</i> pAF 2-2S#8
0	0	0
24	0	0
92	0,1	65
141	0,1	95

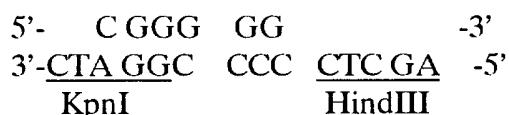
12 pavyzdys

Konstruojant pREPFYT3 vektorių, kuriuo buvo pasiekama fitazės ekspresija ir geno AG pakeitimas, plazmidė buvo skaldoma KpnI. Gautas linijinis fragmentas buvo panaudotas ligavimui dviem atvejais.

1 ligavimas, naudojant adapterį KpnI - HindIII



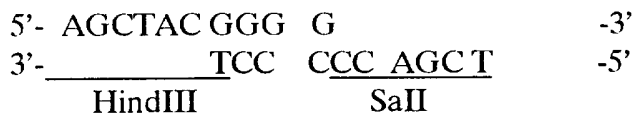
2 ligavimas, naudojant adapterį KpnI - HindIII*, kuriame HindIII restrikcijos vieta neišlieka po ligavimo:



Seka, gauta liguojant 1 būdu, dalinai buvo suskaldoma HindIII pagalba. Po fragmento, kuriame yra amdS genas, pašalinimo elektroforezės pagalba, likęs DNR fragmentas buvo ciklizuojamas liguojant ir įterptas į *E. coli*. Tokiu būdu gauta plazmidė buvo pažymėta pFYT amdS (žiūr. Fig.16).

Seka, gauta liguojant 2 būdu, taip pat buvo suskaldoma HindIII pagalba. DNR fragmentas HindIII/HindIII*, kurio ilgis 4 kilobazės ir kuriame yra amgS genas, buvo išskirtas elektroforezės pagalba ir liguojamas su dalinai suskaldyta HindIII plazmide HindIII/HindIII*, po to buvo įterptas į *E. coli*. Plazmidė, kurioje 3'-gale fitazės geno buvo amdS genas, buvo pažymėta pFYT3 INT (žiūr. Fig.17).

Norint įterpti DNR fragmentą SaII/HindIII iš plazmidės pAB 6-1, kurio ilgis 6 kilobazės ir kuriame yra 3'-flankuojanti AG sritis, plazmidė pFYT3INT buvo dalinai suskaldoma HindIII pagalba ir prijungiama prie adapterio:



(kuriame HindIII* skėlimo vieta neišlieka po ligavimo), o po to su plazmidės pAB 6-1 fragmentu SaI/HindIII). Po transformacijos į *E. coli* buvo gaunama tikslinė plazmidė pREPFYT3, kurioje yra 3'-flankuojanti AG seka reikalingoje vietoje.

Fitazės ekspresija *A. niger* grybuose, pakeitus geną AG

Prieš *A. niger* transformaciją pREPFYT3 plazmide, iš šios plazmidės buvo pašalinta *E. coli* seka (skaldant HindIII ir išskiriant elektroforezės pagalba). *A. niger* kamienas CBS 513.88 buvo transformuojamas 10 µg DNR fragmento, panaudojant procedūrą, aprašytą 9 pavyzdyje. Tik dalis (apytikriai 20 %) iš atrinktų transformantų neturėji AG aktyvumo. Chromosominės DNR hibridizacijos analizė AG teigiamuose ir neigiamuose pagal fitazę transformantuose buvo naudojama AG geno pakeitimo kontrolei.

13 pavyzdys

Fitazės geno konservatyvumas įvairiose mikroorganizmų rūšyse

Norint išsiaiškinti fitazės geno konservatyvumą mikroorganizmuose, buvo atliekama dešimties rūšių mikroorganizmų chromosominės DNR hibridizacija, naudojant zondą *A. ficuum* fitazės kDNR.

Chromosominės DNR buvo išskiriamos iš siūlinių grybų, mielių ir bakterijų. Iš kiekvienos mikroorganizmų grupės buvo atrenkama ribotas rūšių skaičius, konkrečiai: siūliniai grybai: *Penicillium chrysogenum* ir *Aspergillus niger*, mielės prokariotų formos, kaip: *Bacillus subtilis*, *Clostridium thermocellum*, *Streptomyces lividans* ir gramm-neigiamos bakterijos *Pseudomonas aeruginosa*.

Šių rūšių mikroorganizmų didelės molekulinės masės chromosominė DNR buvo skaldoma pvuII ir BamHI (atskirai) ir analizuojama elektroforeze 0,7 % agarozės gelyje.

Po perkėlimo ant nitroceliuliozinių membranų buvo vykdoma hibridizacija nelimituojančiomis sąlygomis (6x SSC 50° temperatūroje per naktį) su žymėtu ³²P fitazės

5' kDNR fragmentu (kaip aprašyta 8 pavyzdyje). Kompleksai buvo perplaunami 6xSSC kambario temperatūroje ir 18 valandų buvo ryškinama autoradiograma.

Kaip parodyta Fig.19a ir 19b, praktiškai kiekvienoje autoradiogramoje yra matomos diskretiškos juostos, įrodančios didelį fitazės geno homologijos laipsnį įvairiuose mikroorganizmuose.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Išgryninta išskirta DNR seka, besiskirianti tuo, kad ji koduoja peptidą arba baltymą, pasižyminčius dideliu fitaziniu aktyvumu.

2. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji išskirta iš mikroorganizmų.

3. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra išskirta iš grybų.

4. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra išskirta iš *Aspergillus*.

5. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra išskirta iš *Aspergillus ficuum* arba *Aspergillus niger*.

6. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji koduoja fitazę, pasižyminčią tokiomis savybėmis:

a) vykdant elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu, ji duoda vieną juostą, atitinkančią baltymą, kurio molekulinė masė yra 85 kD (ekspresuojant *Aspergillus* ląstelėse);

b) po deglikozilinimo molekulinė masė yra nuo 48 iki 56,5 kD;

c) jos santykinis aktyvumas yra apie 100 v/mg baltymo.

7. Išgryninta išskirta DNR seka pagal 1 punktą, besiskirianti tuo, kad ji pasižymi bent viena iš šių savybių:

a) hibridizuojasi su oligonukleotidiniu zonu, gautu pagal DNR seką, pateiktą Fig.6, o Fig.6 yra šios apibrėžties dalis;

b) hibridizuojasi su oligonukleotidiniu zonu, gautu pagal DNR seką, pateiktą Fig.8, o Fig.8 yra šios apibrėžties dalis.

8. Ekspresijos vektorius, besiskiriantis tuo, kad DNR seka pagal 1-7 punktus yra funkciškai surišta su reguliacine sritimi, kuri gali reguliuoti baltymo arba peptido, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, ekspresiją atitinkamame šeimininke.

9. Ekspresijos vektorius pagal 8 punktą, besiskiriantis tuo, kad jo reguliacijos srityje yra lyderinė seka, kuri užtikrina baltymo arba peptido, pasižyminčio fitaziniu aktyvumu, sekreciją.

10. Ekspresijos vektorius pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido su fitaziniu aktyvumu ekspresijos reguliavimas vyksta, naudojant AG promotorių.

11. Ekspresijos vektorius pagal 10 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama homologinė fitazės lyderinė seka.

12. Ekspresijos vektorius pagal 10 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama lyderinė AG seka, kuri sudaryta iš 18 aminorūgščių liekanų.

13. Ekspresijos vektorius pagal 10 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama lyderinė AG seka, kuri sudaryta iš 24 aminorūgščių liekanų.

14. Ekspresijos vektorius pagal 9 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, kurie pasižymi fitaziniu aktyvumu, ekspresijos reguliavimui naudojamas homologinis fitazės promotorius.

15. Ekspresijos vektorius pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama homologinė fitazės lyderinė seka.

16. Ekspresijos vektorius pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama homologinė lyderinė seka AG, kuri yra sudaryta iš 18 aminorūgščių liekanų.

17. Ekspresijos vektorius pagal 14 punktą, besiskiriantis tuo, kad baltymo arba peptido, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, sekrecijai naudojama homologinė lyderinė seka AG, kuri yra sudaryta iš 24 aminorūgščių liekanų.

18. Vektorius, sugebantis transformuoti ląstelę-šeimininką, besiskiriantis tuo, kad jame yra ekspresijos blokas pagal 8-17 punktus.

19. Vektorius pagal 18 punktą, besiskiriantis tuo, kad jis yra plazmidė.

20. Vektorius pagal 18 punktą, besiskiriantis tuo, kad yra naudojama plazmidė iš grupės, kurioje yra plazmidės pAF 28-1, pAF 2-2S, pAF 2-2, pAF 2-3, pAF 2-4, pAF 2-6, pAF 2-7, p18FYT3, p24FYT3, pFYT3.

21. Transformuota ląstelė-šeimininkas, besiskirianti tuo, kad ji transformuojama vektoriumi pagal 18-20 punktus.

22. Transformuota ląstelė-šeimininkas pagal 21 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra mikroorganizmas, toks kaip bakterijos, mielės ir grybai.

23. Transformuota ląstelė-šeimininkas pagal 22 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra iš šių mikroorganizmų genčių: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Bacillus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*.

24. Transformuota ląstelė-šeimininkas pagal 22 punktą, besiskirianti tuo, kad ji yra iš šių mikroorganizmų rūšių: *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Mucor miehei*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*.

25. Peptido arba baltymo, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad transformuotos ląstelės-šeimininkai pagal 21-24 punktus kultivuojamos sąlygose, kurios aktyvuoja peptido arba baltymo, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, susidarymą.

26. Peptidas arba baltymas, pasižymintis fitaziniu aktyvumu, besiskiriantis tuo, kad fitazinis aktyvumas formuojamas procese pagal 25 punktą.

27. Išgryninta fitazė, besiskirianti tuo, kad ji turi šias savybes:

a) elektroforezėje poliakrilamidiniame gelyje su natrio dodecilsulfatu yra viena juosta, atitinkanti baltymą, kurio molekulinė masė yra 85 kD (ekspresijos *Aspergillus atveju*);

b) po deglikozilinimo jos molekulinė masė yra nuo 48 iki 56,5 kD;

c) jos santykinis aktyvumas yra 100 v/mg baltymo.

28. Gyvūnų pašarai, besiskiriantys tuo, kad juose yra pasižyminčio fitaziniu aktyvumu peptido arba baltymo pagal 26 ir 27 punktą.

29. Peptido arba baltymo, pasižyminčių fitaziniu aktyvumu, pagal 26 ir 27 punktą panaudojimas fitato skaldymui į inozitolą ir neorganinį fosforą.

30. Gyvūnų augimo stimuliavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad gyvūnų racione yra pašarai su fitazės priedais pagal 26 ir 27 punktą.

31. Fitato kiekio sumažinimo gyvūnų mėšle būdas, besiskiriantis tuo, kad gyvūnų racione yra pašarai pagal 26 ir 27 punktą, kuriuose yra fitazės kiekis, pakankamas pašaruose esančio fitato suskaldymui į inozitolą ir neorganinį fosforą.

