



(12) PATENT

(19) NO

(11) 340997

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 9/38 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01)

A23L 33/00 (2016.01)

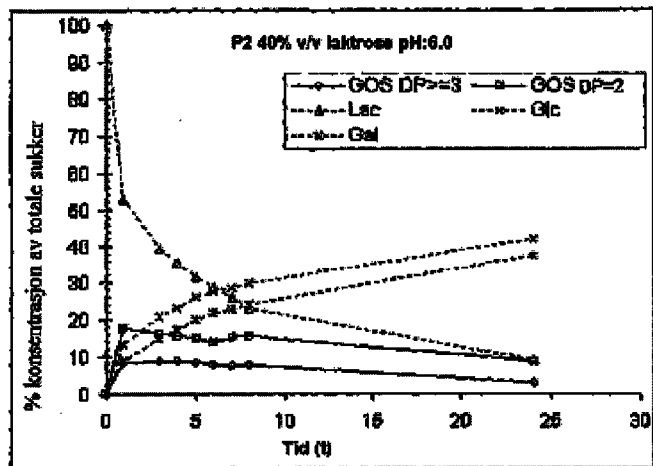
A23L 33/195 (2016.01)

A23K 10/16 (2016.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20083896	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2007.03.27 PCT/GB2007/01081
(22)	Inng.dag	2008.09.11	(85)	Videreføringsdag	2008.09.11
(24)	Løpedag	2007.03.27	(30)	Prioritet	2006.03.28, GB, 0606112.1
(41)	Alm.tilgj	2008.10.10			
(45)	Meddelt	2017.07.31			
(73)	Innehaver	Clasado Inc, Edificio Interseco, Piso 2, Calle Elvira Mendez 10, Apartado 0816-01560, PA-PANAMA, Panama			
(72)	Oppfinner	Georgios Tzortzis, 1 Kiln View Road, GB-RG27RR BERKSHIRE, READING, Storbritannia Theodoros Goulas, c/o Food Microbial Sciences Unit, School of Food Biosciences, The UNIV of Reading, GB-RG66AP BERKSHIRE, Storbritannia Athanasios K Goulas, c/o Food Microbial Sciences Unit, School of Food Biosciences, The UNIV of Reading, GB-RG66AP BERKSHIRE, Storbritannia			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	DNA-sekvens kodende for en β -galaktosidase, vektor, vertscelle, anvendelse av et enzym samt fremstilling derav og anvendelse av en vertscelle			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 2005003329 A			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse angår en ny β -galaktosidase med transgalaktosyleringsaktivitet, isolert fra *Bifidobacterium bifidum*. β -galaktosidase er i stand til omdannelse av laktose til en blanding av galaktooligosakkarider som er β -bundet, og uventet gir det α -bundne disakkaridet galaktobiose. Blandingen kan innføres i en rekke matprodukter eller dyrefôr for å forbedre tarmhelsen ved å fremme veksten av bifidobakterier i tarmen, og holde tilbake veksten av patogen mikroflora.



Foreliggende oppfinnelse angår DNA-sekvens kodende for en β -galaktosidase, vektor, vertscelle, anvendelse av et enzym samt fremstilling derav og anvendelse av en vertscelle. Den nye β -galaktosidasen har transgalaktosylerings-aktivitet, som er i stand til å omdanne laktose til en blanding av galaktooligosakkarider.

Spesielt er det beskrevet DNA-sekvenser som koder for det isolerte nye β -galaktosidase-enzymet, enzymet kodet for av en slik DNA-sekvens og en vertscelle som omfatter DNA-sekvensen eller inneholder en rekombinant vektor som inkorporerer DNA-sekvensen. Videre anvendelse av enzymet kodet for av en DNA-sekvens, eller av vertscellen som inneholder en DNA-sekvens eller rekombinant vektor, til produksjon av galaktooligosakkarider.

Bifidobakterier vokser naturlig i koloni i nedre del av tarmkanalen, som er et miljø med lite mono- og disakkarider, siden slike sukkere fortrinnsvis er oppbrukt av verten og mikrober til stede i den øvre delen av tarmkanalen. For å overleve i lavere del av tarmkanalen produserer bifidobakterier forskjellige typer exo- og endoglykosidaser i overflatebundet og/eller ekstracellulær form, som de kan anvende ulike karbohydrater fra.

