

(19) DANMARK

(11)

DK 175671 B1



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

- 
- (51) Int.Cl.: C 12 N 9/14    A 23 C 19/032    C 12 N 1/21    C 12 N 15/55    C 12 N 15/74  
(21) Patentansøgning nr: PA 1991 00054  
(22) Indleveringsdag: 1991-01-11  
(24) Løbedag: 1989-07-12  
(41) Alm. tilgængelig: 1991-01-11  
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-01-10  
(86) International ansøgning nr: PCT/GB89/00791  
(86) International indleveringsdag: 1989-07-12  
(85) Videreførelsesdag: 1991-01-11  
(30) Prioritet: 1988-07-13 GB 8816693

- (73) Patenthaver: Institute of Food Research Limited, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, Storbritannien  
(72) Opfinder: Michael John Gasson, Old Ash Farm, Stone Lane, Bintree, Dereham, Norfolk NR20 5NA, Storbritannien  
(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark
- 

(54) Benævnelse: **Anvendelse af lysin fra Lactococcus-bakteriofag til ostefremstilling**

(56) Fremdragne publikationer:  
**Ingen**

(57) Sammendrag:

Lysinet fra en Lactococcus (fortrinsvis med prolathoved) bakteriofag anvendes til lysering af bakteriestarterkulturer under ostefremstilling. Sådanne bakteriofager omfatter øvML3.

ØvML3-lysinet er desuden blevet karakteriseret, og en kodningssekvens derfor er blevet klonet.

fortsættes

E F P S K K D E G T G Y A F R K D G Q L Y V G S 72  
 GAATTCCTAGTAAGAAAGACGAGGGAACGGGTACGCCTTTAGAAAAGACGGACAATTATATGTCGGTTCC  
 EcoRI  
 I K A Y N A K K N A W E R T F D I V N A I K D I 144  
 ATTAAGCATATAACGCAAGAAAAACGCGTGGGAACGTACTTTTGACATTGTGAACGCAATTAAAGATATC  
 EcoRV  
 I D E F D L K D Y H M A I E T P I M G R N R K H 216  
 ATAGATGAGTTTGACTTAAAGACTATCACATGGCTATTGAAACGCCTATCATGGGTAGAAACAGAAAGCAC  
 S I T L A N C N G Y F I G A I D G L V N G L Y F 288  
 AGTATCACATTGGCTAATTGTAACGGTTATTTATCGGTGCTATTGACGGTCTAGTAAATGGCTTACTTT  
 Y  
 TATTGATAACTCTAAATGGTGTAGCTATCATTTAATTTAGGCAACGAGAACGAAAAAGAAAGTTT 360  
 5 1  
 GGAACCTTTAAACAGACTGGACTTGTTCGGCTTGATTGTAAGATGATAACATGGCTGACGCTTATAACAT 432  
 DraI  
 TTTGACATATTGCGAACACTTGGGTTAGTTGTTCCCTTATAAAAAACAATAATAAATTGGAGGTGGTAA 504  
 TATAAAGTATCACAAAACGGTTTGAACCTTGATTAAGAGTTTGAGGTTGTAGGTTGACGCTTATAAAC 576  
 HincII  
 M Y T I G W G H Y G V T A G T T W T Q 648  
 TGTACCGTGGGAACTAAATGTACACTATCGGTTGGGGTCATTATGGAGTGACAGCAGGTACAACATGGACACA  
 2  
 A Q A D S Q L E I D I N N K Y A P M V D A Y V K 720  
 AGCTCAAGCAGATAGCCAGCTAGAGATTGACATCAATAAAGTATGCACCTATGGTTGACGCTTACGTAAA  
 HincII  
 G K A N Q N E F D A L V S L A Y N C G N V F V A 792  
 AGGCAAAGCAATCAAATGAGTTTGACGCCTTAGTTTCATTGGCTTATAACTGTGGAATGTTTCGTTGC  
 D G W A P F S H A Y C A S M I P K Y R N A G G Q 864  
 TGACGGTTGGGCGCTTTCTCACATGCTATTGTGCTTCAATGATACCGAAGTATCGTAATGCAGGCGGTCA  
 V L Q G L V R R R Q A E L N L F N K P V S S N S 936  
 AGTCTTACAAGGCTTAGTAAGACGACAGGAGAGCTTAAGTTTAAATAAACAGTATCAAGTAATC  
 3  
 N Q N N Q T G G M I K M Y L I I G L D N S G K A 1008  
 AAACCAAAACATCAACAGGAGGAATGATAAAATGTACCTTATTATAGGACTAGATAATTCAGGTAAAGC  
 4  
 K H W Y V S D G V S V R H V R T I R M L E N Y Q 1080  
 TAAACATTGGTATGTTTCTGACGGTGTAAGTGTTCGTATGTTCTGACAAATTCGTATGTTGGAAACTATCA  
 N K W A K L N L P V D T N V Y C R N R S R V W T 1152  
 AAACAAATGGGTAAACTTAACTGCCAGTTGATACCAATGTTTATTGCAGAAATCGAAGCAGAGTTTGGAC  
 GTAAGATTGACATGGCTTCAGGAGAAGTGAAATAGGAGGAAGTGAATGAGGGAATC  
 EcoRI 1209

Bakteriofagen  $\Phi$ vML3, der anvender *Streptococcus lactis* ML3 som vært, producerer et bakteriofaglysin, der frembringer tydelige "ringe" omkring virale plaquer. Dette lysin er ansvarligt for nedbrydning af cellevæggen og lysis af værtscellerne. *Streptococcus lactis* er fornylig blevet omdøbt til *Lactococcus*  
5 *lactis* subsp. *lactis*.

Bakteriofaglysinet af  $\Phi$ vML3 er blevet delvist oprenset og dets evne til at lysere andre bakterier end *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3 er blevet undersøgt tidligere. Det blev fundet, at lysinet lyserede stammer af *Lactococcus lactis*  
10 subsp. *lactis* og subsp. *cremoris*, og at det havde en svag virkning på gruppe D streptococcer. Andre testede bakterieslægter blev ikke påvirket (J.D. Oram og B. Reiter (1965), J. Gen. Microbiol. 40, 57-70, B. Reiter og J.D. Oram (1963), J. Gen. Microbiol. 32, 29-32).

15 Lysis af oste-fremstillende bakterier med bakteriofager eller på anden måde har tidligere vist sig at være problematisk. Det har nu vist sig, at et i det væsentlige rent lysinenzym faktisk kan anvendes med fordel ved fremstilling af ost.

I et første aspekt tilvejebringer opfindelsen et i det væsentlige rent præparat af  
20  $\Phi$ vML3 lysin eller en variant deraf, der er fri for aktiv bakteriofag.

I et andet aspekt tilvejebringer opfindelsen en formulering omfattende lysinet af en *Lactococcus* bakteriofag eller en variant af et sådant lysin, der er egnet til tilsætning til oste eller til en osteprækursorblanding. En formulering er egnet til  
25 tilsætning til ost eller til en prækursor, hvis den ikke med det samme eller senere gør osten uegnet til fortæring eller forhindrer dannelsen af fortærbar ost ud fra prækursorblandingen. Formuleringen er fri for levedygtig (aktiv) bakteriofag. Fortrinsvis er bakteriofagen en bakteriofag med prolathoved.

30 I et tredje aspekt tilvejebringer opfindelsen  $\Phi$ vML3-gen eller DNA-kodningssekvens for lysin, isoleret fra generne, der normalt ville befinde sig umiddelbart ovenstrøms eller umiddelbart nedenstrøms for dette gen i  $\Phi$ vML3, kendetegnet ved, at nævnte gen eller kodningssekvens ligger inden for det omtrentlige 0,84