Amino rūgščių liekanų sekos iš N galo.
padėtis

	A	B	C
01			LEU
02			ALA
03			VAL
04			PRO
05		ALA	ALA
06		SER	SER
07		---	ARG
08	----**	---	ASN
09	GLN	GLN	GLN
10	SER	SER	SER
11	SER	SER	SER
12	---	---	GLY
13	ASP	ASP	ASP
14	THR	THR	THR
15	VAL	VAL	VAL
16	ASP	ASP	ASP
17	GLN	GLN	
18		GLY	
19		TYR	
20		GLN	
21		ARG	
22		PHE	
23		SER	
24		GLU	
25		THR	
26		SER	
27		HIS	
28		LEU	
29		ARG	
30		(GLY)*	
31		GLN	
32		TYR	
33		ALA	
34		PRO	
35		PHE	
36		PHE	
37		(ASP)	
38		LEU	
39		ALA	

Fig.1a

Peptidų amino rūgščių liekanų sekos.

	A	B	C	D	E
padėtis					
01	GLN	(TRP)*	MET	ALA	VAL
02	----**	SER	MET	SER	VAL
03	GLN	PHE	GLN	SER	ASP
04	ALA	ASP	CYS	ALA	----
05	GLU	THR	GLN	GLU	ARG
06	GLN	ILE	ALA	LYS	PHE
07	GLU	SER	GLU	GLY	PRO
08	PRO	THR	GLN	TYR	TYR
09	LEU	SER	GLU	ASP	THR
10	VAL	THR	PRO	LEU	GLY
11	(ARG)	VAL	LEU	VAL	----
12	VAL	ASP	VAL	VAL	ALA
13	LEU	THR	ARG		
14	VAL	LYS	VAL		
15	ASN	LEU	LEU		
16	(ASP)	SER	VAL		
17	(ARG)	PRO	ASN		
18	(VAL)	PHE	ASP		
19	VAL	(CYS)	ARG		
20	PRO	(ASP)			
21		LEU			
22		PHE			
23		THR			

Fig.1b

100 kD baltymo amino rūgščių seka N gale.

padėtis

01	VAL
02	VAL
03	ASP
04	GLU
05	ARG
06	PHE
07	PRO
08	TYR
09	THR
10	GLY

Fig.1c

[illegible]

Fig.2a (1lapas iš 2)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
peptidas A: (Gln- ? -Gln-Ala-Glu-Gln-Glu-Pro-Leu-Val-(Ser/Arg)-Val-Leu-Val-(Asp/Asn)
CAG-??-CAG-GCG-GAG-CAG-GAG-CCG-CTG-GTG-(TCG/CGG)-GTG-CTG-GTG-(GAT/AAT)
A A A A A A A A A A A A A A C
T T T T T T T T T T T T T T
C C C C C C C C C C C C C C
TTG AGT AGG TTG A
A C

AB1295: 3'-GTC.CGC.CTC.GTC.CTC.GGG.GAG.CA-5'
T G T T T C A C

16 17 18 19 20 21 22
-Asp/Thr/Arg-(Arg/Val)-Val-Pro-(Pro)-Met-Gly

-GAT/ACG/CGG-(CGG/GTG)-GTG-CCG-(CCG)-ATG-GGG
C A A A A A A A A A
T T T T T T T T T T
C C C C C C C C C C
AGG AGG
A A

Fig.2b (1lapas iš 2)

Peptidas B: (Trp)-Ser-Phe-Asp-Thr-Ile-Ser-Thr-Ser-Thr-Val-Asp-Thr-Lys-Leu-Ser-Pro-Phe-

(TGG)-TCG-TTT-GAT-ACG-ATA-TCG-ACG-TCG-ACG-GTG-GAT-ACG-AAG-CTG-TCG-CCG-TTT-
 A C C A T A A A A C A A A C
 T T C T T T T T T T T T
 C C C C C C C C C C
 AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT
 C C C C C C C C C C
 TTG AGT A C

AB1296 : 3'-AAG. CTG. TGC. TAG. AGG. TGG. AGG. TGG. CAC. CTG. TGC. TTC-5'

TCC C TCC C

AB1297: 3'-GGC.AAG.
 G.

19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
 (Cys)-(Asp)-Leu-Phe-Thr-(Thr)-(Asp)-(Glu)-(Cys)-(Ile)-(Thr/Asn)-(Tyr)-(Arg/Gly)-(Tyr)-Leu

(GTG)-(GAT)-CTG-TTT-ACG-(ACG)-(GAT)-GAG)-(TGT)-(ATA)-(ACG/AAT)-(TAT)-(CGG/GGG)-(TAT)-CTG
 C C A C A A C A C T A C A A C A
 T T T T T T T T T T T T T T T T
 C C C C C C C C C C C C C C C C
 TTG TTG AGG TTG A A
 A A

(ACG). (CTG). GAG. AAG. TGC. (TGC). (CTG). (CTC). (ACG). (TAG). (T)-5'
 C G G

Fig.2b (2 lapas is 2)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
Phe-Ser-Tyr-Gly-Ala-Ala-Ile-Pro-Gln-Ser-Thr-Gln-Glu-Lys-Gln-Phe-Ser-Gln-Glu-Phe-Arg-Asp-Gly

5'-TTT-TCG-TAT-GGG-GCG-GCG ATA-CCG-CAG-TCG-ACG-CAG-GAG-AAG-CAG-TTT-TCG-CAG-GAG-TTT-CGG-GAT-GGG-
C A C A A A A T A A A A A A C A A A C A C A
T T T T T T C T T T T T T T T T T T T T T T
C
AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT
C C

AB1025: 3'-ATG-CCG-CCG-CCG-TAG-GGG-GTC-TCG-TGG-GTC-CTC-TTC-GTC-AAG-TCG-GTC-CTC-AAG-GC-5'
AB1026: 3'-GTC-CTC-TTC-GTC-AAG-TCG-GTC-CTC-AAG-GC-5'
T T AGA AGA T C