Ved siden av hydrolaseaktivitet viser noen enzymer fra bifidobakterier transferase-aktivitet. Denne transglykosyleringsaktiviteten til glykosidaser blir i stor utstrekning anvendt til enzymatisk syntese av forskjellige oligosakkarider, som har vist seg å virke som vekstfremmende faktorer hos bifidobakterier.

Det er kjent at medlemmer av bifidobakterie-familien produserer β -galaktosidase enzymer som er involvert i bakteriell metabolisme av laktose. Møller, P.L. et al i Appl & Environ. Microbial., (2001), 62, (5), 2276-2283 beskriver isolering og karakterisering av tre β -galaktosidasegener fra en *Bifidobacterium bifidum* stamme. Det ble oppdaget at alle tre β -galaktosidaser hadde evne til å katalysere dannelsen av beta-bundne galaktooligosakkarider ved transgalaktosylering.

Dumortier et al i Carbohydrate Research, 201, (1990), 115-123 beskrev dannelsen av beta-bundne oligosakkarider ved en transgalaktosyleringsreaksjon under laktose

hydrolyse med *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Deres analyse av strukturen på blandingen med fremstilte oligosakkarider viste at bindingene var β -(1 $\rightarrow$ 3), β -(1 $\rightarrow$ 6) og β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galaktosyl bindinger. Dumortier foreslo at forbindelser produsert av *Bifidobacterium bifidum* er involvert i adhesjon av bakterier i tykktarmen.

5

WO 01/90317 beskriver en ny β -galaktosidase fra *Bifidobacterium bifidum*, spesielt en forkortet versjon av enzymet som har en høy transgalaktosyleringsaktivitet.

10

En stamme av *Bifidobacterium bifidum* er funnet, som er i stand til å danne galaktosidase enzymaktivitet som omdanner laktose til en ny blanding av galaktooligosakkarider, som uventet inneholder opptil 35% disakkarider inklusiv galabiose (Gal (α 1-6) - Gal). Dette disakkaridet er kjent (se Paton, J C og Paton, A W (1998), Clin. Microbiol. Revs., 11, 450-479; Carlsson, K A (1989), Ann. Reviews Biochem., 58, 309-350) å være et antiadhesiv, som er i stand til forebygge adhesjon av toksiner til tarmveggen, som f.eks. Shigatoksin og patogener som E. coli.

15

Denne stammen av *B bifidum* ble deponert under aksjonsnummer NCIMB 41171 ved The National Collection of Industrial & Marine Bacteria, Aberdeen, UK på 31. mars 2003. Den er også beskrevet i UK-patent nr. 2 412 380.

20

Det er nå blitt oppdaget at denne stammen av *B bifidum* produserer mange β -galaktosidaser, inkludert en ny β -galaktosidase. Dette enzymet produserer flere forskjellige oligosakkarider som er β -bundet.

25

Ifølge oppfinnelsen tilveiebringes DNA-sekvens, kodende for en β -galaktosidase, idet sekvensen er valgt fra sekvensen gitt i SEKV ID NR: 1 eller et fragment eller et degenerativ derav, idet nevnte degenerativ er fra 75% til 95% homolog.

30

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre DNA-sekvens ifølge krav 1, idet nevnte sekvens omfatter nukleotidsubstitusjoner, addisjoner eller delesjoner som resulterer i mindre enn 25% forandring i aminosyresekvensen som koder for SEKV ID NR: 2.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre DNA-sekvens ifølge krav 1 eller krav 2, idet nevnte sekvens omfatter nukleotidsubstitusjoner som resulterer i konservative aminosyresubstitusjoner.

5 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre β -galaktosidase enzym kodende for en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre β -galaktosidaseenzym omfattende en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2.

10

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre rekombinant vektor omfattende en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.

15

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre vektor ifølge krav 6, idet nevnte vektor er en ekspresjonsvektor.

20

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre vertscelle som er en gjærscelle, en soppcelle eller en bakteriell celle valgt fra gruppen bestående av Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus og Aspergillus omfattende en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre vertscelle omfattende vektoren ifølge krav 6 eller krav 7.

25

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre vertscelle ifølge krav 8 eller krav 9, idet cellen er valgt fra gruppen bestående av Bacillus subtilis, Bacillus circulans og Aspergillus niger.