- kb fragment af  $\phi$ vML3-bakteriofagets genom, som er flankeret af sekvenserne 5'-TTTAAACAGACTG-GACTTGTCCGC-3' og 5'-AGTGAAATAGGAGGAAGTGAA-TGAG-3', og hvor  $\phi$ vML3-bakteriofaget i overensstemmelse med Budapest-Traktaten er deponeret i den skotske nationalsamling af industrielle bakterier og marinebakterier i Aberdeen (*National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK*) under accessionsnummer 40160, eller en variant heraf, som indkoder et lysin, som bibeholder mindst 10% af den bakterielle cellevægsnedbrydende aktivitet i nævnte lysin.
- 10 I en konservativ variant adskiller DNA-sekvensen sig fra den naturligt forekommende DNA-sekvens, men koder for samme polypeptidfragment som den naturidentiske sekvens p.g.a. degeneration af den genetiske kode. Andre varianter omfatter kodningssekvenser, der koder for polypeptider med aminosyresekvenser, der er lidt forskellige fra lysinets, men bibeholder mindst 10%, for-
- 15 trinsvis mindst 50%, 90%, 95% eller 99% af lysinets bakteriecellevægsnedbrydende aktivitet. Denne aktivitet kan måles ved at iagttage ændringen af den optiske densitet i en celsuspension, fx. af *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, der udsættes for lysinet. Polypeptidvarianterne kan omfatte sådanne, der er lidt længere eller kortere end lysinet eller har konservative aminosyresubstitutioner.
- 20 For eksempel kan en serin erstatte en threonin og omvendt, og en glutamin kan erstatte en asparagin og omvendt. Generelt påvirker substitutioner, deletioner og additioner ved N-terminalen funktionen i mindre grad end ved C-terminalen.
- I et fjerde aspekt tilvejebringer opfindelsen en DNA-kodningssekvens som
- 25 ovenfor beskrevet i et ekspressionsvehikel, der er egnet til transformation af en mikrobiel vært. Ekspressionsvehiklet kan have et kontrolområde for kodningssekvensen, idet kontrolområdet omfatter en startkodon ovenstrøms for genet, og genet befinder sig i en passende læseramme i forhold til startkodonen eller ekspressionsvehiklet, kan sørge for indføjelse af kodningssekvensen i en endogent arvelig enhed, således at kodningssekvensen er under kontrol af et så-
- 30 dant kontrolområde deri. Kontrolområdet kan omfatte det naturlige virale kontrolområde, et kontrolområde for lactostreptococcer (såsom lactoseoperonen)

eller et andet kontrolområde, der, fortrinsvis inducerbart, kontrollerer ekspres-  
sion af genet i den mikrobielle vært. I *E. coli* kan der fx. anvendes lac-  
kontrolelementerne eller kontrolelementerne af arabinose, colicine E1, galacto-  
se, alkalisk phosphatase, tryptophan eller lambda-operonerne. I gær (fx. *Sac-*  
5 *charomyces cerevisiae*) kan der anvendes promotorerne for phosphoglyceroki-  
nase eller for galactose.

I et femte aspekt tilvejebringer opfindelsen en mikrobiel vært, der er transfor-  
meret med et sådant ekspressionsvehikel og i stand til at udtrykke lysinkod-  
10 ningssekvensen. Den mikrobielle vært kan være en hvilken som helst mikroor-  
ganisme, der har vist sig at være i stand til at udtrykke dette lysingen, og den  
kan være en bakterie (såsom *E. coli* eller *Bacillus subtilis*), en svamp (såsom *S.*  
*cerevisiae* eller *Aspergillus nidulans*), en plantecelle, en planteprotoplast eller  
en dyrecelle. Fortrinsvis er værten *B. subtilis* eller *Lactobacillus*.

15 Under forudsætning af at værtens cellevæg ikke selv nedbrydes med lysin, kan  
den lysin-udskillende, transformerede vært være anvendelig til undertrykkelse  
af bakteriepopulationer, der er modtagelige over for lysis med lysinet.

20 I et sjette aspekt tilvejebringer opfindelsen et polypeptid stammende fra eks-  
pressionen af lysinkodningssekvensen i en egnet mikrobiel vært, der er trans-  
formeret med et sådant ekspressionsvehikel. Opfindelsen angår også klonings-  
vehikler, der omfatter sådanne kodningssekvenser.

25 I et syvende aspekt tilvejebringer opfindelsen en fremgangsmåde til i det mind-  
ste delvis isolering af lysingenet fra en bakteriofag med prolathoved ved ud fra  
dens DNA at fremstille restriktionsfragmentet EcoRV-EcoRI i fig. 7 eller et til-  
svarende fragment deraf, fortrinsvis isoleret fra ved siden af beliggende bakte-  
riofagsekvenser. (EcoRI-restriktionsstedet er faktisk blevet kunstigt skabt ved  
30 addition af en EcoRI-linker til et AluI-sted.) Lysingenet af andre bakteriofager  
end  $\Phi$ vML3 kan i almindelighed opnås ved identificering af det bakteriecelle-  
væg-lyserende proteolytiske enzym deraf, sekvensbestemmelse deraf, frem-  
stilling af en mRNA-probe og isolering af genet, alt sammen på kendte måder.

- I et ottende aspekt tilvejebringer opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af ost, hvilken fremgangsmåde omfatter, at man lyserer bakteriestarterkulturen på et forud fastlagt tidspunkt under fremstillingen af osten ved tilsætning af et
- 5 Lactococcus bakteriofaglysin. Egnede starterkulturbakterier omfatter Lactococcus lactis subsp. lactis og cremoris. Fortrinsvis tilsættes lysinet ved slutningen af mælkefermentationen, således at fermentationens starterceller bliver lyseret og de intracellulære enzymer således frigøres. Nogle af disse enzymer kan så sørge for udviklingen af ostens modne smag, og således kan fremgangsmåden
- 10 ifølge opfindelsen anvendes til fremskyndelse af ostens modning. Lysinet, i det mindste i de påkrævede mængder, gør ikke den resulterende ost uegnet til human fortæring og kan let fjernes fra ostefremstillingsbeholderen eller uskadeliggøres før tilsætning af den næste starterkultur.
- 15 I et niende aspekt tilvejebringer opfindelsen ost, der er fremstillet ved en sådan fremgangsmåde.

Bakteriofager med prolathoved omfatter følgende bakteriofager af Lactococcus lactis:

|    |                    |                     |
|----|--------------------|---------------------|
| 20 | <u>Bakteriofag</u> | <u>Underart</u>     |
|    | c2                 | lactis c2           |
|    | c6a                | lactis c6 eller c10 |
|    | c6B                | lactis c6 eller c10 |
|    | c6D                | lactis c6 eller c10 |
| 25 | C10I               | lactis c10          |
|    | C10w               | lactis c10          |
|    | drc1               | lactis DRC1         |
|    | 643                | lactis C8           |

- 30 I alle de ovenfor beskrevne aspekter af opfindelsen er lysinet fortrinsvis lysinet fra bakteriofag  $\Phi$ vML3. Bakteriofagen er velkendt, men for at udelukke enhver tvivl er den blevet deponeret hos The National Collection of Industrial and Ma-

rine Bacteria, Aberdeen, iht. til Budapest-traktatens bestemmelser. Deponeringsdagen var den 5. juli 1989, og løbenummeret er NCIMB 40160.

Den naturlige vært for  $\Phi$ vML3, nemlig *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3,  
5 blev ligeledes deponeret d. 5. juli 1989 som NCIMB 40161.

Fagmanden vil let være i stand til at bestemme de bedste anvendelsesbetingelser for lysinet, fx. tilsætningstidspunktet for lysinet, mængden, der skal tilsættes, arten af præparatet, der skal tilsættes, osv. Disse betingelser kan variere  
10 re alt efter, hvilken type ost der fremstilles. I almindelighed tilsættes lysinet imidlertid som et lille volumen, fortrinsvis ikke over 5% eller 1% af ostekulturens volumen) steril opløsning til opnåelse af en koncentration på mellem 0,01  $\mu$ g/l og 1500 mg/l i ostefermentationskulturen, eller lysinet kan indkapsles i kapsler, eksempelvis liposomer (som i Kirby et al. (1987) *Int. J. Food Sci. Tech.* 22,  
15 355-375) og tilsættes ved starten for forsinket afgivelse.

Foretrukne udførelsesformer af opfindelsen belyses nærmere i de følgende eksempler og under henvisning til tegningen, hvor

20 fig. 1 (på to ark) er et skema over genkloningstrinnene, der anvendes til isolering af  $\Phi$ vML3-lysingenet,

fig. 2 er et fotografi af vektor g.gt10 plaquer og kloner, der udtrykker lysingenet af bakteriofag  $\Phi$ vM13,

25

fig. 3 er et fotografi af en *E. coli* stamme, der bærer klonet pFI106, der udtrykker bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysin,

fig. 4 er et restriktions- og deletionskort over et fragment af bakteriofag  $\Phi$ vML3,  
30 der koder for lysingenet,

fig. 5 er en fluorograf af proteiner, der udtrykkes af pUC13 plasmidvektor DNA, af plasmid pFI106, der udtrykker lysin, og af plasmid pFI115, der ikke udtrykker lysin,

- 5 fig. 6 er et skema, der viser den anvendte DNA-sekvensbestemmelsesstrategi, og

fig. 7 viser hele sekvensen af et 1,2 kb fragment af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA, der koder for lysingenet, der blev klonet i g.gt10-lysin 4, inklusive DNA-  
10 sekvensen og den deraf afledte aminosyresekvens for bakteriofaglysingenet.