AB1027: 3'-ATG-CCG-CCG-CCG-TAA-GGC-GTC-5'
A T T G G
A A
G G

Fig.3

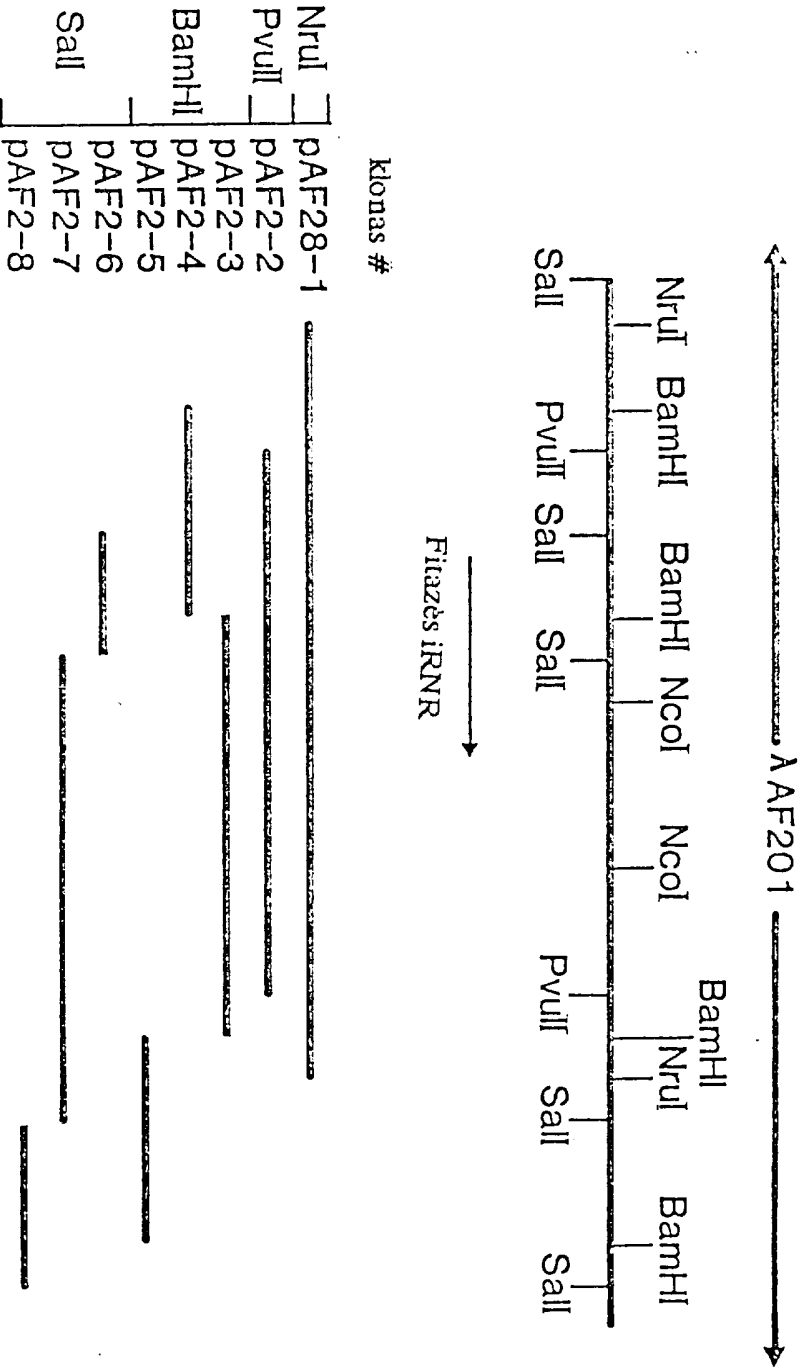


Fig.4

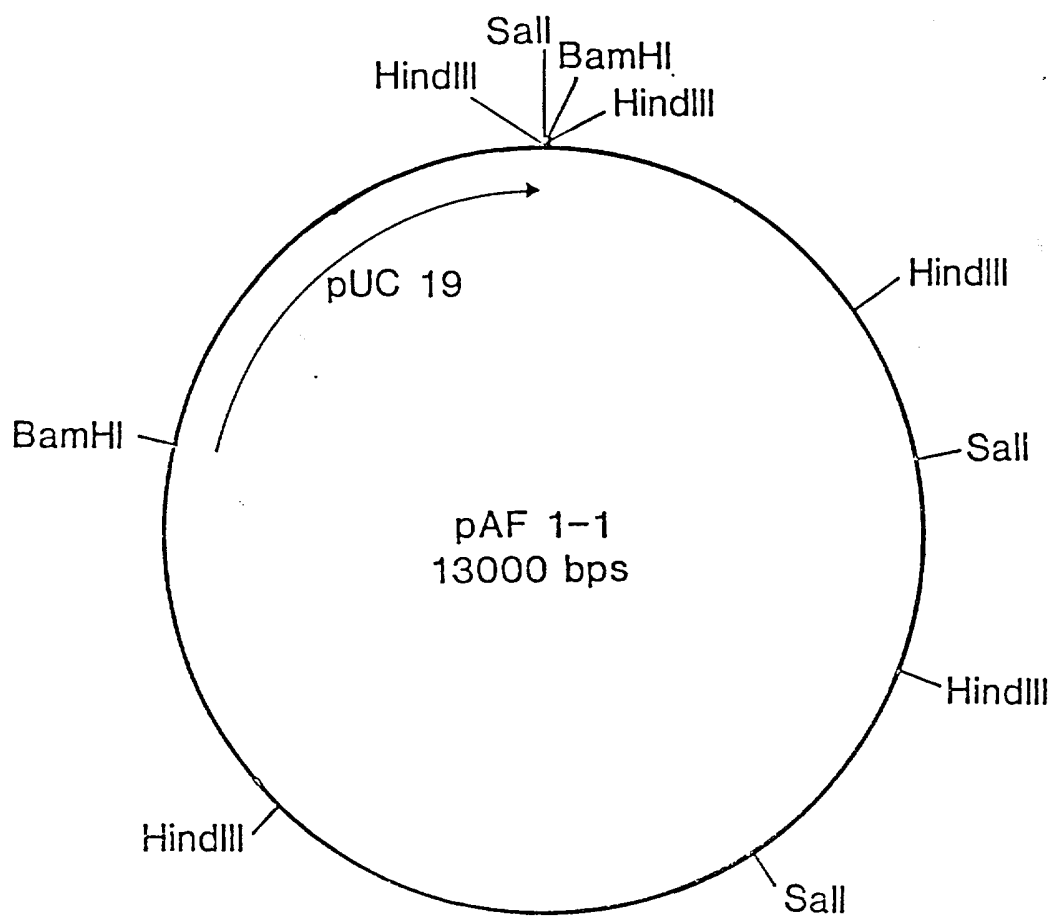


Fig.5

GTCGACTTCCCGTCCTATTTCGGCCTCGTCCGCTGAAGATCCATCCCACCA
 SalI
 TTGCACGTGGGCCACCTTTGTGAGCTTCTAACCTGAACTGGTAGAGTATC 100
 ACACACCATGCCAAGGTGGGATGAAGGGGTATATGAGACCGTCCGGTCC
 GGCGCGATGGCCGTAGCTGCCACTCGCTGCTGTGCAAGAAATTACTTCTC 200
 ATAGGCATCATGGGCGTCTCTGCTGTTCTACTTCCTTTGTATCTCCTGTC
 transliacijos pradžia
TGGGTATGCTAAGCACCACAATCAAAGTCTAATAAGGACCCTCCCTTCCG
 start<-----
AGGGCCCCCTGAAGCTCGGACTGTGTGGGACTACTGATCGCTGACTATCTG
 --intron-----
TGCAGAGTCACCTCCGGACTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCAG
 ->end 400
 TTGCGATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCCGAGACTTCGCATC
 TTTGGGGTCAATACGCACCGTTCTTCTCTCTGGCAAACGAATCGGTCATC 500
 TCCCCTGAGGTGCCCCGCCGGATGCAGAGTCACTTTCGCTCAGGTCCTCTC
 CCGTCATGGAGCGCGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCG 600
 CTCTCATTGAGGAGATCCAGCAGAACGCGACCACCTTTGACGGAAAATAT
 GCCTTCCTGAAGACATACTACAGCTTGGGTGCAGATGACCTGACTCC 700
 CTTCCGAGAACAGGAGCTAGTCAACTCCGGCATCAAGTTCTACCAGCGGT
 ACGAATCGCTCACAAGGAACATCGTTCCATTTCATCCGATCCTCTGGCTCC 800
 AGCCGCGTGATCGCCTCCGGCAAGAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAGCAC
 CAAGCTGAAGGATCCTCGTGCCAGCCCGGCCAATCGTCGCCCAAGATCG 900
 BamHI
 ACGTGGTCATTTCCGAGGCCAGCTCATCCAACAACACTCTCGACCCAGGC
 ACCTGCACTGTCTTCGAAGACAGCGAATTGGCCGATACCGTCGAAGCCAA 1000

TTTCACCGCCACGTTTCGTCCCCTCCATTTCGTCAACGTCTGGAGAACGACC
 TGTCCGGTGTGACTCTCACAGACACAGAAGTGACCTACCTCATGGACATG 1100
 TGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCCGTCGACACCAAGCTGTCCCC
 Sali
 CTTCTGTGACCTGTTCACCCATGACGAATGGATCAACTACGACTACCTCC 1200
 AGTCCTTGAAAAAGTATTACGGCCATGGTGCAGGTAACCCGCTCGGCCCCG
 ACCCAGGGCGTCGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTGACCCACTC 1300
 GCCTGTCCACGATGACACCAGTTCCAACCACACTTTGGACTCGAGCCCGG
 CTACCTTTCGGCTCAACTCTACTCTCTACGCGGACTTTTCGCATGACAAC 1400
 GGCATCATCTCCATTCTCTTTGCTTTAGGTCTGTACAACGGCACTAAGCC
 GCTATCTACCACGACCGTGGAGAATATCACCCAGACAGATGGATTCTCGT 1500
 CTGCTTGGACGGTTCCGTTTGCTTCGCGTTTGTACGTGAGATGATGCAG
 TGTCAGGCGGAGCAGGAGCCGCTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGCGT 1600
 TGTCCCGCTGCATGGGTGTCCGGTTGATGCTTTGGGGAGATGTACCCGGG
 ATAGCTTTGTGAGGGGGTTGAGCTTTGCTAGATCTGGGGGTGATTGGGCG 1700
 GAGTGTTTTGCTTAGCTGAATTACCTTGATGAATGGTATGTATCACATTG
 transliacijos pabaiga
 CATATCATTAGCACTTCAGGTATGTATTATCGAAGATGTATATCGAAAGG 1800
 ATCAATGGTGACTGTCACTGGTTATCTGAATATCCCTCTATACCTCGTCC
 CACAACCAATCATCACCTTTAAACAATCACACTCAACGCACAGCGTACA 1900
 AACGAACAAACGCACAAAGAATATTTTACACTCCTCCCCAACGCAATACC
 AACCGCAATTCATCATACCTCATATAAATACAATACAATACAATACATCC 2000

Fig.6 (3 lapas iš 7)

LT 3957 B

ATCCCTACCCCTCAAGTCCACCCATCCTATAATCAATCCCTACTTACTTAC
TTCTCCCCCTCCCCCTCACCCCTTCCCAGAACTCACCCCGAAGTAGTAAT 2100
AGTAGTAGTAGAAGAAGCAGACGACCTCTCCACCAATCTCTTCGGCCTCT
TATCCCCATACGCTACACAAAACCCCCACCCCGTTAGCATGCACTCAGAA 2200
AATAATCAAAAATAACTAAGAAGGAAAAAAGAAGAAGAAAGGTTACAT
ACTCCTCTCATACAACTCCAAGACGTATACATCAAGATGGGCAATCCCA 2300
CCATTACTGATATCCATCTATGAACCCATTCCCATCCCACGTTAGTTGAT
TACTTTACTTAGAAGAAGAAAAAGGGAAGGGAAGGGAAGAAAGTGGATGG 2400
GATTGAGTTAGTGCTCACCGTCTCGCAGCAAGTTTATATTCTTTTGTTG
GCGGATATCTTTCCTGCTCCTGCTGGACGTTGTCACGGGGTGGTAGTGG 2500
TTGGCGGTGGTGAGGGTCCATGATCACTCTTGGTTTGGGGGGTTGTTGTT
GTCGTTGTTGTTGTTGTTGGGTGGGCATTTCTTTTCTTCACTTGGGGAT 2600
TATTATTTGGAATTGGTTAGTTTGAGTGAGTGGGTAATATTGAATGGGTG
ATTATTGGGAATGAAGTAGATTTGGCTATGAATGGTTGATGGGATGGAAT 2700
GAATGGATGGATGAATAGATGGAGGCGGAAAAGTCAGGTGGTTTGAGGT
CGGATTATTATCTTTGTGCCTGAGGCATCACTCTCCATCTATGTTGTTCT 2800
TTCTATACCGATCTACCAGAGCTAAGTTGACTGATTCTACCACAGTGCAC
AATAAGTATGTACTTATTTCAATTTAGAGTATTTAGATTAACCCGCTGTGC 2900
TATTTGCCGTAGCTTTCCACCCAATTTCTGAAGTTCGAAGAATTAAAACTC
ATCCTACAGTACAGAATAGAAGTAAAAGGAGAAGAGAAAAACAAGATAAT 3000

ACAACCAGTCCAGGTCCATTCTAGATCTCGAATGACCACCAAATAAGAAA
GCAACAAGCAAGTAAGCAAAGCATAAGTCTAAATGAACGCCAATAACTTC 3100
ATCGCCTGCCTTTGAAACTGAACGCTATGCACGAATGGCTCGAAATGATT
CCCTTAACTCCGTAGTATTGAGAGTGAGAGGAAAAGAAAAAAGAGACAG 3200
AAAAGCTGACCATGGGAAAGAAGCATGATCAGTCGGGAATGGATCTGCGG
GTTGAGATAGATATGAGTTGCCTCGCAGATCCGGTGACAAGATAAGAGAA 3300
TTGGGAGATGTGATCAGCCACTGTAACCTCATCAAGCATCGACATTCAAC
GGTCGGGTCTGCGGGTTGAGATGCAAGTTGAGATGCCACGCAGACCCGAA 3400
CAGAGTGAGAGATGTGAGACTTTTGAACCACTGTGACTTCATCAAGCATC
AAAACACACTCCATGGTCAATCGGTTAGGGTGTGAGGGTTGATATGCCAG 3500
GTTGATGCCACGCAGACCCGAACCGACTGAGAAATATGAAAAGTTGGAC
AGCCACTTCATCTTCATCAAGCGTAAACCCCAATCAATGGTAAATCGAA 3600
AACGAATCTGCGGGCTGATGTGGAATGAGACGAATGCCTCGCAGATTCTG
AAGACACGTAAATCGAGATGAACAATCACTTTAACTTCATCAAAGCCTTA 3700
AATCACCCAATGGCCAGTCTATTTCGGGTCTGCGGGTTGAGGTTCTGTG
AGATGCCACGCAGACTGCGAACATGCGATGCATTATAAGTTGGACGAGTG 3800
TAGACTGACCATTGATAACCGAGATAAACAAATCACTTCAACTTCATCAA
GCCTTAAATCACTCAATGGCCAGTCTGTTTGCGGTCTGCGGGCTGATACC 3900
CAAGTTGCGATGCCACGCAGACTGCAAACATTGATCGAGAGACGAGAAAA
ACAACGCACTTTAACTTCAACAAAAGCCTTTCAATCAGTCAATGGCCAGT 4000

CTGTTGCGGGTCTGCGGGCTGATATGCGAGTTGAGGTGCCTCGCAGACCG
 CGAACATGCGATGTAATTTCTTAGTTAGACGAGTGCCTGGCCATTGAGAA 4100
 ACGAGAGAAACAACCACTTTAACTTCATGAAAGCCTTGAACACTCAATG
 ACCCGTCTGTTGGCGGTCTGCGGGCTGATATTCGAGTTGAGATGCCACGC 4200
 AGACCGCCAACATGCGATGTATCATGTAAGTTAGATGAGTGACTGGCCAT
 TGAGAAACGAGAGAAACAACCACTTCATGAGAGCCTTAAATTATTCAA 4300
 TGACCAGTCTGTTACGGTCTGCGGGTTGGTATGCGAGTCTGAGGTGCCTC
 GCAGACCGCGAACATGCGATGTTTTGATGGACGAGTGAAGCCTGACGAT 4400
 CGAGAACTATCTCAGTTGGGTTGGCCATTCGGCTGGCCGTTGGGTTTAGT
 ATTAGGATCGTCAGGTTTGTCCGATGGAACGTTCCGTTTGCGTGCGTTGG 4500
 CGCGACGAGCCCTCTCCTCGGCGTGATTCTGAAATTCTGCAATCAGGGCA
 GCCGCAGCACGGCGACGGGACGTCCTCCAGGAGCTGTGTTGAAGTTTCGG 4600
 GGTGGCGGTCCAGAAGGGGGAGTTACATTAAAAGCCTCATAGATGTCTTT
 GGGTGGTTCCGGGGGGCCCATCGCAAGATCTTCTGGAGTTGTGCGTCTGA 4700
 TCATCTCTTGAGTGTAATTGCGACGCAGACCGAGCTTCAGGATTTTGAA
 GGGCTGGATCGCTCCTGCTGACTCTTCCCTCAGCGGGCTTCGTCTCGGC 4800
 AGTCTTCATTTGCGCGGGCTGATCTTCCATCTCAGAATGGGATCGCTTTC
 TGGTCGCTGCACCCGCTCCTCCCTTCAAGGTCAGCTTGATGCGCAGCGTC 4900
 TTGGGCGGCTCAGCTGGTGGAGTTGGTTCGGCTCTGGCTCCCTCCGGCG
 TCGCTTGGGCACTTGAGTAGTCTCTGAGGCTTCGCCGCGGCGCCGTTTGC 5000