30

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, eller en celle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for produksjon av en blanding av oligosakkarider.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, eller en celle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for å produsere en blanding av oligosakkarider som skal være del av et produkt valgt fra gruppen bestående av melkeprodukter, så som flytende melk, tørket melkepulver, babymelkedrikker, babyformuleringer, iskrem, yoghurt, ost, fermenterte melkeprodukter, drikker så som fruktjuice, barnemat, frokostblandinger, brød, kjeks, konfekt, kaker, mattilskudd, kosttilskudd, spiselige probiotikaprodukter, spiselige prebiotikaprodukter, dyrefôr, fjærkrefôr og medikamenter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for produksjon av et produkt valgt av gruppen bestående av melkeprodukter, så som flytende melk, tørket melkepulver, babymelkedrikker, babyformuleringer, iskrem, yoghurt, ost, fermenterte melkeprodukter, drikker så som fruktjuice, barnemat, frokostblandinger, brød, kjeks, konfekt, kaker, mattilskudd, kosttilskudd, spiselige probiotikaprodukter, spiselige prebiotikaprodukter, dyrefôr, fjærkrefôr og medikamenter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre fremgangsmåte for produksjon av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, omfattende dyrking av en vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10 i et egnet dyrkingsmedium under betingelser som tillater ekspresjon av nevnte enzym og utvinning av det resulterende enzymet fra kulturen.

Det er følgelig beskrevet en rekombinant vektor, fortrinnsvis en ekspresjonsvektor, omfattende en DNA-sekvens som definert ovenfor. En slik vektor kan innføres i en vertscelle som for eksempel en bakterie-, gjær- eller soppcelle. Alternativt kan DNA-sekvensen innføres i en slik vertscelle. En egnet vertscelle kan bli valgt fra gruppen omfattende *Bacillus subtilis* eller *Bacillus circulans*, *Escherichia* og *Aspergillus*, for eksempel *Aspergillus niger*.

Ved anvendelse av laktose som et substrat, gir enzymet kodet for av en DNA-sekvens som definert ovenfor en blanding av oligosakkarider omfattende disakkarider, som for eksempel Gal (β 1-3) Glc, Gal (β 1-3) Gal, Gal (β 1-6) Gal og Gal (α 1-6) Gal,

trisakkarider og tetrasakkarider som for eksempel Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc, Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Glc og Gal (β 1-6) Gal (β 1-6) Gal (β 1-4) Glc

Et enzym eller en vertscelle som beskrevet ovenfor kan bli anvendt til å produsere en blanding av galaktooligosakkarider, som kan bli del av et produkt til å forbedre tarmhelsen. Et slikt produkt kan bli valgt fra gruppen bestående av meieriprodukter (for eksempel flytende melk, tørket melkepulver som for eksempel helmelk i pulver form, skummetmelk i pulver form, fettfylt melk i pulver form, mysepulvere, baby melkedrikker, babyformuleringer, iskrem, yoghurt, ost, fermenterte meieriprodukter), drikker som for eksempel fruktjuice, barnemat, frokostblandinger, brød, kjekks, konfekt, kaker, mat-tilskudd, kost-tilskudd, dyrefôr, fjærkrefôr eller en hvilken som helst annen matvare eller drikk. Tilstedeværelsen av galaktooligosakkarider i slike produkter har den fordel å kunne øke veksten til helsefremmende Bifidobakterier i produktet eller i tarmfloraen på forbrukeren eller begge, etter inntak av produktet.

15

Alternativt kan oligosakkaridene produsert på en slik måte bli anvendt for fremstilling av et medikament, i for eksempel tablett- eller kapsel form, til å forebygge adhesjon av patogener eller toksiner produsert av patogener i tarmenveggen. Medikamentet kan administreres til en pasient, for eksempel etterfulgt av en antibiotika kur, som ofte endrer, eller til og med ødelegger normal frisk tarmflora.

20

Det er beskrevet måter for å produsere blandingen av galaktooligosakkarider, som omfatter kontakt mellom enzymet som definert ovenfor, med et laktoseholdig materiale, under betingelser som fører til dannelsen av den galaktooligosakkaride blandingen.

25

Egnet laktoseholdig materiale kan bli valgt fra kommersielt tilgjengelig laktose, helmelk, lettmelk, skummetmelk, myse, fettfylt melk og myse-permeat. Slike melkeprodukter kan skaffes fra kuer, bøfler, sauer eller geiter. Fettfylt melk er definert som helmelk som er blitt skummet for å fjerne melkefettet, som deretter blir erstattet ved tilsetning av vegetabilisk fett eller olje.