### EKSEMPEL 1

#### Kloning af lysingen etc.

- 15 Fremstilling af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA

Højtiter bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysater fremstilledes ved at inokkulere 500 ml lactose M17 næringssubstrat (Terzagh & Sandine, 1975) med 2% lactose M17 næringssubstratkultur af *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3, der var blevet dyrket natten over. Den kan frit opnås fra The National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, Berks., U.K. Kulturen dyrkedes til en O.D. 600 på  $1,00 \pm 0,05$ , og 5 ml 0,05 M calciumborgluconat og 10 ml  $\Phi$ vML3 bakteriofaglysate med en koncentration på  $3,3 \times 10^{10}$  plaque-dannende enheder pr. ml tilsattes.  
20  $\Phi$ vML3 kan også frit opnås fra NCFB. Inkubation fortsattes, indtil der optrådte komplet lysis og der ikke iagttoges et yderligere fald i den optiske densitet (den optiske densitet faldt til en O.D. 600 på 0,34). Celleaffald fjernedes ved centrifugering ved  $8000 \times g$  i 15 minutter.

Bakteriofager koncentreredes ved centrifugering af lysatet ved  $125.000 \times g$  i 3 timer. Supernatanten fjernedes, og bakteriofagpelletten resuspenderedes ved henstand natten over ved 40°C i 8 ml puffer med sammensætningen 0,01 M Tris hydrochlorid, 0,1 mM EDTA, 1 mM magnesiumsulfat, pH 8,0.  
30

Bakteriofagsuspensionen centrifugeredes ved  $1.600 \times g$  i 5 minutter, og 4 ml af supernatanten aflejredes på en trinvis gradient fremstillet ud fra 2 ml portioner af cæsiumchloridopløsninger i puffer (som ovenfor), med en specifik gravitet på hhv. 1,6, 1,5, 1,4 og 1,3. Gradienterne centrifugeredes ved  $92.000 \times g$  i 2 timer ved 50°C i en udsvingbar centrifugerotor. Det resulterende bakteriofagbånd fjernedes fra gradienten med en lille hypodermisk sprøjte i et volumen på ca. 0,5 ml og blandedes med et lige så stort volumen mættet cæsiumchloridopløsning i puffer (som ovenfor). Blandingen anbragtes på bunden af en ligeledes trinvis gradient og centrifugeredes som før, og igen fjernedes bakteriofagbåndet og anbragtes i et 1,5 ml Eppendorf-rør.

Højttiter-bakteriofagsuspensionen lyseredes til frigørelse af DNA ved at erstatte toppen af Eppendorf-røret, med en dialysemembran, holdt på plads med et stramt gummibånd, og udføre dialyse i 18 timer ved stuetemperatur mod 50% formamid i en puffer med sammensætningen 0,1 M Tris hydrochlorid, 0,01 M EDTA, pH 8,5. Formamid fjernedes ved dialyse i 24 timer ved 40°C over for en puffer med sammensætningen 0,1 M Tris hydrochlorid, 0,1 mM EDTA, pH 7,5. Det resulterende bakteriofag-DNA rensedes ved cæsiumchlorid-ethidiumbromid ligevægtsdensitetscentrifugering i 60 timer ved  $125.000 \times g$ . DNA-båndet synliggjordes under ultraviolet lys og fjernedes med en lille hypodermisk sprøjte. Ethidiumbromid ekstraheredes med cæsiumchloridmættet isoamylalkohol, og cæsiumchlorid fjernedes ved dialyse i 24 timer ved 40°C over for en puffer med sammensætningen 0,1 M Tris hydrochlorid, 0,1 mM EDTA, pH 7,5.

#### 25 Kloning af bakteriofag $\Phi$ vML3 lysingenet

Bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA'et var et 23,3 kb molekyle med 3 genkendelsessteder for restriktionsendonuklease EcoRI. Et restriktionskort over bakteriofagen er vist i fig. 1. Bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA blev delvist nedbrudt med restriktionsendonuklease AluI i en reaktionspuffer til fremstilling af vilkårlige stumpendede DNA-fragmenter. Disse fragmenter adskiltes ved elektroforese ved 40°C i agarose med lavt smeltepunkt (Sigma), og området med adskilte DNA-holdige fragmenter i størrelsesintervallet 0,5 til 4,0 kb blev udskåret fra gelen. Agarose-

- blokken blandedes med 5 vol. puffer med sammensætningen 20 mM Tris hydrochlorid, 1 mM EDTA, pH 8,0, og smeltedes ved opvarmning til 650C i 5 minutter. Ved stuetemperatur ekstraheredes DNA'et og agaroseopløsningen successivt med lige store volumener af phenol, phenol-chloroform og chloroform,
- 5 og DNA'et fjernedes ved ethanoludfældning og resuspension i TE-puffer. 8 bp phosphorylerede linkere med DNA-sekvensen 5'-GGAATTCC-3' (Pharmacia), der omfatter genkendelsesstedet for restriktionsendonuklease ECORI, lignedes til de rensede stumpendede fragmenter af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA. Ligeringen udførtes natten over ved 150C i en reaktionsblanding bestående af
- 10 stumpendede  $\Phi$ vML3 DNA fragmenter, linker DNA og 5 enheder DNA-ligaseenzym (Boehringer Mannheim) i 50  $\mu$ l puffer med sammensætningen 70 mM Tris hydrochlorid, 7 mM magnesiumchlorid, 0,07 mM ATP, pH 7,5. Reaktionen standsedes ved inkubation i 10 minutter ved 650C, og linkerne blev trimmet ved nedbrydning ved 370C i 2 timer med restriktionsendonuklease EcoRI i
- 15 100  $\mu$ l puffer med sammensætningen 100 mM Tris hydrochlorid, 50 mM natriumchlorid, 10 mM magnesiumchlorid, pH 7,5. Reaktionen standsedes ved phenolekstraktion, og fragmenterne af bakteriofag  $\Phi$ vML3 rensedes ved kromatografi over en NENSORB 20 kolonne (DuPont).
- 20 Rensede, EcoRI-nedbrudte og dephosphorylerede DNA-arme af bakteriofag lambda-vektor g.gt10 indkøbtes hos Northumbria Biologicals Ltd. og ligeredes med rene DNA-fragmenter af  $\Phi$ vML3 DNA ved inkubation natten over ved 40C med 1 enhed DNA-ligase pr. 10  $\mu$ l i en reaktionspuffer indeholdende 50 mM Tris hydrochlorid, 7 mM magnesiumchlorid, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, pH
- 25 8. Ligeret DNA pakkedes in vitro i lambda-bakteriofag under anvendelse af rå celleekstrakter fremstillet som beskrevet af Scalenghe et al. (1981) og Hohn (1979). Nedfrosne/optøede lysater (FTL) fremstilledes ud fra E. coli stamme BHB2688, og soniske ekstrakter fremstilledes ud fra E. coli stamme BHB 2690. In vitro pakningsreaktionen udførtes ved sekventiel tilsætning af 350  $\mu$ l puffer
- 30 med sammensætningen 20 mM Tris hydrochlorid, 3 mM magnesiumchlorid, 0,05%  $\beta$ -mercaptoethanol, 1  $\mu$ M EDTA, pH 8,0; 50  $\mu$ l ligeret DNA; 50  $\mu$ l puffer bestående af 30 mM spermine-trihydrochlorid, pH 7,0, 30 mM putrescine-dihydrochlorid, pH 7,0, 18 mM magnesiumchlorid, 15 mM ATP, 1,2%  $\beta$ -

mercaptoethanol; 175  $\mu$ l sonisk ekstrakt (SE); 250  $\mu$ l nedfrosset/optøet ekstrakt (FTL). Blandingen inkuberedes i 90 minutter ved stuetemperatur, og 11,5 ml lambda-puffer med sammensætningen 6 mM Tris hydrochlorid, 10 mM magnesiumchlorid, 100 mM natriumchlorid, 0,5 mg/ml gelatine, pH 8,0, tilsattes sammen med 50  $\mu$ l chloroform. Bakteriofag lambda-suspensionen udpletteredes på *E. coli* værtsstammen C600 hfl under anvendelse af NZY agarplader. Lambda-plaquer, der udtrykte bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysingenet, påvistes ved overlejring med en suspension af *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1196 celler i 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 6,7, med 0,7% agarose. Plader inkuberedes ved 300C i 6 timer, og kloner, der udtrykte bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysin, frembragte et klaringsområde over lambda-plaquen som vist i fig. 2. En samling på 50 kloner, der hver især udtrykte lysin, oprensedes ved enkelt-plaque isolering og gemtes.