Fig.6 (6 lapas iš 7)

LT 3957 B

GAGTCGGCTCCTTGGTCTCTTTGGCCTCTTTCACTTCACCTGGACCGTCT
TTCGGGGCGGTTTCATCGTGCTGAGCGATCAAGGTTTGGATGTAGGCAGC 5100
CGGCATCATTCGATCAACGGCAATTCCTCTCTTGCGGGCCTCCTCCCGAG
CCTTGATTGTGCGCTTGACCTCGTCCACGTTTTTCGAAGAAGAAAGGCATC 5200
TTGTTATCCTGAGGCAAGTTGCGCTCTCCCATGCGTGGGGATATCCGAAG
ATGCGGTCCTTCTCGAACTGTTTCATGAGACTTCAGACGAATTGGAGGCTG 5300
GGGGAGCAATTTGTCTCCGTAGGTGTTGTTAGGGCGGAACCAAGAATAGC
CTTCGCCTACAACGACAAGCTCTTCGCCAAATTTATTTTTTTGGCCTGTA 5400
AAAACGAACCCATCCTCGTCAGTCCACCGGTGCGTCTCGGACGTAGAGAT
TGGCTTACTTATTCCCTCAACGCCGATCTCTGCCTGGGGCTGCGCTTCGG 5500
ATGCGGCCTCGGTCACGGCTCCGCCTCGGACTGCACCGCTGGAGTTTCGG
TCTTCTTCTCCTGCTTCTCCAGGTACTCCTTGCGTAACTCTTCGATCAGC 5600
CTCGGCTTCCGATGACTGCTCAAATTCTGGAGCAACAGCTGCCGCGGCCA
GGTCAAGCAGGCGGTTTGCTAAAACTGCCCATTTCCATCGACACCTGCC 5700
TCCGACGCCTGTGCAAACAGCTGTTTTCGCATTTGGCCTGTTTGTGGC
ACGCGTCTTCTTGACTGCTGCCTTGCCCTTTACTTCCTTGAGAGCAGACT 5800
CTGGCTTAGATGATGGTGCACGGTTTCTGCGGAAGCGCCGCTCAGATTCC
AAAGATTCCATAGCTTTAATGGTAGGCTTTCTGGTTCTTCCAGAAGTGCG 5900
CGCAGCTGACGTAGTGGTTGAGTAGCTGGCAGTTGGGGATCCTGGGCCCT
CATTGGAACCATCAAGACCAAATTTGTTTCCATACATATCAGCATGGTAT 6000

TCAAAGGAAACTTTGCGCGTACGGAGTACTGCGTTCGATTCCGGGTGT
ATCCAAGTCGTATCCAGACATGGTGTCTGAATTCAGCCTTGCTGTCAAGAG 6100
CAGGGGTACTTTCAATGCTGTCAGCAACCACGCGGCCAAAGGGCGTCTTC
GGGAAAGAAGGTGTTTCAAGAGAAGCGTCATCCACGGCCTGGCTTGCGGC 6200
GTTGATTGCAGACTTTCGAGTAGATCGCTGAGGTCGCGAACTGGTTCGAG
TAGCAACCTGTGAATTGGCAGCCTTGTAAGTCTTCGATTCACTGCAGAG 6300
ACGGAGTAGACTGCACTGATTTGGAATTCTGAGTCGCAGCCATTCTGGAT
TTGCGTTCGGCGCGACGAGATCTCGCAGTCGTGGTACGAGGAGTAGAGCG 6400
AGGCTGCGTAGCAGTGTTGCAAGCTTGGTGCTAGCCTCCTGGGCTTCAGC
AGCTTCAGCAGTGGTGGCAGACGCAGCAGAATTAGCGGAGCTTTATCGGC 6500
TTTGCCGCTCTGAGCGTTGGGAGTAGAAGTGAGAGAAGAGGTAGAGTCCA
CGGAAGAAGTCTTCTCGCTGTTCTCAAAGCCGTTTCAGCTTTGCTGGCATA 6600
GACTTACGCGTCTTGCGGCTGTTGGAAGCGGAAGAGTTCATGGCGGGAGA
GGAGACGTTAGAAGTAGACATGGTGGGGTTTGTTGACGGGTTTGTAGTAA 6700
CAAGAGACTTGCGTCGATCTTTGAGTGTTCTTGACAGAAAGTTATGCAAC

GTCGAC 6756
SalI

Fitazés lokusas.

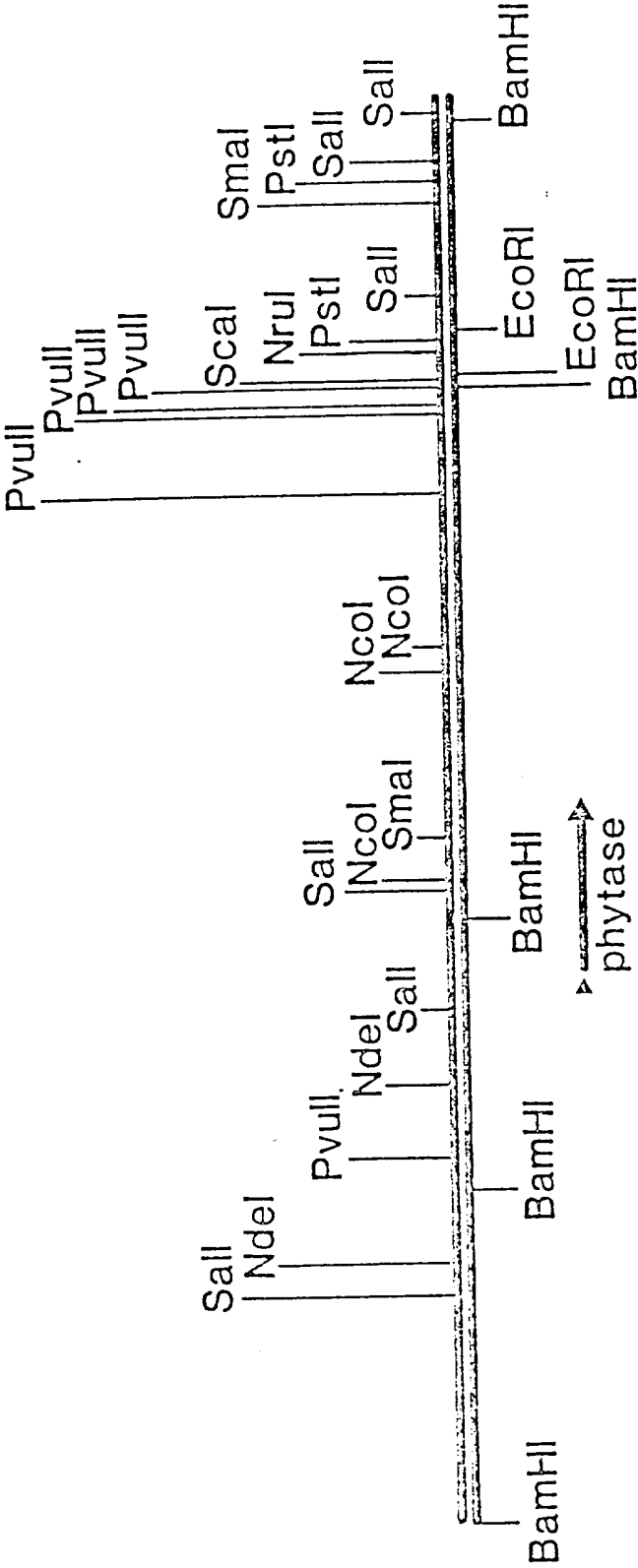


Fig.7

Fig.8 (1 lapas iš 2)

ATGGGCGTCTCTGCTGTTCTACTTCCTTTGTATCTCCTGTCTGGAGTCAC
 M G V S A V L L P L Y L L S G V T
 -23 -20 -10

CTCCGGACTGGCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCAGTTGCGATACGG 100
 S G L A V P A S R N Q S S C D T
 -1 +1 10

TCGATCAGGGGTATCAATGCTTCTCCGAGACTTCGCATCTTTGGGGTCAA
 V D Q G Y Q C F S E T S H L W G Q
 20

TACGCACCGTTCTTCTCTCTGGCAAACGAATCGGTCATCTCCCCTGAGGT 200
 Y A P F F S L A N E S V I S P E V
 30 40

GCCCGCCGGATGCAGAGTCACTTTCGCTCAGGTCCTCTCCCGTCATGGAG
 P A G C R V T F A Q V L S R H G
 50 60

CGCGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCGCTCTCATTGAG 300
 A R Y P T D S K G K K Y S A L I E
 70

GAGATCCAGCAGAACGCGACCACCTTTGACGGAAAATATGCCTTCCTGAA
 E I Q Q N A T T F D G K Y A F L K
 80 90

GACATACAACACTACAGCTTGGGTGCAGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAAC 400
 T Y N Y S L G A D D L T P F G E
 100 110

AGGAGCTAGTCAACTCCGGCATCAAGTTCTACCAGCGGTACGAATCGCTC
 Q E L V N S G I K F Y Q R Y E S L
 120

ACAAGGAACATCGTTCCATTCATCCGATCCTCTGGCTCCAGCCGCGTGAT 500
 T R N I V P F I R S S G S S R V I
 130 140

CGCCTCCGGCAAGAAATTCATCGAGGGCTTCCAGAGCACCAAGCTGAAGG
 A S G K K F I E G F Q S T K L K
 150 160

ATCCTCGTGCCCAGCCCGGCCAATCGTCGCCCAAGATCGACGTGGTCATT 600
 D P R A Q P G Q S S P K I D V V I
 170

TCCGAGGCCAGCTCATCCAACAACACTCTCGACCCAGGCACCTGCACTGT
 S E A S S S N N T L D P G T C T V
 180 190

CTTCGAAGACAGCGAATTGGCCGATACCGTCGAAGCCAATTCACCGCCA 700
 F E D S E L A D T V E A N F T A
 200 210

CGTTCGTCCCTCCATTCGTCAACGTCTGGAGAACGACCTGTCCGGTGTG
 T F V P S I R Q R L E N D L S G V
 , 220

ACTCTCACAGACACAGAAGTGACCTACCTCATGGACATGTGCTCCTTCGA 800
 T L T D T E V T Y L M D M C S F D
 230 240

CACCATCTCCACCAGCACCGTCGACACCAAGCTGTCCCCCTTCTGTGACC
 T I S T S T V D T K L S P F C D
 , 250 260

TGTTACCCCATGACGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCTTGAAA 900
 L F T H D E W I N Y D Y L Q S L K
 , 270