30

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser nukleotidsekvensen (SEKV ID NR. 1) til *Bifidobacterium bifidum* β -galaktosidase ifølge oppfinnelsen; og

5 Figur 2 viser den korresponderende aminosyresekvensen (SEKV ID NR. 2) til nukleotidsekvensen i Figur 1.

Figur 3 er en kurve som viser galaktooligosakkarid-syntesereaksjonen over tid, med β -galaktosidase og 40 % (vekt/vekt) laktose i 0,1M fosfatbuffer ved pH 6,0 som substrat; og

10 Figur 4 viser en Høy-ytelse anionbytterkromatogram av en galaktooligosakkarid-blanding syntetisert av β -galaktosidase fra *B. bifidum* NCIMB 41171 ved anvendelse av 40% (vekt/vekt) laktose i 0,1M fosfatbuffer ved pH 6,0 som substrat (Glc = glukose, Gal = galaktose, Lac = laktose, α (1-6) = galaktobiose, DP = grad av polymerisering).

15 Genomisk DNA ble isolert fra en *Bifidobacterium bifidum* stamme (NCIMB 41171) ved anvendelse av metoden ifølge Lawson *et al.* (1989) Fems Mikrobiol Letters, 65, (1-2), 41-45. DNA'et ble spaltet med restriksjonsenzymmer, og fragmenter med maksimal størrelse på 15 kbp, ble ligert med en pSP72 vektor som var blitt spaltet med de samme restriksjons-enzymene. *E. coli*-celler ble transformert med en vektor inneholdende insersjoner

20 bestående av PstI-, Eco RI-, Bam HI-, KpnI-, SmaI- eller HindIII-spaltet kromosomalt DNA fra *B. bifidum*. Kloner med β -galaktosidaseaktivitet ble valgt på Luria Bertani agarplater inneholdende p-nitrofenyl, X- β -Gal (5-brom-4-klor-3-indolyl- β -D-galactosid) og isopropyl- β -D-tiogalactosid (IPTG). Ligeringsblandinger med Pst I kromosomalt DNA ga opphav til 13 β -galaktosidase-positive kloner, hvorav én av disse ble identifisert som

25 pP2.

DNA-sekvensering av det innførte DNA-fragmentet P2 ble utført ved anvendelse av metoden "dideoxy chain-termination" av Sanger (Russel P., 2002 i Genetics, Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189) ved anvendelse av en BigDye Terminator V,3.0 syklus sekvenserings-kit (Applied Biosystems, USA). DNA sekvensen til P2 er vist i

30 Figur 1 (SEKV ID NR. 1).

Den åpne leserammen (ORF) ble lokalisert ved anvendelse av "ORF finder" fra NCBI (National Center of Biotechnology Information). Nukleotidsekvensen i Figur 1 ble

translatert i alle seks mulige leserammer og én åpen leseramme på 738 aminosyrer som kodet for en antatt β -galaktosidase, ble identifisert. Translasjonen er vist i Figur 2 (SEKV ID NR. 2).

- 5 Foreliggende oppfinnelse vil bli nærmere beskrevet ved henvisning i referansene til de følgende eksempler.

Eksempel 1

10 Materialer og metoder

Alle kjemikalier og media-tilberedninger som ble anvendt gjennom hele denne studien ble anskaffet fra Sigma (Dorset, UK), Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid (Basingstoke, UK), Qiagen (West Sussex, UK) og Promega (Southampton, UK).

15 Bakteriestammer

- Bifidobacterium bifidum* stammen (NCIMB 41171) ble holdt på kryogeniske kuler i Mikrobank rør ved -70°C . For senere forsøk ble stammen gjenopplivet på Wilkinson Chalgren (WC) agar (Oksoid, UK) og TPY medium (trypticase phyton yeast extract medium) og dyrket anaerobt (CO_2 og N_2 preparat henholdsvis 80 % og 20 %) ved 37°C i 20 48 timer. Koloniens morfologi og fravær av kontaminering ble testet ved gram-merking.

E. coli stammer

- Escherichia coli*-stammen DH5a som ble anvendt i denne studien, ble inkubert under vanlige aerobe betingelser ved 37°C i Luria Bertani (LB) agar eller medium (Sambrook J. og Russell W. D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) som ved behov ble tilsatt antibiotika (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 25 og/eller 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kloramfenikol), og 40 μl 2 % X- β -Gal, 7 μl 20% (isopropyl- β -D-tiogalaktosid) IPTG, på overflaten av en forhåndstilberedt 90mm agarplate.