I fig. 2 vises plaquer af g.gt10 med vilkårligt klonede fragmenter af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA. Plaquerne overlejres med *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* celler. Lambda-kloner, der udtrykker et klonet lysingen (forsynet med pil), har frembragt et klart vindue i denne plet og fremtræder mørke, hvorimod andre lambda-plaquer bibeholder et uklart udseende.

#### Karakterisering af bakteriofag $\Phi$ vML3 lysingen

En bakteriofag lambda-klon, der udtrykker bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysingenet (g.gt10-lysin 4), blev karakteriseret mere detaljeret. Bakteriofag lambda-lysat fremstilledes i stor målestok, og DNA ekstraheredes som beskrevet ovenfor for bakteriofag  $\Phi$ vML3. Nedbrydning med restriktionsendonuklease EcoRI afslørede tilstedeværelsen af et 1,2 kb DNA-fragment fra bakteriofag  $\Phi$ vML3, der var blevet klonet i EcoRI-stedet af lambda-vektor 2.gt.10.

Dette fragment re-klonedes i EcoRI-stedet af *E. coli* plasmid vektor pUC13. Både vektor DNA og g.gt10-lysin 4 DNA blev nedbrudt med restriktionsendonuklease EcoRI under anvendelse af en puffer med sammensætningen 100 mM Tris hydrochlorid, 50 mM natriumchlorid, 10 mM magnesiumchlorid, pH

7,5. Reaktionen standsedes ved phenolekstraktion, og en blanding af de spaltede DNA'er inkuberedes natten over ved 15°C med 1 enhed DNA-ligase i en reaktionspuffer med sammensætningen 50 mM Tris hydrochlorid, 7 mM magnesiumchlorid, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, pH 8. Ligeret DNA transformeredes i kompetente celler af *E. coli* stamme TBI, og ampicillin-resistente kolonier udvalgte på B-agar indeholdende IPTG og "Bluogal" (BRL). Vektorer med klonet DNA identificeredes ved deres hvide farve. Deres evne til at producere bakteriofag  $\Phi$ vML3-lysin testedes ved overlejring af kolonier med en suspension af *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1196 celler i 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 6,7, med 0,7% agarose. Der påvistes klarede zoner, som vist i fig. 3, for én isoleret klon. (I fig. 3 overlejres kolonier af *Escherichia coli*, der bærer plasmid pFI 106, med *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* celler. Ekspression af lysin giver en klar lysinzone i den uklare plet af *Lactococcus* celler). Plasmidet fra denne klon, betegnet pFI106, isoleredes og analyseredes ved restriktionsendonukleasekortlægning. Det havde den i fig. 4 viste struktur.

I fig. 4 bekræftes det uafhængigt fremstillede restriktionskort af data stammende fra DNA-sekvensen. (RI: EcoRI, M: MluI, RV: EcoRV, HII: HaeII, Mb: MboI, D: DraI, H: HincII, Dd: DdeI, HIII: HaeIII, B: BanI, C: CfoI, N: NarI, T: TaqI). De nøjagtige beliggenheder af lysingenet og ORF1 bliver udledt af sekvensanalysen. Den brudte linie for ORF1 viser dens mulige udstrækning ovenstrøms for methioninrester påvist ved sekvensanalyse. I deletionsanalysen vises områder med DNA bevaret i sub-kloner med fuldt optrukne linier. Tilstedeværelse eller fravær af lysinaktivitet i disse konstruktioner er vist med + eller -.

25

1,2 kb fragmentet af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA, der udtrykte lysinaktivitet, reklonedes under anvendelse af den ovenfor for vektor pUC13 beskrevne strategi, men i *Streptococcus lactis* vektorerne pCK1, pCK536 og pTG262. Kloner udvalgte iht. deres resistens over for chloramphenicol og påvistes ved deres evne til at producere lysin, når de overlejredes med *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 1196 celler som beskrevet ovenfor. Eksempler på klonkonstruktioner bestående af *Streptococcus lactis* vektorer, der er i stand til at udtrykke lysingenet af bakteriofag  $\Phi$ vML3, er vist i fig. 1.

30

Ud fra pFI106 fremstilledes en række deleterede derivater af det klonede 1,2 kb fragment af bakteriofag  $\Phi$ vML3 DNA under anvendelse af restriktionsendonukleasenedbrydning og enten re-ligation eller re-kloning i en anden vektor. Konstruktionsdetaljerne og strukturerne af disse derivater er vist i fig. 4. Alle derivater testedes for deres evne til at fremstille bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysin, og resultaterne er også vist i fig. 4. Ud fra resultaterne var det muligt at definere området af bakteriofag  $\Phi$ vML3, der koder for lysingenet. Det befinder sig mellem koordinat 0,37 (DraI-sted) og koordinat 1,2 (EcoRI-sted) på restriktionsendonukleasekortet i fig. 4. DNA-området mellem koordinat 0,565 (HincII-sted) og koordinat 0,71 (HincII-sted) er essentielt for ekspressionen af lysin, og dette område er deleteret i plasmidderivatet pFI115 som vist i fig. 4.

Proteinerne, der kodes for af plasmid pFI106, der udtrykker bakteriofag  $\Phi$ vML3 lysinet, og derivatplasmidet pFI115, der ikke udtrykker lysin, sammenlignedes under anvendelse af in vitro transkriptions- og translationsteknikken. Radioaktivt mærket 35S L-methionin inkorporeredes i proteiner, der udtryktes af disse plasmid DNA'er, under anvendelse af reagenser fra et kommercielt tilgængeligt sæt og de deri anviste metoder (Amersham). Radiomærkede proteiner, der blev udtrykt, adskiltes ved SDS-polyacrylamidgelelektroforese og påvistes ved fluorografi. Som vist i fig. 5 udtrykte plasmid pFI106 et protein på 23 kd, der hverken blev udtrykt af vektoren pUC13 eller af det deleterede derivatplasmid pFI115. Lysinenzymet af bakteriofag  $\Phi$ vML3 er blevet påvist at være et protein på 23 kd.

I fig. 5 består fluorografen af radioaktivt mærkede proteiner, udtrykt af plasmidvektorer og kloner under in vitro transkription/translation og adskilt ved SDS-polyacrylamidgelelektroforese. Der er vist 35S-mærkede proteiner udtrykt med pAT153 kontrol-DNA (spor A), intet DNA (spor B), pUC19 vektor DNA (spor C), pFI106 DNA, der udtrykker klonet lysin (spor D), og pFI115 DNA, hvori en del af lysingenet er deleteret (spor E). Proteinmolekylvægtstandarder mærket med 14C er vist på venstre side.

Som vist i fig. 6 blev 1,2 kb EcoRI-fragmentet, der indeholder  $\Phi$ vML3-lysingenet, og derivatfragmenter klonet i M13mp18. Klonerne anvendtes som kilde for DNA-templater til DNA-sekvensbestemmelse ved Sanger dideoxy-kædetermineringsmetoden. De bestemte DNA-sekvenser er vist ved pilenes  
5 retning og udstrækning. Sekvenser, der er vist ved pile med kasser, blev primet med syntetiske oligonukleotider udformet på grundlag af allerede bestemte sekvensdata. Disse syntetiske primere er også vist i fig. 6.

Udover sekvenser bestemt ved initiering ud fra M13 DNA under anvendelse af  
10 kommercielt tilgængelige M13 primere blev et antal syntetiske primere fremstillet ud fra  $\Phi$ vML3 DNA sekvenser, der allerede var blevet bestemt. De er ligeledes vist i fig. 7. Den komplette DNA-sekvens for begge strenge af 1,2 kb DNA-fragmentet af bakteriofag  $\Phi$ vML3 bestemtes. Den er vist i fig. 7. Sekvensen analyseredes under anvendelse af Stadens "Analseq"-program, der afslørede en åben læseramme, der stemte overens med beliggenheden af lysingenet som fastslået ved deletionskortlægning og lysinekspressionsbestemmelse  
15 (fig. 4) og med molekylvægten af lysinenzymet bestemt ved in vitro transkription og translation af plasmiderne pFI106 og pFI115. DNA-sekvensen for lysingenet af bakteriofag  $\Phi$ vML3 og den deraf udledte aminosyresekvens er vist i  
20 fig. 7.