AAGTATTACGGCCATGGTGCAGGTAACCCGCTCGGCCCGACCCAGGGCGT
 K Y Y G H G A G N P L G P T Q G V
 280 290

CGGCTACGCTAACGAGCTCATCGCCCGTCTGACCCACTCGCCTGTCCACG 1000
 G Y A N E L I A R L T H S P V H
 , 300 310

ATGACACCAGTTCCAACCACACTTTGGACTCGAGCCCGGCTACCTTTCCG
 D D T S S N H T L D S S P A T F P
 , 320

CTCAACTCTACTCTCTACGCGGACTTTTCGCATGACAACGGCATCATCTC 1100
 L N S T L Y A D F S H D N G I I S
 330 340

CATTCTCTTTGCTTTAGGTCTGTACAACGGCACTAAGCCGCTATCTACCA
 I L F A L G L Y N G T K P L S T
 , 350 360

CGACCGTGGAGAATATCACCCAGACAGATGGATTCTCGTCTGCTTGGACG 1200
 T T V E N I T Q T D G F S S A W T
 , 370

GTTCCGTTTGCTTCGCGTTTGTACGTCGAGATGATGCAGTGTGAGGCGGA
 V P F A S R L Y V E M M Q C Q A E
 380 390

GCAGGAGCCGCTGGTCCGTGTCTTGTTAATGATCGCGTTGTCCCGCTGC 1300
 Q E P L V R V L V N D R V V P L
 , 400 410

ATGGGTGTCCGGTTGATGCTTTGGGGAGATGTACCCGGGATAGCTTTGTG
 H G C P V D A L G R C T R D S F V
 , 420

AGGGGGTTGAGCTTTGCTAGATCTGGGGGTGATTGGGCGGAGTGTTTTGC 1400
 R G L S F A R S G G D W A E C F A