- 30 *E. coli*-stammen DH5en (Invitrogen, Paisley, UK) (genotype: $\text{F}^- \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M}\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169 recA1 endA1 hsdR17}(\text{rk}^-, \text{mk}^-) \text{phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1}\lambda^-)$

er en α -galaktosidase-positiv stamme og ble anvendt i ekspresjonsforsøk og i andre genetiske manipulasjoner.

Genomisk DNA ekstraksjon fra *Bifidobacterium bifidum*

Ved bruk av følgende metode ble genomisk DNA isolert fra *Bifidobacterium bifidum* stammen (NCIMB 41171), hvor kromosomalt DNA ble fremstilt fra en celle-pellet høstet fra 100 ml WC anaerobt medium. Cellene ble resuspendert i 10 ml TES buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH8) og behandlet med 200 μ l lysozym / mutanolysin blanding (4:1, lysozym 10 mg/ml mutanolysin 1 mg/ml) i 30 minutter ved 37 °C. Cellene ble deretter behandlet med 200 μ l proteinase K (20 mg/ml) og 200 μ l RNase (begge 10 mg/ml), og inkubert i én time ved 65 °C. Til slutt ble cellene behandlet med 2 ml 10 % SDS og inkubert i 15 minutter ved 65 °C. 12 ml fenol/kloroform ble tilsatt, og ekstraksjonen ble gjentatt inntil vannfasen lett kunne separeres fra interfasen. Genomisk DNA ble utfelt med isopropanol og resuspendert i 10 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA (pH8). Genomisk DNA ble deretter spaltet med restriksjonsenzymmer, ligert inn i pSP72, spaltet med de samme enzymene og behandlet med alkalisk fosfatase. Spaltning av *B. bifidum* genomisk DNA ble utført ved bruk av *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *SmaI* og *KpnI*. Ligeringsblandinger ble anvendt for å transformere *E. coli* DH5a, og β -galaktosidase-positive kloner ble identifisert som blå kolonier på X-Gal-inneholdende plater.

Vektor DNA tilberedning

Vektoren som ble anvendt for kloning og ekspresjon gjennom hele denne studien var pSP72 (Promega, UK) (Krieg, P.A. og Melton, D.A. (1987). In vitro RNA-syntese ble utført med SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*. **155**: 397-415).

Denne vektoren ble valgt fordi α -fragmentet på β -galaktosidase mangler komplimentaktivitet som ikke blir kodet inn i pSP72. Denne vektoren inneholder ikke det korte *E. coli* DNA-segmentet som har regulatorisk sekvens, og kodende informasjon for de første 146 aminosyrene til β -galaktosidase, som i kombinasjon med *E. coli*-stammer (dvs DH5a) uttrykker den karboksyterminale del av denne β -galaktosidase, hvilket gir en aktiv β -galaktosidase (α -komplementering).

Vektoren ble spaltet med de følgende restriksjonsenzymmer: *Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Sma*I, *Kpn*I og *Eco*RI i henhold til produsentens instruksjoner, ved bruk av ti ganger
overskudd av enzym i forhold til DNA (enzym-enheter : µg DNA lik ti enheter enzym pr.
ett µg plasmid-DNA eller ti enzym-enheter pr. 0,5 pmol plasmid-DNA). Etter varme
5 inaktivering av enzymet (20 min ved 65°C) ble restriksjonsmønstrene analysert ved
horisontal gelelektroforeseanalyse. Tilstedeværelsen av et enkelt fragment i gelen indikerte
fullstendig vektorspaltning og enkel restriksjonsspaltning av enzymet.

Tilstrekkelig spaltning av vektoren ble testet også ved å transformere uligerte
10 molekyler til kompetente *E. coli* DH5a-celler. Antall kolonier som ble dannet på LB
agarplater tilsatt ampicillin (100µgr/ml) ble en indikator på uspaltede molekyler og den
forventede bakgrunn under de påfølgende forsøk.

Vektorene ble videre defosforylert med alkalisk fosfatase fra kalvetarm, CIAP
15 (Promega, Southampton, UK) i henhold til produsentens instruksjoner. Effektiviteten av
behandlingen ble testet ved ligering (med Bakteriofag T4 DNA-ligase i henhold til
produsentens instruksjoner), etterfulgt av omdanning til DH5a-celler. Antall dannede
kolonier viste antall resirkulerte molekyler (ikke klonet vektor) og en subtraksjon av
ovennevnte med de dannede kolonier uten CIAP vektor-behandling, viste antall ikke-
20 defosforylerte vektorer.