I fig. 7 vises restriktionsendonukleasesteder, der anvendes til opbygning af M13mp18 kloner til sekvensbestemmelse. Fuldt optrukne linier viser de ved sekvensbestemmelsesstrategien anvendte syntetiske primere (fig. 4). Primerne  
25 1 og 3 var som vist, hvorimod primerne 2, 4 og 5 var den komplementære sekvens. Det strukturelle lysingenet befinder sig mellem position 593 og 1153. Dets aminosyresekvens og sekvensen af ORF1 er vist. For ORF1 er methioninrester inden for rammen indrammet. Den mulige *Streptococcus lactis* promotor (position 550 til 580) og ribosombindingsstedet (position 585) for lysingenet er også  
30 indrammet.

## EKSEMPEL 2

### Model for ostefremstillingsprocessen

#### Startercellelysis med klonet bakteriofaglysin

5

En *E. coli* stamme, der bærer plasmid pFI106, dyrkedes til stationær fase i L-næringssubstrat og vaskedes og resuspenderedes i 1/10 volumen puffer bestående af 0,1 M kaliumphosphat, pH 6,7. Celler blev sprængt med 4 ultrasoniske stød på hver 30 sekunder under anvendelse af en MSE-ultrasonikator.

10 Cellaaffald fjernedes ved centrifugering i 30 minutter ved 40C og 20.000 x g.

Supernatanten anvendtes som et rå lysinpræparat. En negativ kontrolprøve fremstilledes på samme måde ud fra en *E. coli* stamme med plasmid pFI115, der ikke udtrykker bakteriofag  $\Phi$ vML3-lysin. Celler af underarten *cremoris* suspenderet i puffer bestående af 0,1 M kaliumphosphat, pH 6,7, lyseredes hurtigt af det rå lysinpræparat: med lysin faldt OD<sub>600</sub> fra 1,2 til 0,19 på 7 minutter, hvorimod OD<sub>600</sub> uden lysin kun faldt til ca. 1,19. En ostestarterstamme af underarten *cremoris* dyrkedes i mælk i 6 timer i et forsøg, der dannede model for en mælkefermentation. Rå lysinpræparat, et lignende præparat fra den negative kontrolprøve og puffer sættes til tre separate portioner fermenteret mælk og opbevarede ved 40C. Antallet af levedygtige celler af underarten *cremoris* kontrolleredes, og som vist i tabel 1 iagttoges p.g.a. lysis et hurtigt tab af levedygtige celler i mælkefermentationen, der var blevet behandlet med rå lysinpræparat, men ikke i den negative kontrolprøve eller i pufferen.

Tabel 1

6 timers mælkefermentation under anvendelse af *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCDO 1196 starter

5 (oprindeligt antal levedygtige celler  $3,45 \times 10^9$ )

|    |                                     | Antallet af levedygtige celler |                   |                   | % levedygtighed |      |      |
|----|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------|------|
|    |                                     | 24 timer                       | 48 timer          | 72 timer          | 24h             | 48h  | 72h  |
| 10 | Ingen tilsætning                    | $2,9 \times 10^9$              | $2,8 \times 10^9$ | $1,6 \times 10^9$ | 81              | 81   | 46   |
|    | Ekstrakt af lysin-producerende klon | $1,5 \times 10^6$              | $1,5 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^5$ | 0,04            | 0,01 | 0,04 |
|    | Ekstrakt af lysin-negativ kontrol-  |                                |                   |                   |                 |      |      |
| 15 | prøve                               | $3,0 \times 10^9$              | $3,3 \times 10^9$ | $1,5 \times 10^9$ | 87              | 96   | 44   |

EKSEMPEL 3Fremstilling af lysinpræparat til ostefremstilling

20

En bakteriekultur, der udtrykker bakteriofaglysinet (fx. *E. coli*, der bærer plasmid pFI106), dyrkes natten over i næringssubstrat. En kultur (400 ml) centrifugeres, og cellerne resuspenderes i 1/10 volumen TE-puffer. Lysin frigøres fra cellerne, fx. ved tilsætning af chloroform og centrifugering. Den lysinrige super-

25

natant præcipiteres med 45% ammoniumsulfat, og pelleten resuspenderes i 3 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer, pH 6,7, og ledes gennem en PD10-kolonne til afsaltning af prøven. Yderligere rensning udføres ved F.P.L.C. under anvendelse af en anionbytterkolonne og en Sepharose, 6 gelfiltreringskolonne.

#### EKSEMPEL 4

##### Anvendelse af bakteriofaglysin ved fremstilling af cheddarost

Der følges en konventionel fremstillingsproces for cheddarost. Efter omrøring  
5 og saltning tilsættes et præparat af klonet bakteriofaglysin. Det inkorporerede  
lysin sikrer en hurtig lysis af starterkulturen og fremskynder ostens modning  
ved frigørelse af en smagsdannende blanding af starterenzzymer.

Alternativt indkapsles lysinet, således at tidspunktet for dets tilsætning ikke er  
10 af betydning. Indkapslingsmidlet opløses efter afslutning af ostefremstillings-  
processen, således at det ikke påvirker starterbakterierne, før deres rolle ved  
syningen er udspillet.

#### Referencer

15

B. Hohn (1979), Methods in Enzymology (ed., R. Wu), bind 68, 299-309,  
F. Scalenghe, E. Turco, J.E. Edstrom, V. Pirrotta og M. Melli (1981), Chromo-  
soma 32, 205-216,  
B.K. Terzaghi og N.E. Sandine (1975), Applied Microbiology 29, 807-813.

20

#### Nøgle til fig. 1A og 1B

Fig. 1A: A er et restriktionskort over  $\Phi$ vML3, der, ved pil 1, er delvist AluI-  
nedbrudt. Stumpendede fragmenter på 0,5-4,0 kb isoleres, liggeres med EcoR1-  
25 linkere og trimmes ved nedbrydning med EcoR1. B er et kort over vektor  
lambda.gt 10, hvor pil 2 repræsenterer EcoR1-nedbrydning og dephosphoryle-  
ring deraf til lambda.gt 10 arme. Ved pil 3 bliver produktet ligeret, pakket in vitro  
i lambda-fag og udpletteret på E. coli C6000 hfl<sup>r</sup> for påvisning af lysinprodukti-  
on. I trin 4 kombineres produkterne af trin 1 og 3 til dannelsen af en lysin-  
30 producerende klon lambda.gt.10-lysin 4, vist ved C. Denne nedbrydes (5) med  
EcoR1 og liggeres (6) med EcoR1-nedbrudt og dephosphoryleret vektor pUC13,  
vist ved D. Produktet transformeres i E. coli TB1 under anvendelse af agar med  
ampicillin, IPTG og Bluogal. Hvide, lysin-producerende kolonier udvælges.

Fig. 1B: Klon pFI106 (E) nedbrydes med EcoR1 og ligeres (7) med EcoR1-nedbrudt *Streptococcus lactis* vektor pCK536 (vist ved F) og (8) med EcoR1-nedbrudt vektor pCK1 (ved G). *E. coli* 1106 transformeres med produkterne af

5 trin 7 og 8, chloramphenicol-resistente kolonier udvælges, og der opnås to ampicillin-følsomme lysin-producerende kloner, pFI136 (vist ved H) og pFI137 (vist ved I).

## PATENTKRAV

1. Formulering omfattende lysinet af en Lactococcus bakteriofag eller en variant af et sådant lysin, som bibeholder mindst 10% af omtalte lysins bakteriecellevæg-nedbrydende aktivitet, hvilken formulering er egnet til tilsætning til ost eller til en osteprækursorblanding og er fri for bakteriofagen i aktiv form.
2. Formulering ifølge krav 1, hvori bakteriofagen er en bakteriofag med prolathoved.
3. Formulering ifølge krav 1 eller 2, hvori bakteriofagen er  $\Phi$ vML3.
4. Formulering ifølge et hvilket som helst af kravene 1 til 3, der er indkapslet i kapsler, der under en ostefremstillingsproces frigiver deres indhold på et forudbestemt tidspunkt.
5. Fremgangsmåde til fremstilling af ost, kendetegnet ved, at starterkulturen lyseres med lysin fra en Lactococcus bakteriofag eller en variant af et sådant lysin, der er fri for bakteriofagen i aktiv form.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, hvor bakteriofagen er en bakteriofag med prolathoved fortrinsvis  $\Phi$ vML3.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, hvor bakteriofagen er  $\Phi$ vML3.
8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 5-7, hvor lysinet tilsættes ved slutningen af mælkefermentationen.
9. Ost fremstillet ved fremgangsmåden ifølge et hvilket som helst af kravene 5-8.