 430 440

TTAG 1404

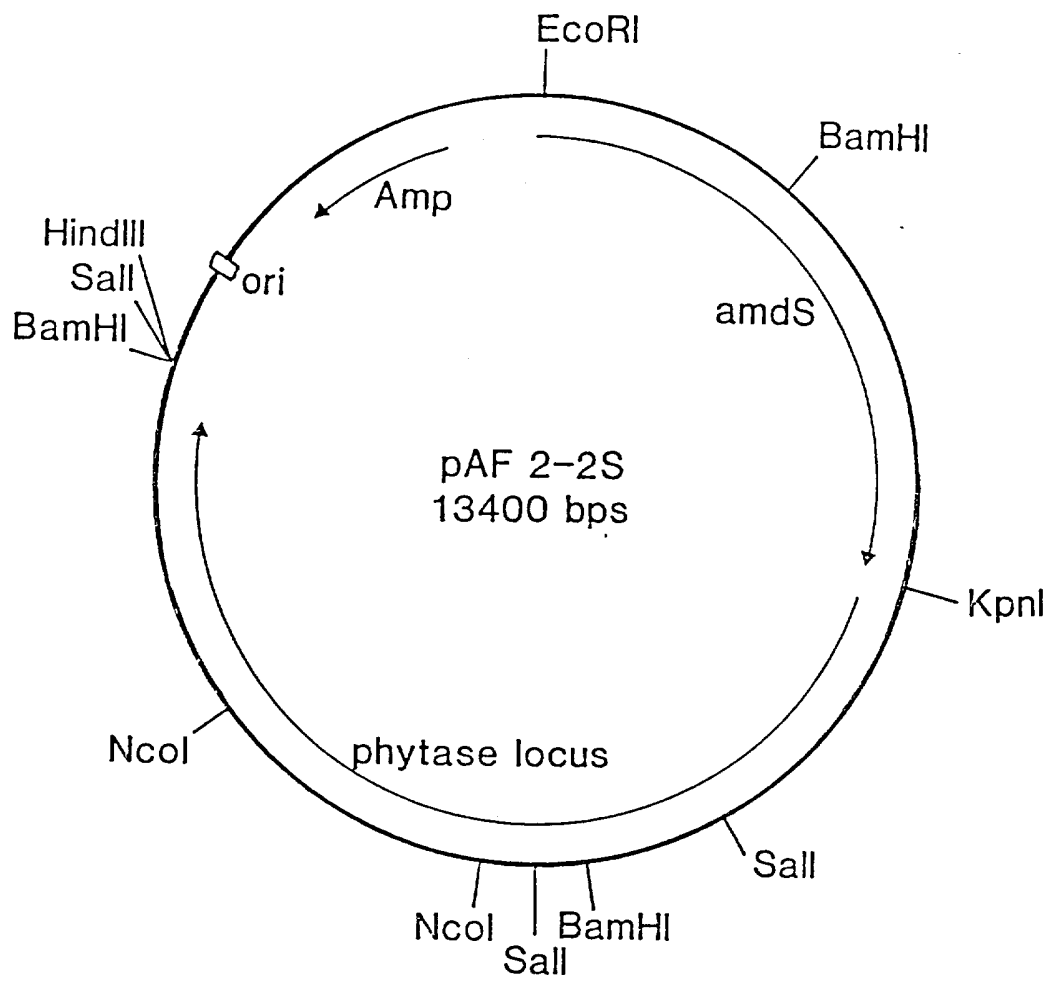


Fig.9

A

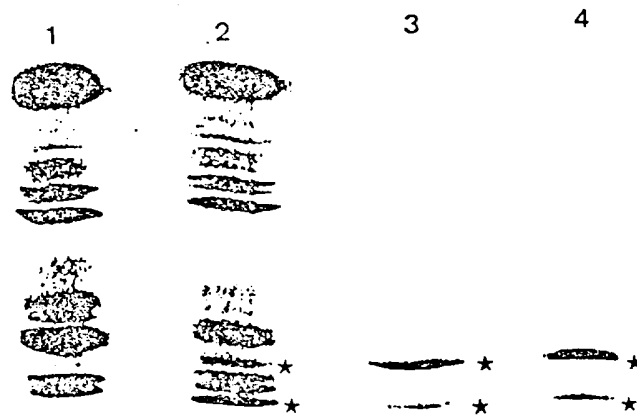


Fig.10a

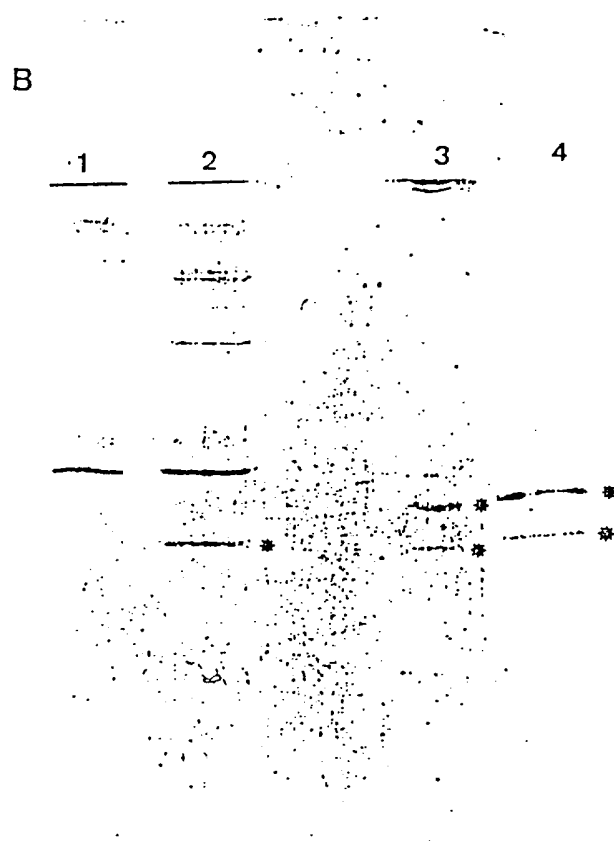


Fig.10b

A

1

2

3

4

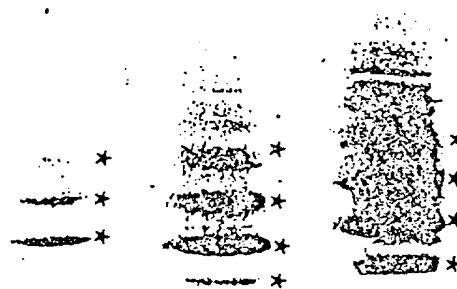


Fig.11a

B

1 2 3 4

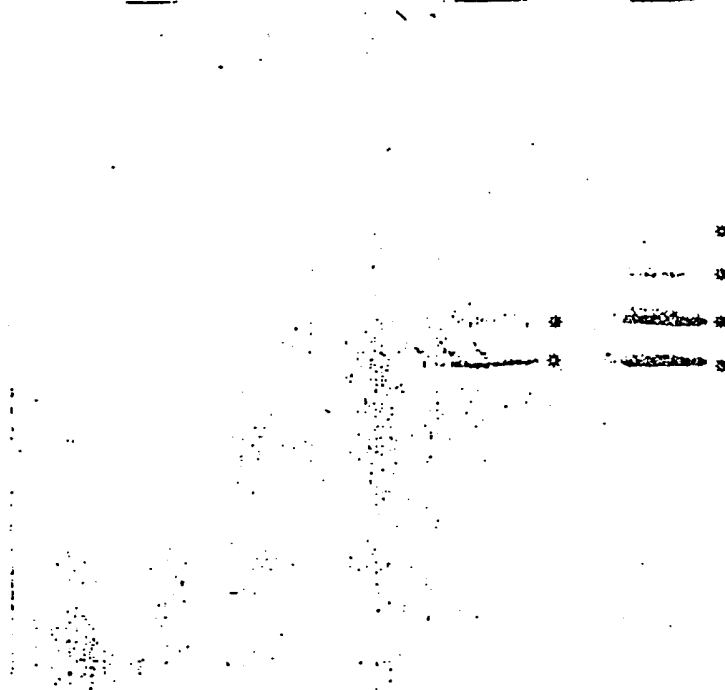


Fig.11b

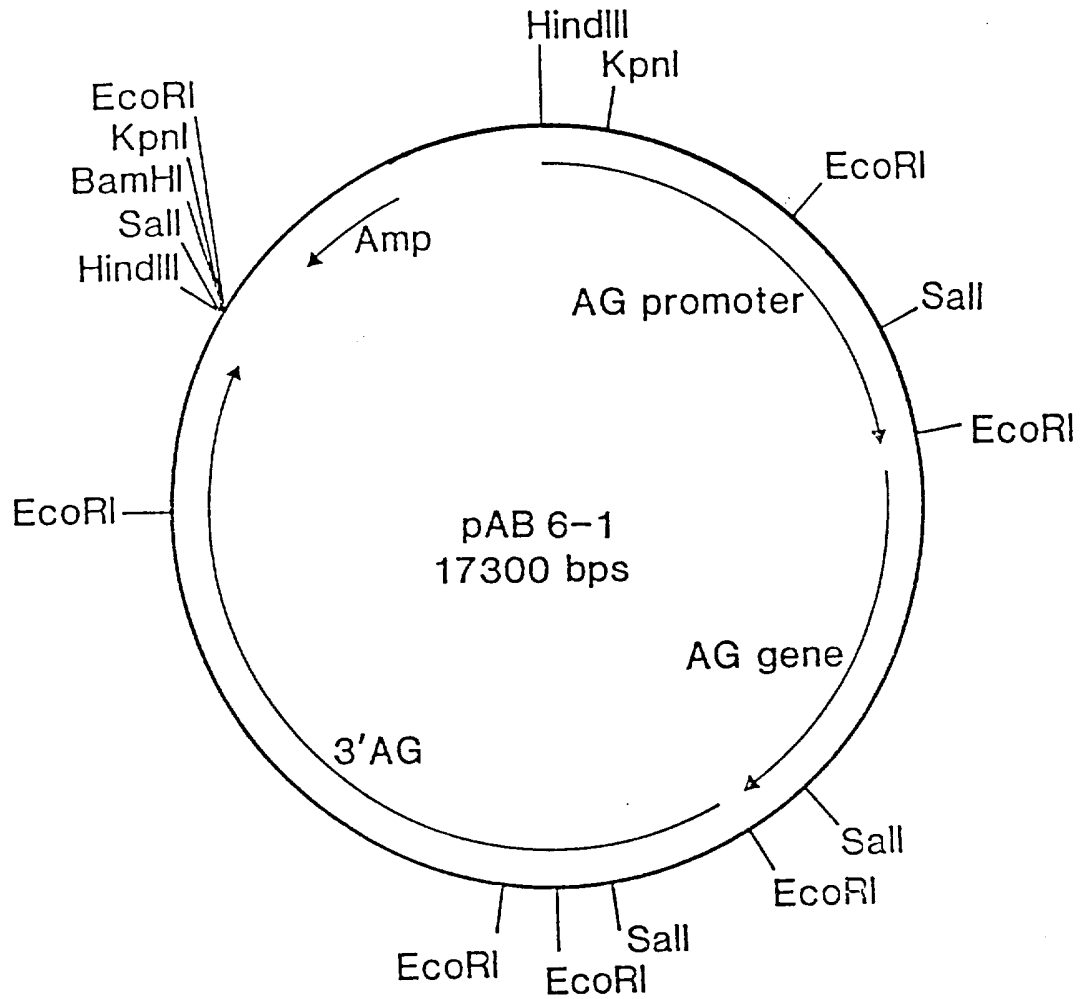


Fig.12

13. AG/fitazės geno sujungimas polimerazinės grandininės reakcijos pagalba

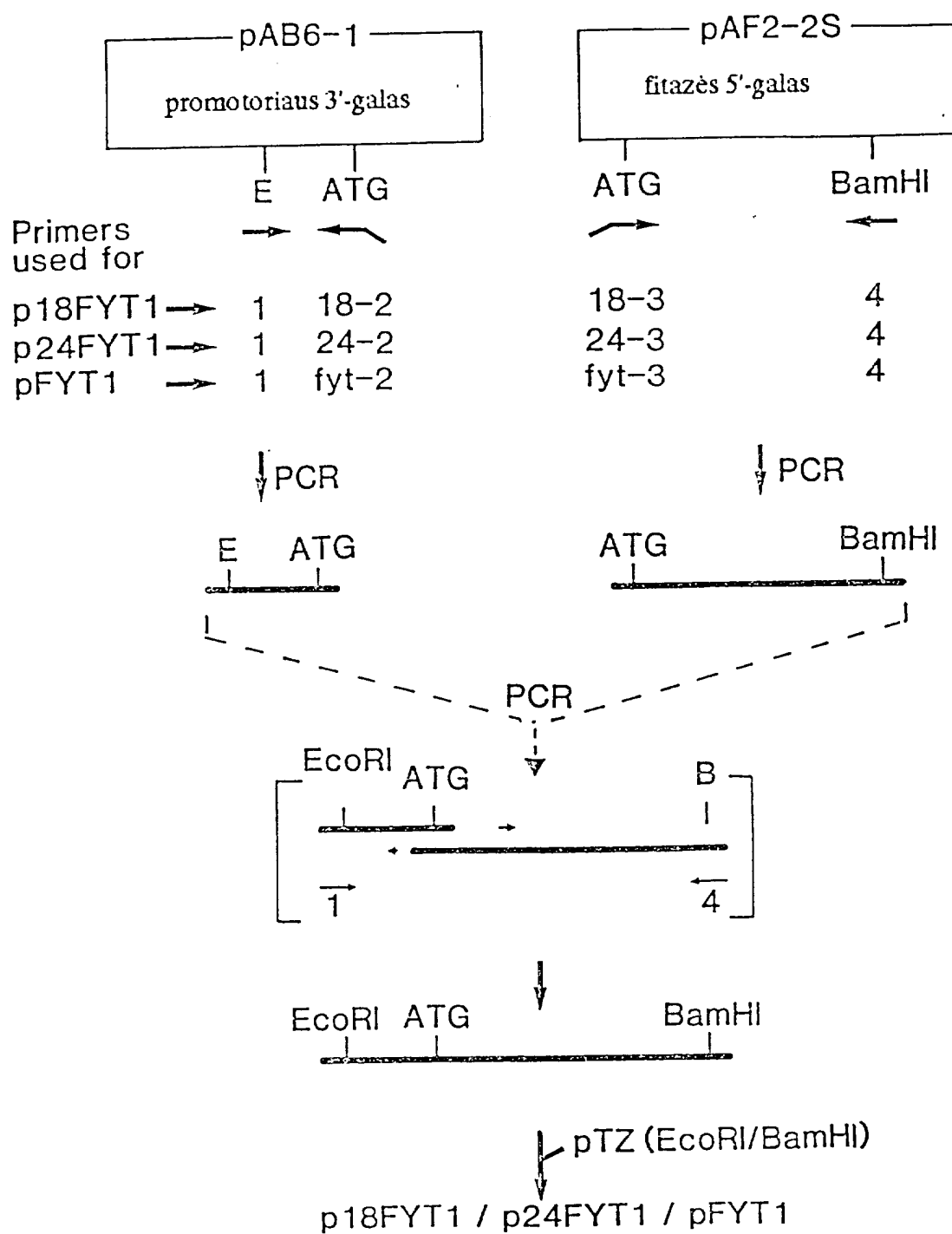