Konstruksjon av et genomisk DNA bibliotek

Genomisk DNA ble delvis spaltet med seks restriksjonsenzymmer som gjenkjenner
ofte forekommende hekso-nukleotidsekvenser innen prokaryotisk DNA. *Eco*RI, *Bam*HI,
25 *Pst*I, *Kpn*I, *Sma*I og *Hind*III er type II restriksjons-endonukleaser som spesifikt gjenkjenner
henholdsvis sekvensene 5'G/AATTC'3, 5'G/GATCC'3, 5'CTGCA/G'3, 5'GGTAC/C3',
5'CCC/GGG3' og 5'A/AGCTT3', og lager dobbeltrådige brudd innen disse sekvensene,
og genererer 5'overheng av fire nukleotider, AATT, GATC, AGCT for henholdsvis *Eco*RI,
*Bam*HI og *Hind* III og 3'overheng, ACGT, GTAC for henholdsvis *Pst*I og *Kpn*I og "blunt
30 ends" for *Sma*I.

Alle disse enzymene var aktive og i stand til å spalte DNA kun i nærvær av divalente magnesiumioner. Disse ionene var de eneste påkrevde kofaktorer.

Restriksjonsspaltning av DNA.

5 Alle restriksjonsspaltninger av genomiske DNA-prøver ble inkubert i 2 timer ved 37°C og til slutt varmeinaktivert ved 65°C i 20 minutter. Reaksjonene ble deretter avkjølt ved romtemperatur og en passende mengde lastebuffer ble tilsatt, etterfulgt av forsiktig blanding med et lukket glass kapillær. Løsningene ble deretter tømt i brønnene på en 0,8 % agarosegel (med strømforsyning 4-5volts/cm i 14-16 timer) og størrelsen på det spaltede
10 DNA'et ble beregnet med 1kbp DNA-standarder (Promega, UK) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002)).

Rensing av fragmentene dannet etter restriksjonsspaltning.

Fragment-rensing fra reaksjonsblandinger og agarosegeler ble utført ved bruk av et
15 QIAEX gelekstraksjons-kit fra Qiagen (West Sussex, UK). Protokoller er beskrevet i detalj i produsentens manual.

DNA ligering og transformasjon

Etter rensing av DNA-fragmenter med Qiaex gelekstraksjons-kit, ble de ligert med CIAP-behandlet pSP72 vektor. For ligering ble passende mengder DNA overført til sterile
20 0,5 ml mikrofugerør, som vist i Tabell 1.

Rør	DNA
A	Vektor (15 fmoles [$\sim 29,7$ ng])
B	Vektor (15 fmoles $\sim 29,7$ ng DNA) pluss insersjon (fremmed 15 fmoles $\sim 69,3$ ng)
C	pUC kontroll (0,056 fmoles [~ 100 pg])
Molforholdet mellom plasmid DNA vektor og innskudd DNA-fragment bør være $\sim 1:1$ i ligeringsreaksjonen. Den endelige DNA konsentrasjon bør være ~ 10 ng/ μ l	

Tabell 1: Ligeringsblandinger. Rør A viser antall selv-ligerte vektor DNA som må trekkes fra det totale antall transformanter etter transformasjon. Rør B viser ligering av vektoren
25 med DNA-fragmentene og rør C viser kontrollen for at transformasjonseffektivitet skal kunne beregnes.

Før hver ligering ble DNA-fragmentene oppvarmet ved 45°C i 5 minutter for å smelte eventuelle kohesive termini som igjen ble sammensmeltet under fragment-preparering. Forholdet mellom molar vektor : innført DNA ble valgt til 1:1 for alle ligeringsreaksjonene, og reaksjons-sammensetningen ble utført i henhold til Promegas instruksjoner.

Til rør A og B ble 1,0 µl 10x ligeringsbuffer og 0,5 Weiss enheter med T4 DNA ligase (Promega, UK) tilsatt og ligeringsvolumet ble tilpasset til 10 µl med vann av molekylærbiologisk kvalitet. Til rør C ble 1,0 µl 10x ligeringsbuffer tilsatt og ligeringsvolumet ble tilpasset til 10 µl med vann av molekylærbiologisk kvalitet.