10. Præparat af  $\Phi$ vML3-lysinet, kendetegnet ved, at det i det væsentlige er rent og er frit for aktiv  $\Phi$ vML3-bakteriofag, og hvor  $\Phi$ vML3-bakteriofagen i overensstemmelse med Budapest-Traktaten er deponeret i den skotske nationalsamling af industrielle bakterier og marinebakterier i Aberdeen (*National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK*) under accessionsnummer 40160.

11.  $\Phi$ vML3-gen eller DNA-kodningssekvens for lysin, isoleret fra generne, der normalt ville befinde sig umiddelbart ovenstrøms eller umiddelbart nedenstrøms for dette gen i  $\Phi$ vML3, kendetegnet ved, at nævnte gen eller kodningssekvens ligger inden for det omtrentlige 0,84 kb fragment af  $\Phi$ vML3-bakteriofagens genom, som er flankeret af sekvenserne 5'-TTTAAACAGACTG-GACTTGTTCCGC-3' og 5'-GAAGTGAAATAGGAGGAAGTGAATGAG-3', og hvor  $\Phi$ vML3-bakteriofaget i overensstemmelse med Budapest-Traktaten er deponeret i den skotske nationalsamling af industrielle bakterier og marinebakterier i Aberdeen (*National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeen, Scotland, UK*) under accessionsnummer 40160, eller en variant heraf, som indkoder et lysin, der bibeholder mindst 10% af den bakterielle cellevægsnedbrydende aktivitet i nævnte lysin.

20

12. DNA-kodningssekvens, omfattende DNA-kodningssekvensen i fig. 7 eller varianter deraf, som indkoder  $\Phi$ vML3 lysin eller en variant af  $\Phi$ vML3-lysinet, som indkoder et lysin, der bibeholder mindst 10% af den bakterielle cellevægsnedbrydende aktivitet i nævnte lysin.

25

13. DNA-konstruktion omfattende en kodningssekvens ifølge krav 11 eller 12 i et ekspressionsvehikel, der er egnet til transformation af en mikrobiel vært.

30

14. DNA-konstruktion ifølge krav 13, hvor ekspressionsvehiklet omfatter et ekspressionskontrolområde for kodningssekvensen omfattende det naturlige bakteriofagkontrolområde eller et *Streptococcus lactis* kontrolområde.

15. Mikrobiel vært, der er transformeret med en konstruktion ifølge krav 13 eller 14, og som er i stand til at udtrykke lysinkodningssekvensen.