Fig.13

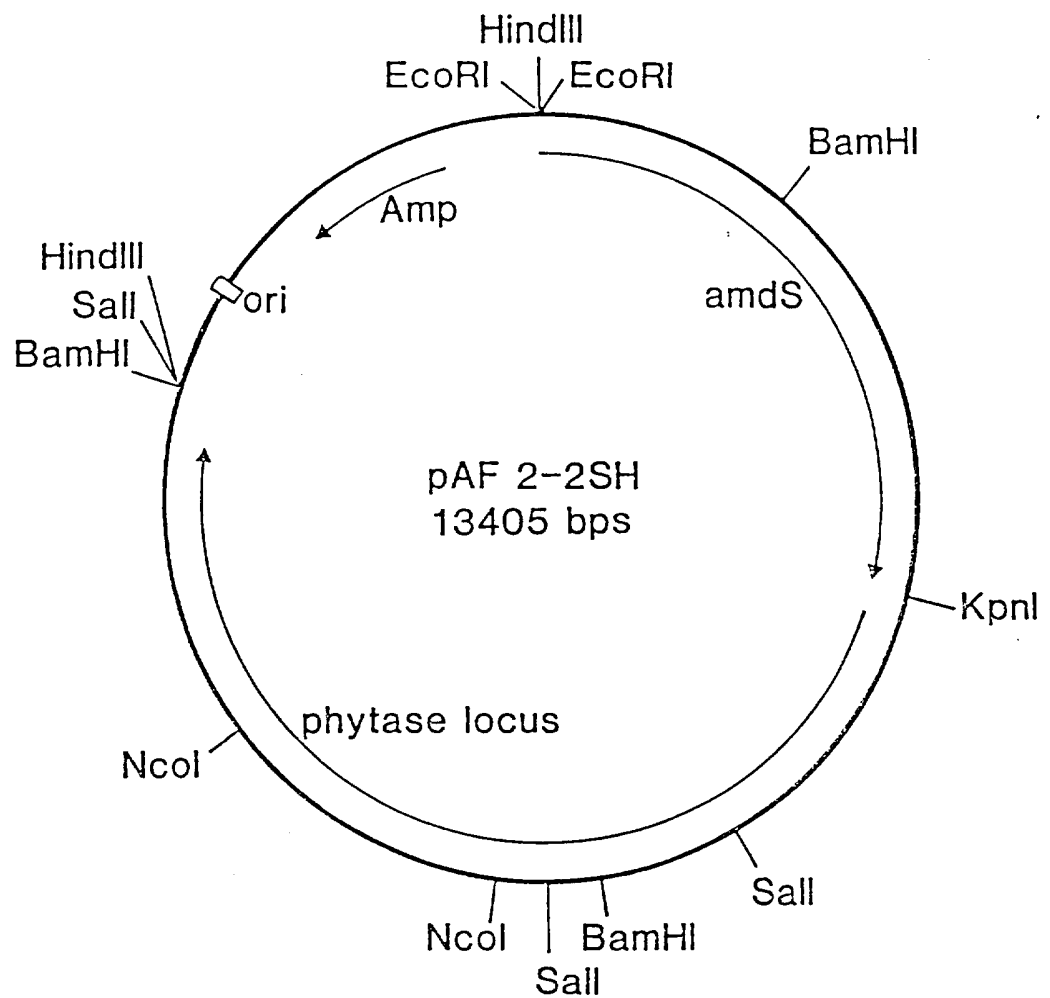


Fig.14

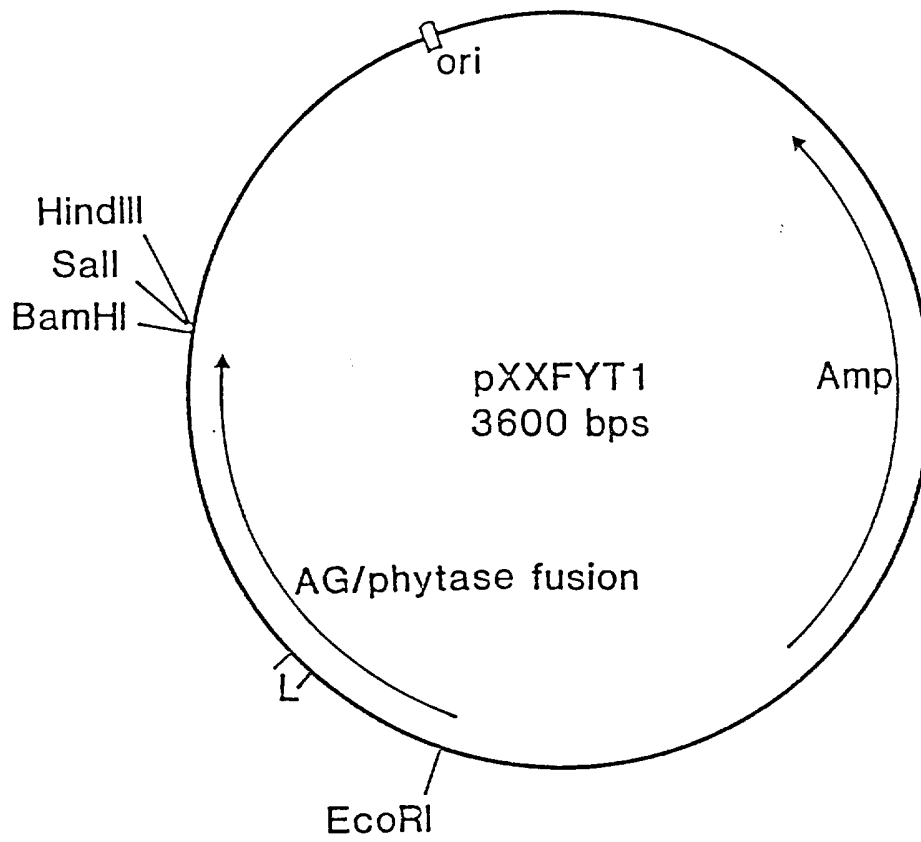


Fig.15a

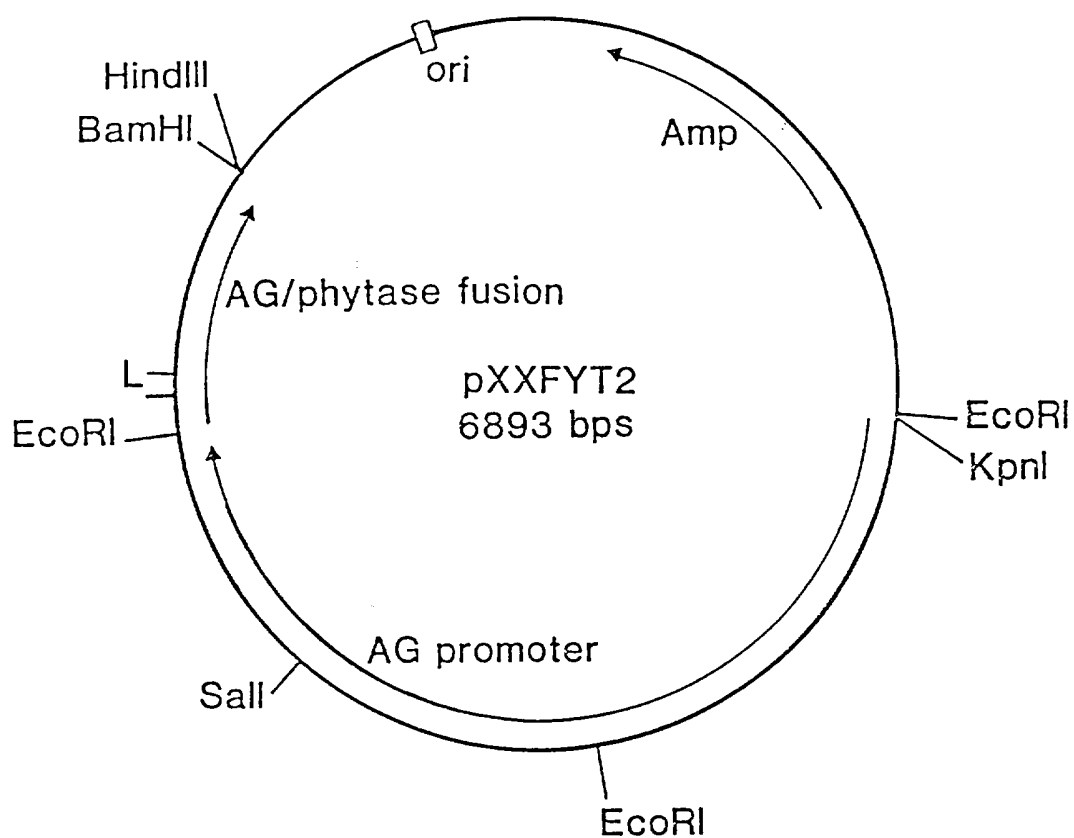


Fig.15b

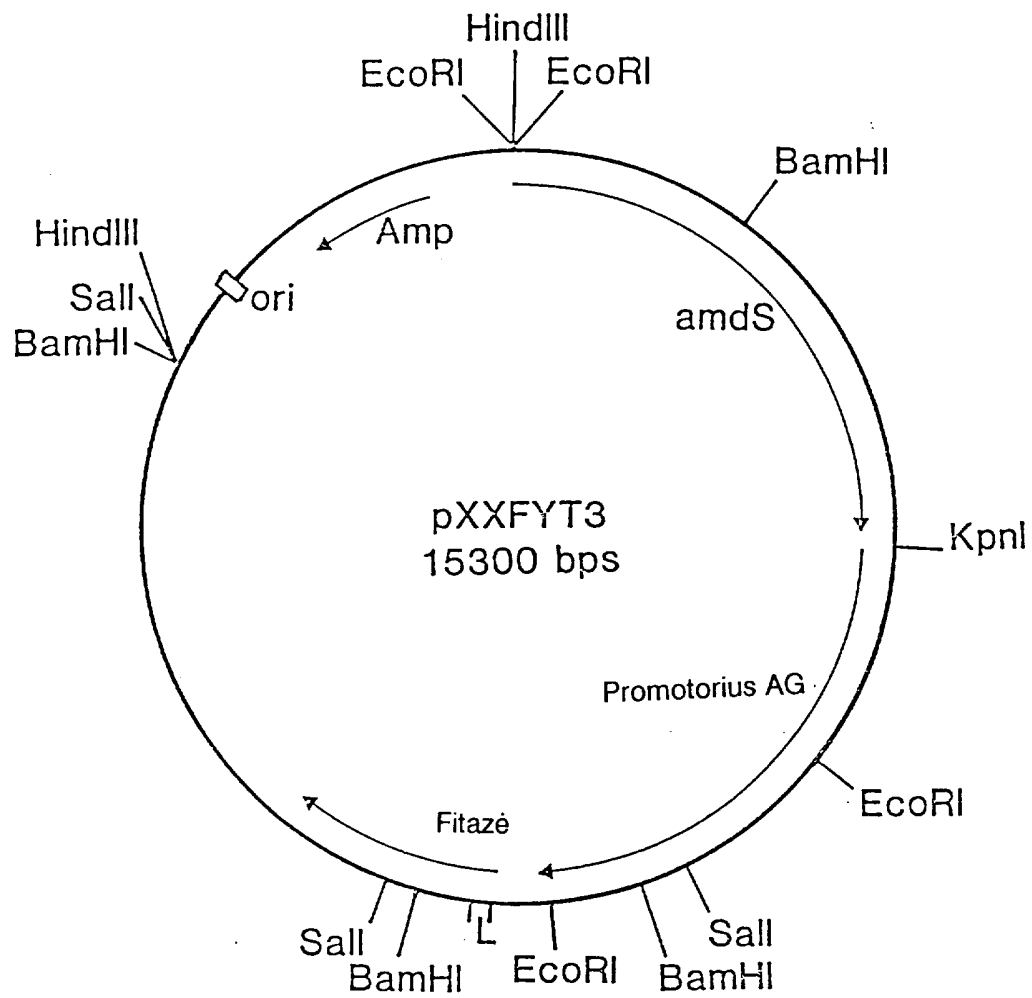


Fig.15c

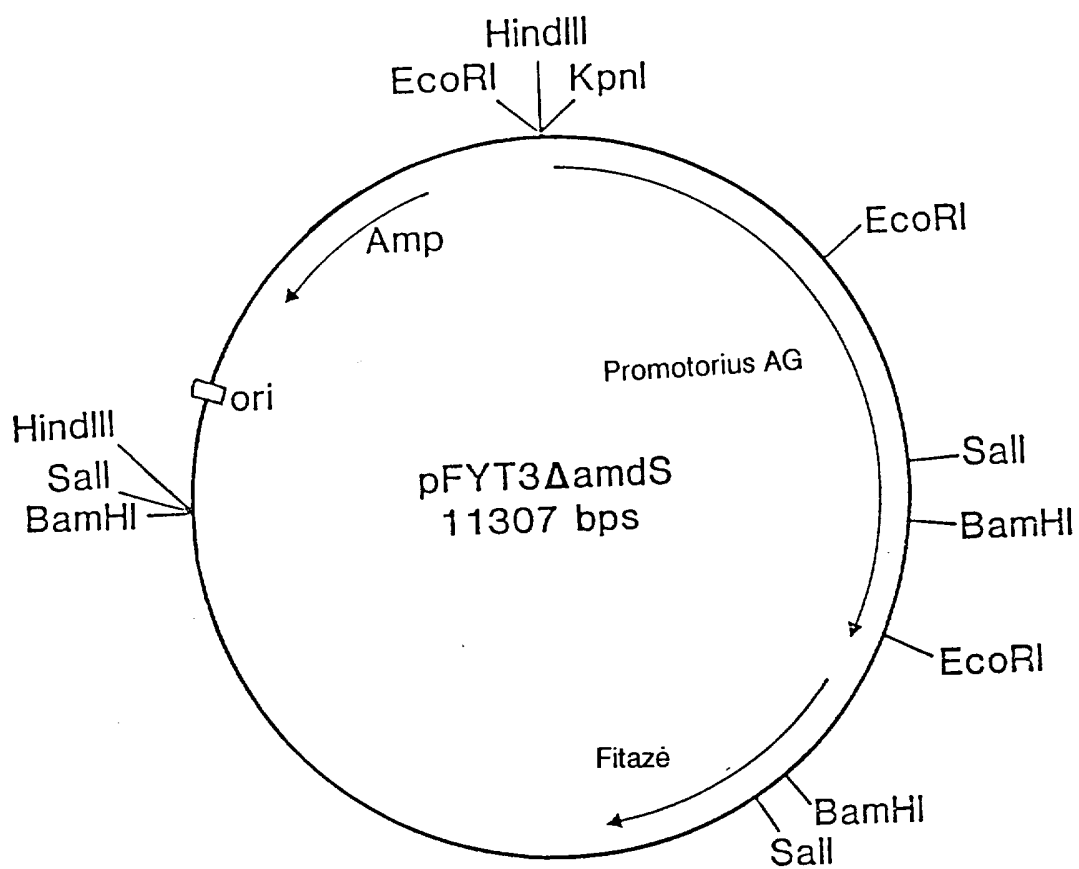


Fig.16

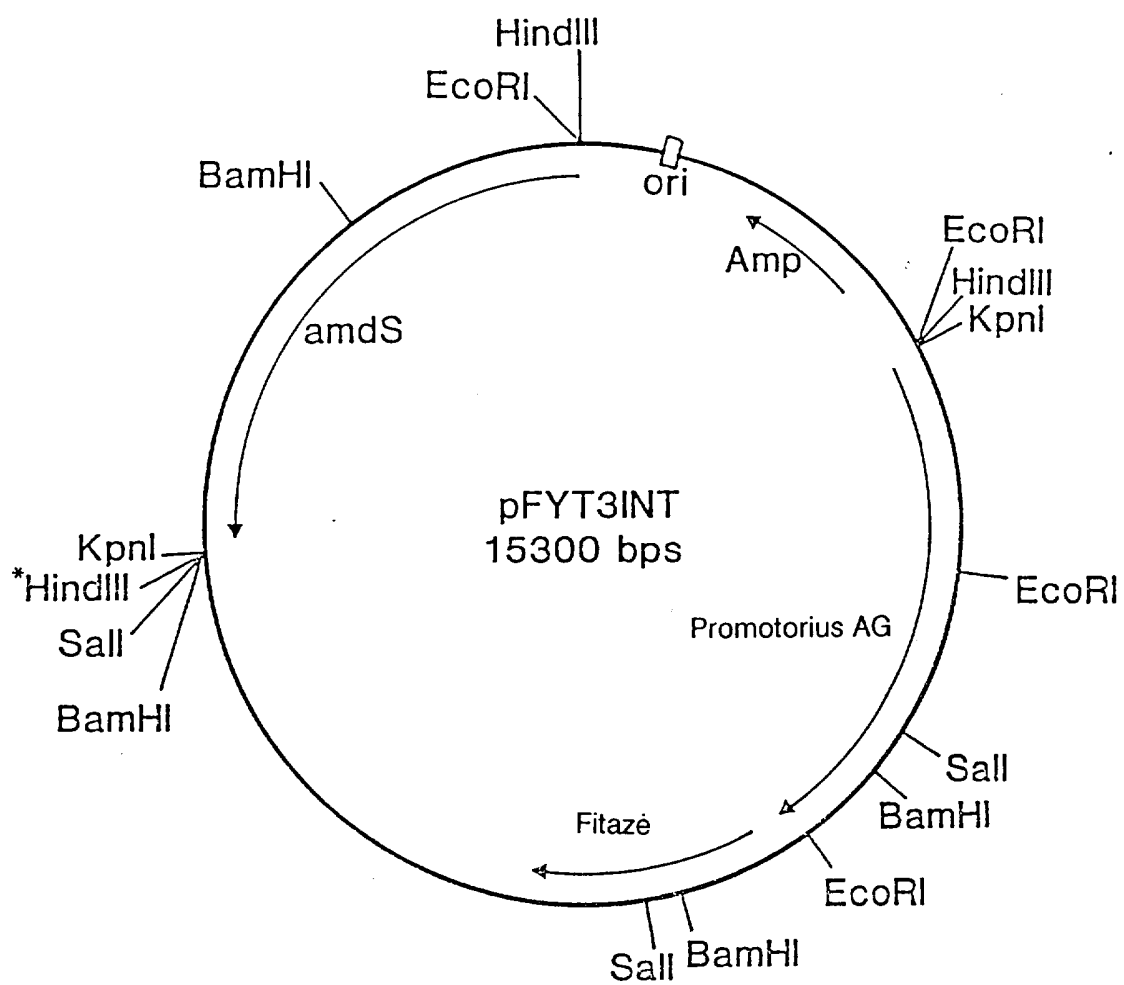


Fig.17

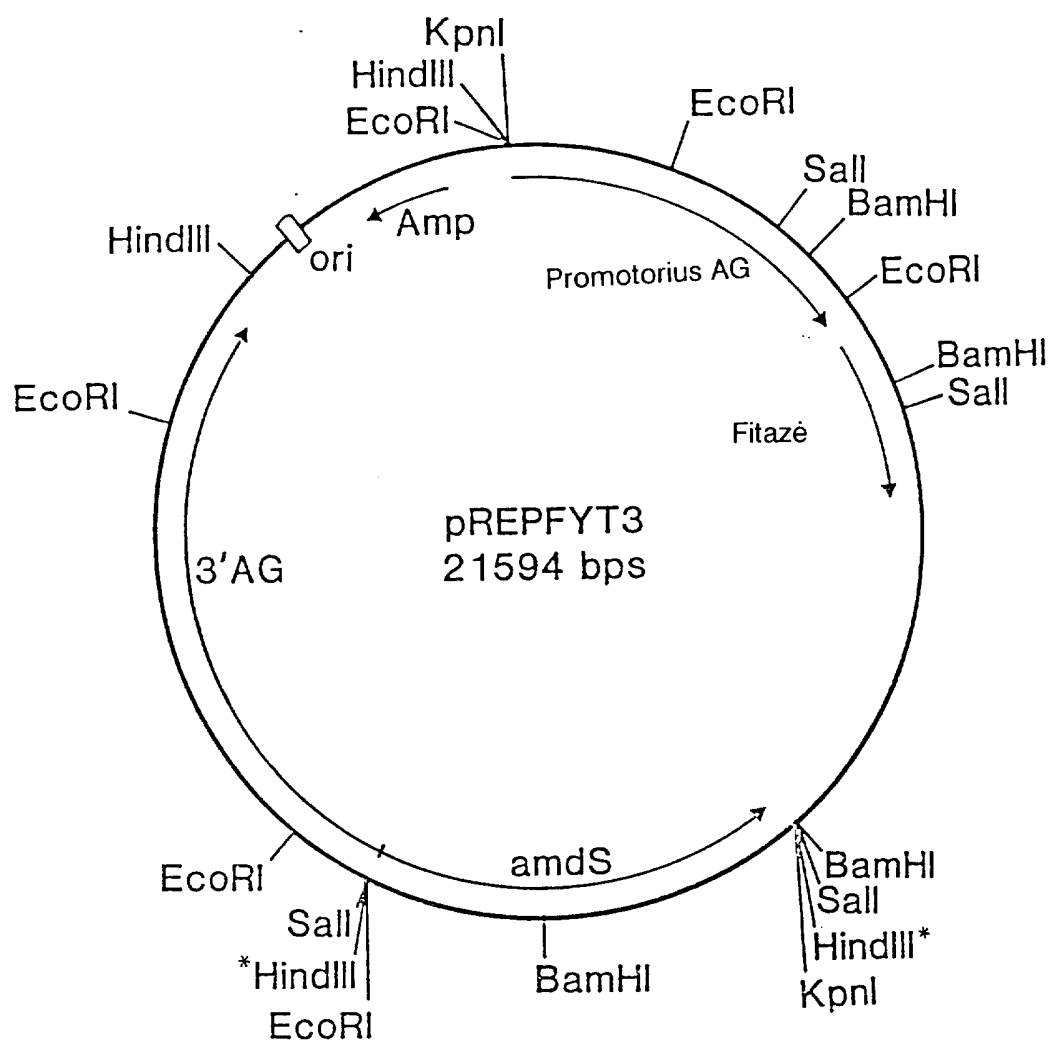


Fig.18

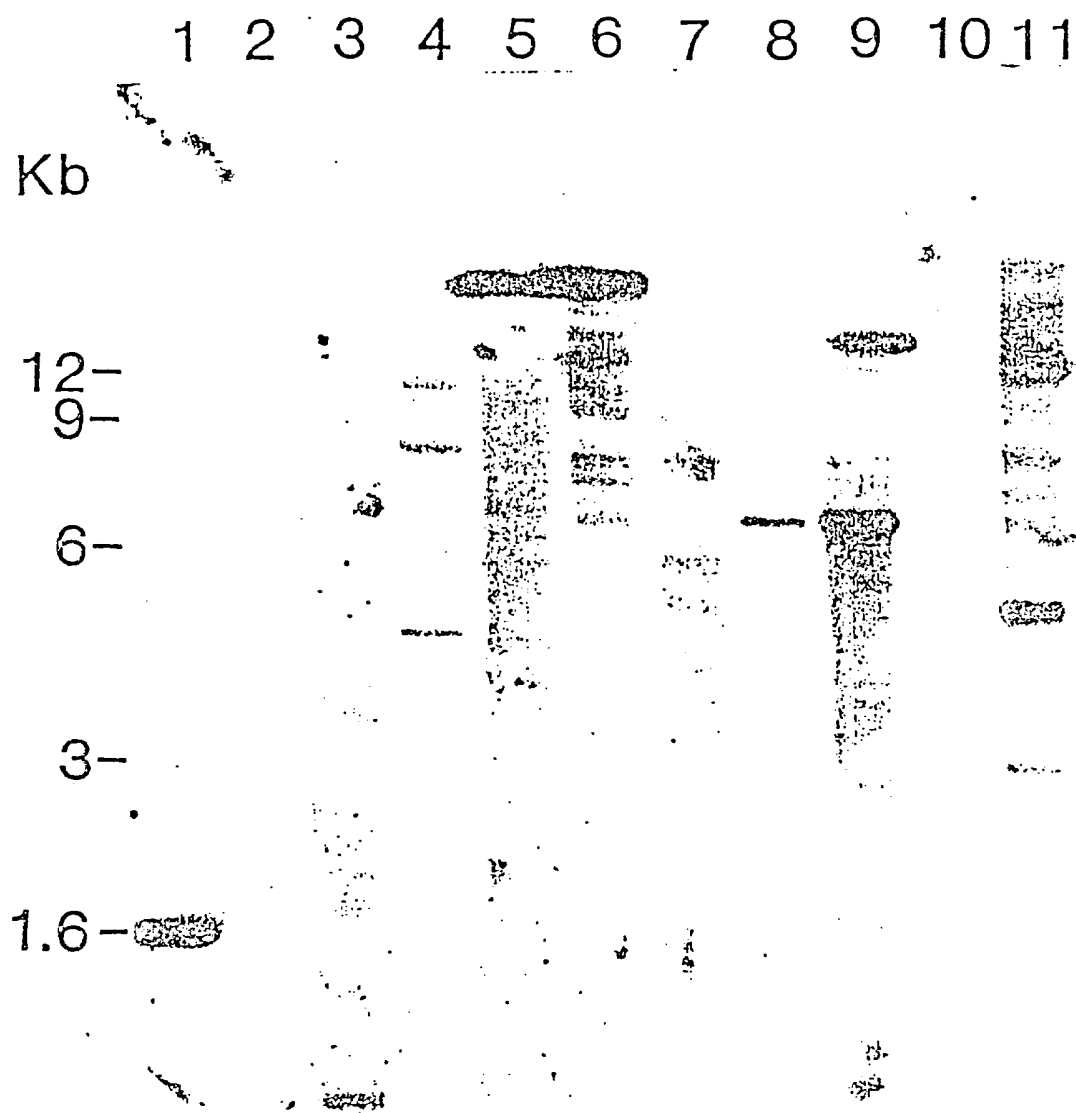


Fig.19a

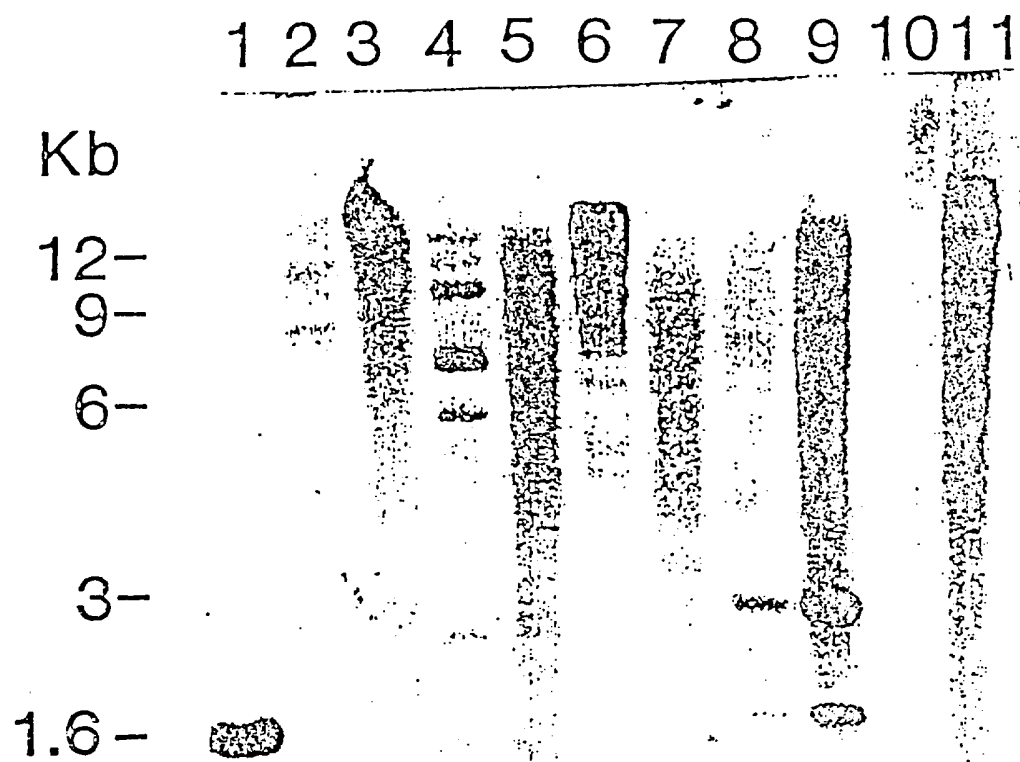


Fig.19b