DNA-fragmenter ble satt til rørene sammen med vannet og deretter oppvarmet til 45°C i 5 minutter, for å smelte eventuelle kohesive termini som igjen ble sammensmeltet under preparering. DNA'et ble avkjølt til 0°C før resterende ligeringsreagenser ble tilsatt, og reaksjonsblandingen ble inkubert natten over ved 16°C (Sambrook og Russell, 2001).

Etter etanolutfelling og rensing av ligerte fragmenter (for å fjerne ligeringsblandingen som forårsaker reduksjon av transformasjonens effektivitet), ble transformasjoner utført i henhold til instruksjoner fra Hanahan. ~50ng ligert DNA i 5µl løsning ble satt til 100µl kompetente DH5a-celler. Etter varmebehandling og ekspresjon av ampicillin-resistensgenet, ble cellene spredt på overflaten av LB-plater inneholdende ampicillin (100µg/ml), X-β-Gal (40µl of 2 % X-β-Gal) og IPTG (7µl of 20 %IPTG).

Antall transformanter fra hver ligeringsreaksjon ble målt. Antall transformanter som vanligvis ble oppnådd fra rør C var 2×10^5 - 1×10^6 cfu/µg, mens fra rør A var 500-600 cfu/µg. Antall transformanter i rør A er en indikasjon på effektiv behandling av vektor-DNA. Antall transformanter i rør B var i området fra 2 - 4×10^4 cfu/µg.

Antall transformanter

Ligeringsblandinger med *Pst*I kromosomalt DNA ga opphav til 13 β-galaktosidase-positive kloner ut fra ~2500 screenede transformanter, mens *Bam*HI ga opphav til 7 positive kloner (~1500 scr. transformanter), *Eco*RI ga opphav til 3 positive kloner (~1300 scr. transformanter), *Kpn*I ga opphav til 7 positive kloner (~2000 scr. transformanter),

SmaI ga opphav til 3 positive kloner (~1600 scr. transformanter) og *HindIII* ga opphav til 2 positive kloner (~1200 scr. transformanter).

Positiv klonspaltning

- 5 For å kunne identifisere de forskjellige β -galaktosidasegenene, ble plasmider isolert fra positive kloner spaltet i henhold til følgende tabell.

	Prøver	Enzymer
1 spaltning	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	<i>BamHI</i>
2 spaltning	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	<i>PstI</i>
3 spaltning	pP12, pP13, pP14	<i>PstI</i>
4 spaltning	pE1, pE2, pE3	<i>EcoRI</i>
5 spaltning	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3.....	<i>PstI</i> og <i>EcoRI</i>
6 spaltning	pS1, pS2, pS3	<i>SmaI</i>
7 spaltning	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	<i>PstI</i> og <i>SmaI</i>
8 spaltning	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>KpnI</i>
9 spaltning	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	<i>PstI</i> og <i>KpnI</i>
Første bokstav (p) indikerer plasmid og insersjonsgenet, mens den andre bokstaven (P,B,E,S,K) indikerer restriksjonsenzymet som ble anvendt for isolering av det respektive klon fra genomisk DNA.		

- 10 Gelelektroforeseanalyse av produserte fragmenter etter spaltning, viser at plasmidene pB1, pP1, pP2 og pP11 hver har en insersjon som koder for forskjellige β -galaktosidaser. Klonene som inneholdt P2 ble anvendt for videre analyse.

DNA-sekvensering

- 15 DNA-sekvensering ble utført ved bruk av metoden "dideoxy chain-termination" av Sanger, ved bruk av BigDye Terminator v.3,0 syklus sekvenserings-kit (Applied Biosystems, USA) og analysert med ABI Prisme 3100, et fluorescens-basert DNA analyse-system som inkorporerer kapillær-elektroforese.

- 20 5'- og 3'- endene på innførte DNA-fragmenter ble sekvensert med vektor-spesifikke primere. Innførte DNA-fragmenter ble videre sekvensert ved bruk av genomet Priming System (GPS-1) (New England Biolabs, Uk). GPS-1 er et TN7 transposon-basert in vitro system som benytter TnsABC Transposase til å innføre Transposon tilfeldig inn i

mål DNA'et. Et forhold donor: mål DNA-masse på 1:4 ble anvendt i henhold til produsentens instruksjoner. Antall isolerte plasmider for sekvensering etter insersjon av Transprimer inn i målplasmidet var 25. Dette antallet ble beregnet i henhold til produsentens instruksjoner og det antar en dybde-dekning på 5-ganger.