16. Lysin stammende fra dyrkningen af en vært ifølge krav 15.

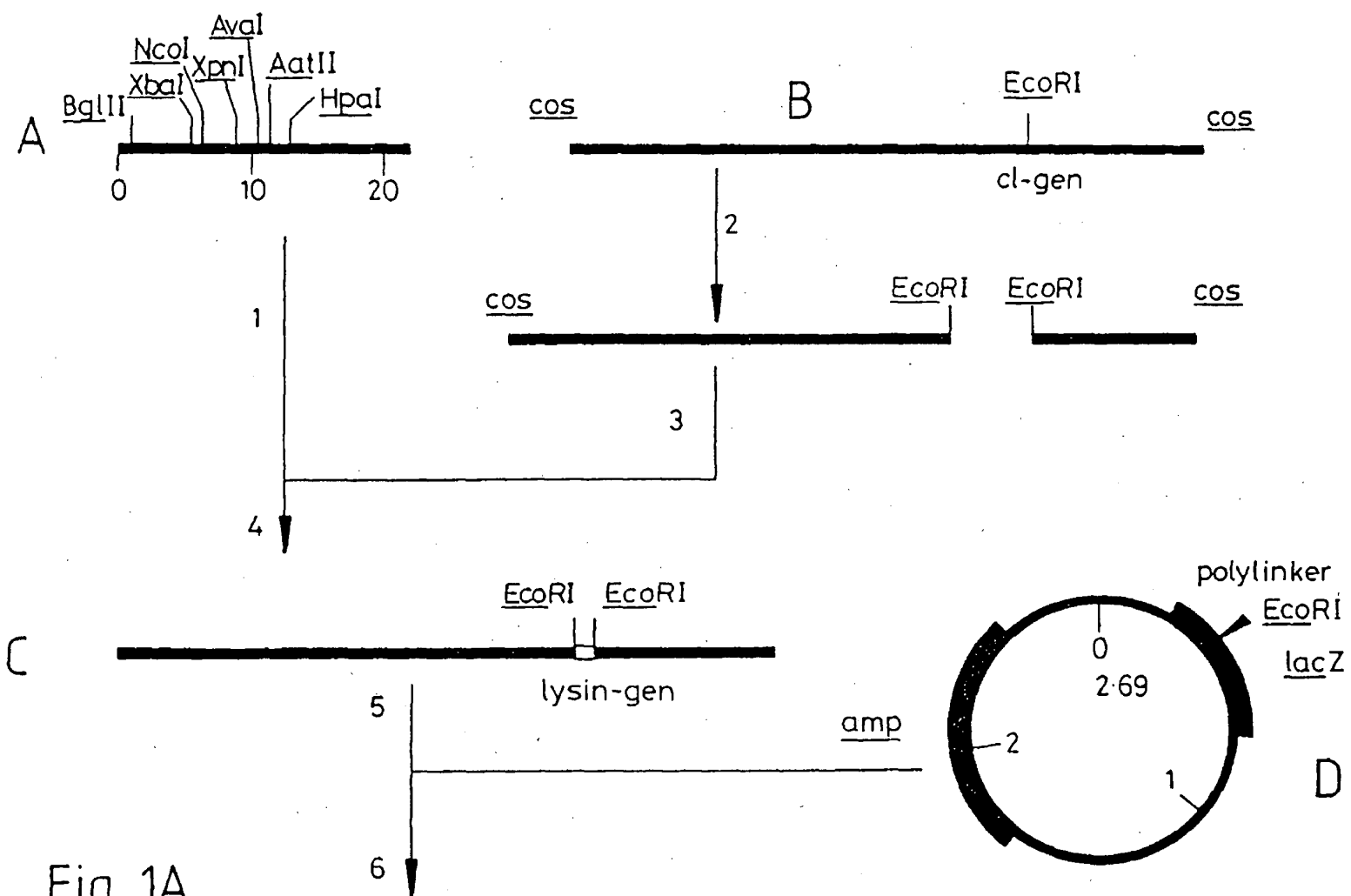


Fig. 1A

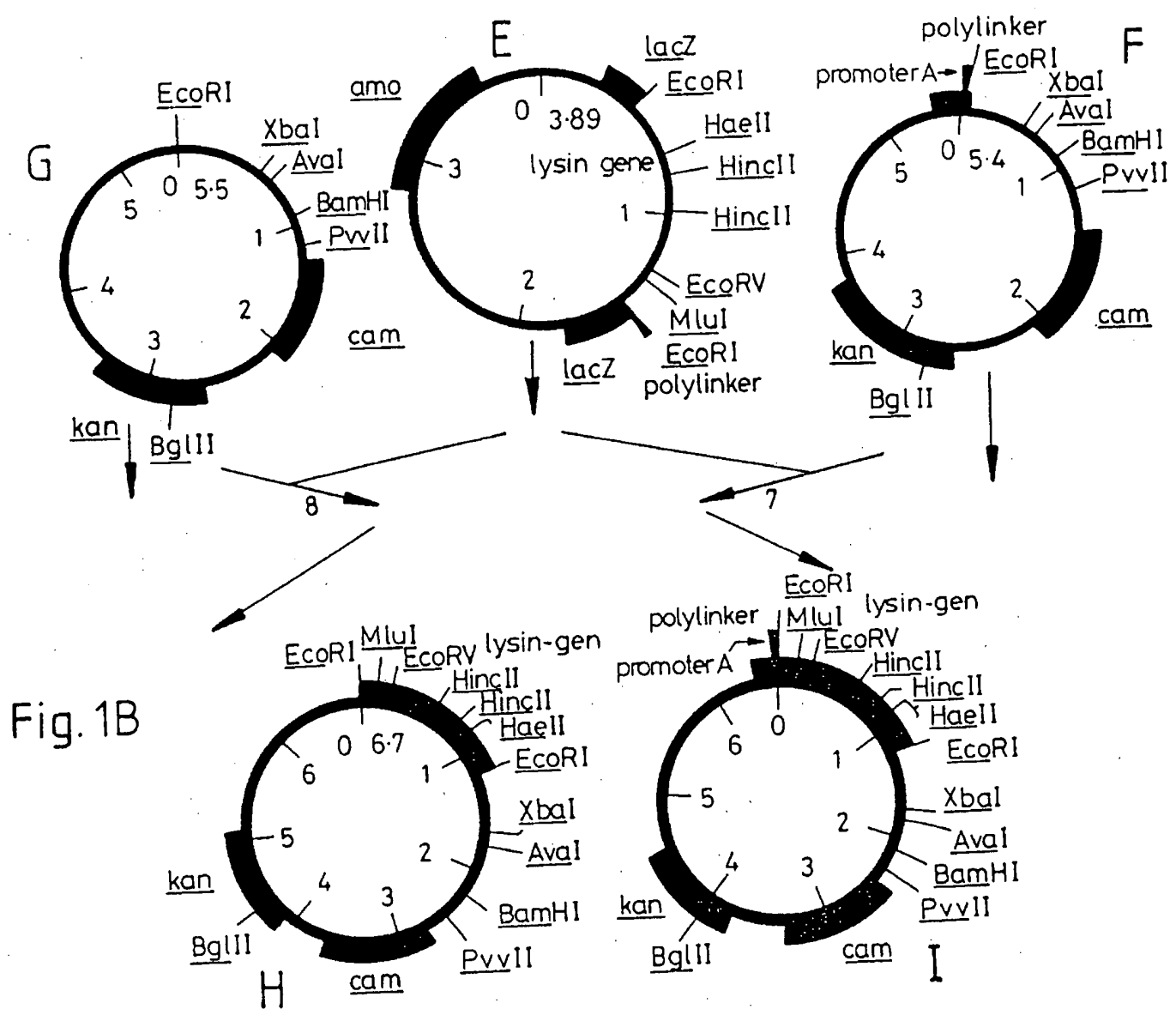


Fig. 1B

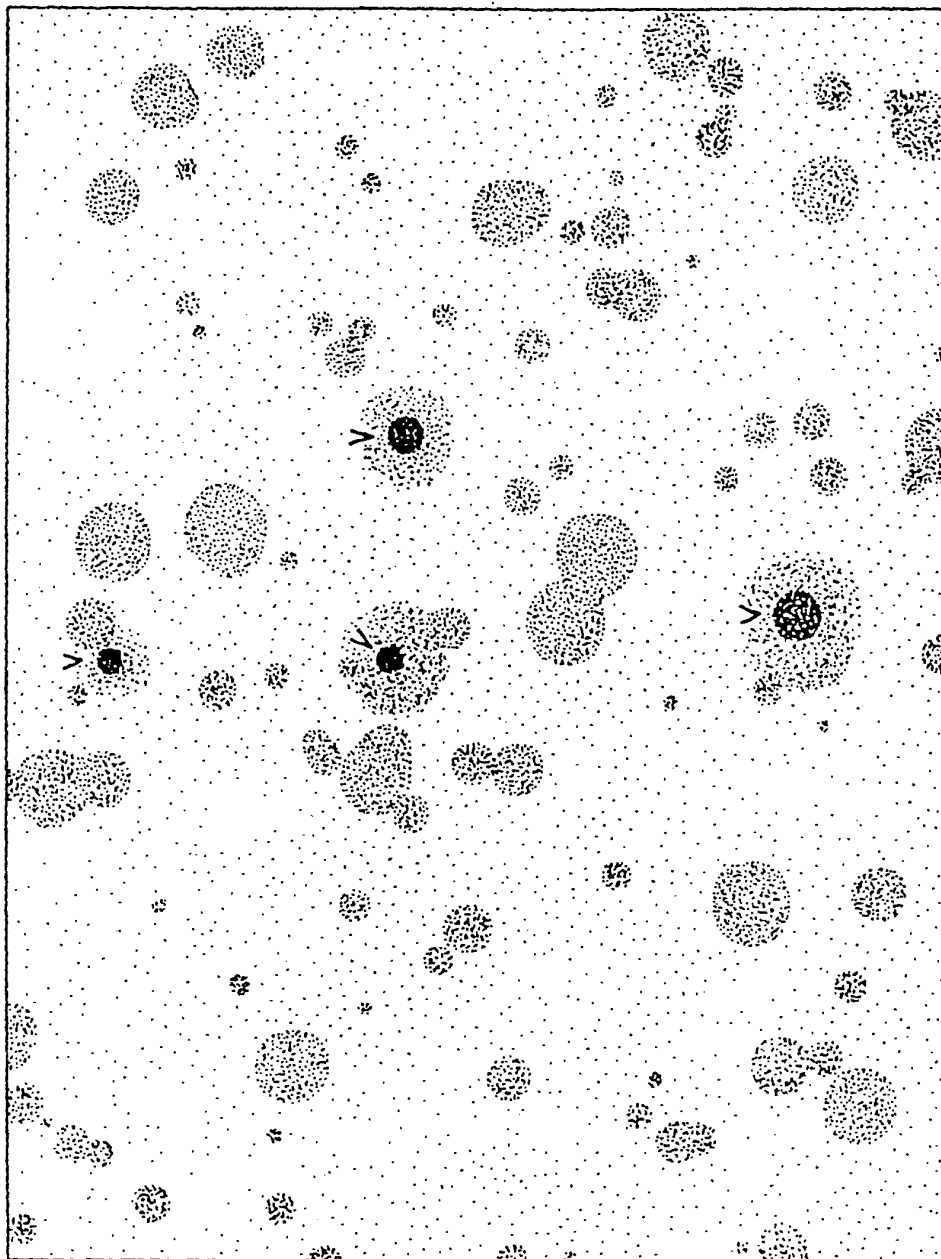


Fig. 2

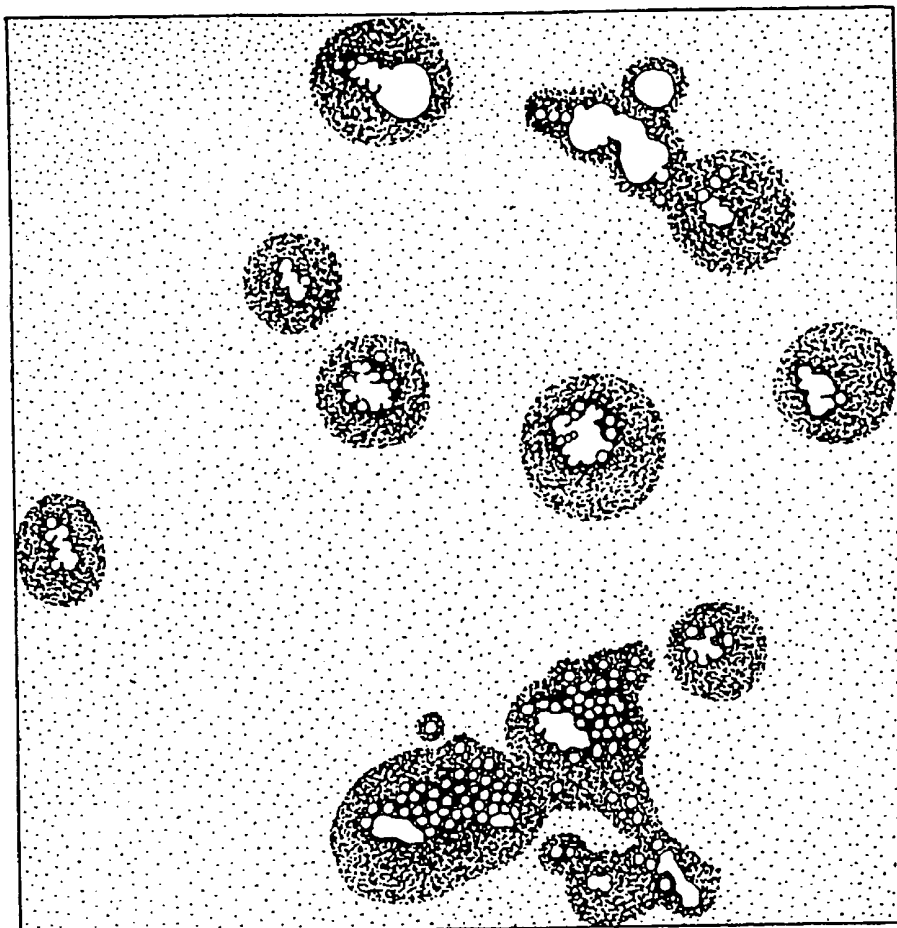


Fig. 3

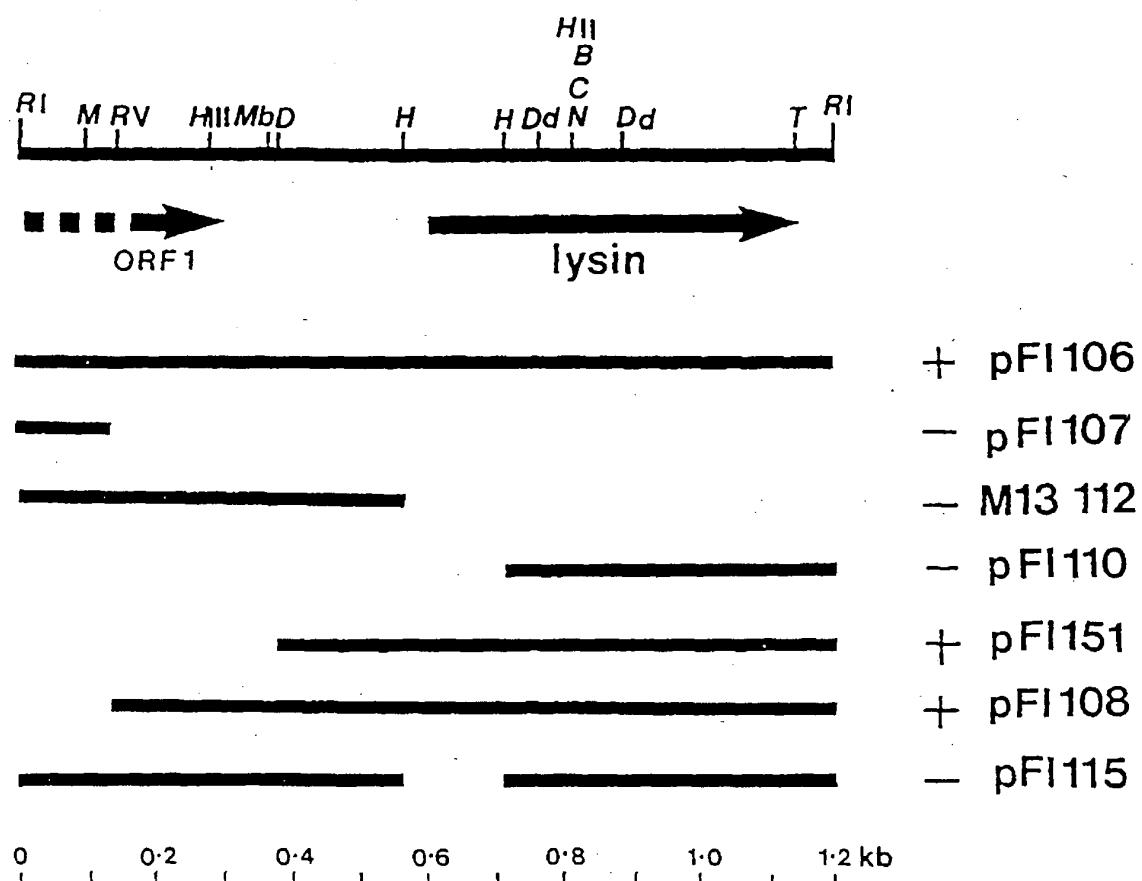


FIGURE 4

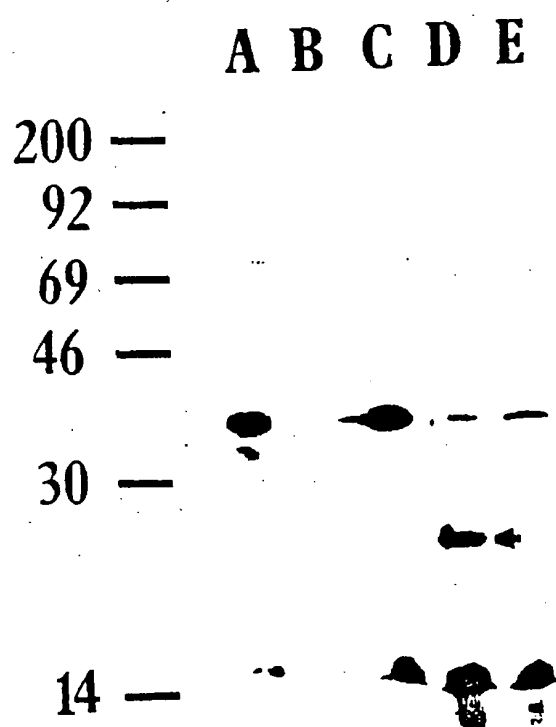


Figure 5

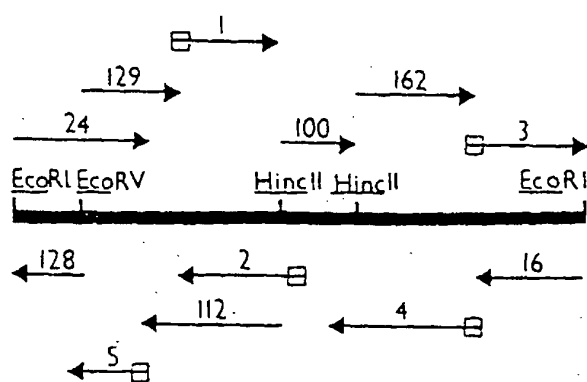


FIGURE 6

E F P S, K K D E G T G Y A F R K D G Q L Y V G S  
 GAATTCCTAGTAAGAAAGACGAGGGAACGGGTACGCCTTAGAAAAGACGGACAATTATATGTCGGTTCC 72  
EcoRI

I K A Y N A K K N A W E R T F D I V N A I K D I  
 ATTAAGCATATAACGCAAGAAAAACGGTGGGAACGTACTTTTGACATTGTGAACGCAATTAAAGATATC 144  
EcoRV

I D E F D L K D Y H M A I E T P I M G R N R K H  
 ATAGATGAGTTTGACTTAAAGACTATCACATGGCTATTGAAACGCCTATCATGGGTAGAAACAGAAAGCAC 216

S I T L A N C N G Y F I G A I D G L V N G L Y F  
 AGTATCACATTGGCTAATTGTAACGGTTATTTATCGGTGCTATTGACGGTCTAGTAAATGGCCTATACTTT 288

Y  
 TATTGATAACTCTAAATGGTGTAGCTATCATTTAATTTTCAGGCAAACGAGAACAACGAAAAGAAGAAAGTTT 360  
 5 1

GGAACTTTTAAACAGACTGGACTTGTTCCGCTTGATTGTAAAGATGATAACATGGCTGACGCTTATAACAT 432  
DraI

TTTGACATATTGCGAACACTTGGGTTAGTTGTTCCCTTATAAAAAACAATAATAAATTGGAGGTGGTAA 504

TATAAAGTATCACAAAACGGTTTGAACCTTGATTAAGAGTTTGAGGGTTGTAGGTTGACTGCTTATAAACCC 576  
HincII

M Y T I G W G H Y G V T A G T T W T Q  
 TGTACCGTGGGAACAAATGTACACTATCGGTTGGGGTCATTATGGAGTGACAGCAGGTACAACATGGACACA 648  
 2

A Q A D S Q L E I D I N N K Y A P M V D A Y V K  
 AGCTCAAGCAGATAGCCAGCTAGAGATTGACATCAATAATAAGTATGCACCTATGGTTGACGCTTACGTAAA 720  
HincII

G K A N Q N E F D A L V S L A Y N C G N V F V A  
 AGGCAAAGCAAATCAAATGAGTTTGACGCCTTAGTTTCATTGGCTTATAACTGTGGTAATGTTTTCGTTGC 792

D G W A P F S H A Y C A S M I P K Y R N A G G Q  
 TGACGGTTGGGCGCCTTTCTCACATGCTTATTGTGCTTCAATGATACCGAAGTATCGTAATGCAGGCGGTCA 864

V L Q G L V R R R Q A E L N L F N K P V S S N S  
 AGTCTTACAAGGCTTAGTAAGACGCAGACAGGCTTAACCTATTTAATAAACAGTATCAAGTAATTC 936  
 3

N Q N N Q T G G M I K M Y L I I G L D N S G K A  
 AAACCAAACAATCAAACAGGAGGAATGATAAAATGTACCTTATTATAGGACTAGATAATTCAGGTAAAGC 1008  
 4

K H W Y V S D G V S V R H V R T I R M L E N Y Q  
 TAAACATTGGTATGTTTCTGACGGTGTAAGTGTCGTCATGTTCTGACAATTCGTATGTTGGAAAACATATCA 1080

N K W A K L N L P V D T N V Y C R N R S R V W T  
 AAACAAATGGGCTAAACTTAACCTGCCAGTTGATACCAATGTTTATTGCAGAAATCGAAGCAGAGTTTGGAC 1152

GTAAGATTGACATGGCTTCAGGAGAAGTGAAATAGGAGGAAGTGAATGAGGGAATC  
EcoRI 1209

FIGURE 7