5

På grunn av pP2-plasmidets lange nukleotidsekvens hvor protein-P2 ble kodet for, ble kun den delen som inneholdt β -galaktosidasegenet valgt til sekvensering. Enzymet som ble inaktivert etter insersjon av transposase-innskudd, ved en indbyrdes plassering på 172bp i det sekvenserte fragment, indikerte at startkodon var oppstrøms iforhold til denne posisjonen. Tilsvarende opphørte enzymaktiviteten fullstendig ved insersjon av innskudd i posisjon 2882bp, hvilket indikerte at stoppkodonet befant seg nedstrøms iforhold til denne posisjonen. Videre opphørte enzymaktiviteten fullstendig ved insersjon av innskudd ved følgende posisjoner 262bp, 331bp, 375bp, 621bp, 866bp, 1348bp, 1358bp, 1394bp, 1513bp, 1704bp, 2128bp, 2519bp i forhold til det første nukleotid som ble sekvensert.

10

Analyse av den N-terminale domene med SignalIP og PSORT programvare viste ingen signalpeptid, hvilket indikerer at P2 ikke sekreteres ekstracellulært.

15

Sekvenseringsreaksjonsblandingen inneholdt omtrent 400-600ng plasmid DNA, 3,2pmol primer løsning og 4 μ l BigDye Terminator løsning.

20

Åpen leseramme identifikasjon

Den åpne leserammen (ORF) til P2 ble lokalisert ved bruk av "ORF finder" fra NCBI, nettadresse; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Den bakterielle genetiske kode ble brukt og rammelengde ble bestemt til 100bp. Nukleotidsekvensen ble translatert i alle seks mulige rammer, og en åpen leseramme på 738 aminosyrer ble identifisert, som koder for en antatte β -galaktosidase (Translasjonen er vist i Figur 2).

Eksempel 2

10 Syntese med det β -galaktosidase-klonede enzymet isolert fra *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 i *E. coli* som vert (stammeDH5a)

Hvis ikke annet er angitt, ble følgende beskrevne syntese utført med hele *E. coli* DH5a-vertsceller etter behandling av *E. coli*-biomassen (oppsamlet ved sentrifugering ved 10,000 g) med toluen ved en konsentrasjon på 2000 ppm, for å øke cellenes permeabilitet, og også for å gjøre cellene ikke-levedyktige ved å ødelegge deres cytoplasmatiske membran. *E. coli*-biomassen ble fremstilt som beskrevet i Eksempel 1 under "E coli stammer".

Syntese med klonet enzym

20 Syntese med β -galaktosidase ble utført med en substratkonsentrasjon på 40 % (vekt/vekt) innledende laktose konsentrasjon. Syntesens løsning ble fremstilt i 0,1 M fosfatbuffer ved pH 6,0, inneholdende ytterligere 1 g/l Tween 80 (polyoksyetylen (20) sorbiton monooleat). Syntesen ble utført ved 40 °C på et riste-vannbad ved 150 rpm. Optimal pH for det spesifikke enzymet ble valgt basert på aktivitetsmålinger (ved 25 anvendelse av o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid som substrat) til en spesifikk enzymatisk tilberedning ved varierende pH-verdier.

30 For galaktooligosakkarid syntese ble 2 ml cellelysat supernatant anvendt (etter ødeleggelse av *E. coli*-cellene ved "French press") med 8 g 50 % (vekt/vekt) laktose for å oppnå en endelig substratkonsentrasjon på 40 % (vekt/vekt). Denne enzymatiske tilberedningen hadde en aktivitet på 735 U/ml.

Konsentrasjonene på de forskjellige sukkere til stede i blandingen under syntesen er vist i Figur 3. Høy-ytelse anionbytterkromatografi koblet med "pulsed amperometric detection" (HPAEC-PUTE) kromatografi av galaktooligosakkarid-blandinger syntetisert av β -galaktosidase klonet fra *B. bifidum* NCIMB 41171, er vist i Figur 4. De galaktooligosakkarid-blandede sukkerkonsentrasjonene er vist ved optimal syntesetidpunkt i tabell 1.

Tabell 1. Karbohydratsammensetning av galaktooligosakkaridsyntese ved 40 % (vekt/vekt) innledende laktosekonsentrasjon, på det tidspunktet hvor maksimal oligosakkarid- konsentrasjon ble observert.

Syntese Init. Subst.	GOS DP $\geq$ 3	GOS DP=2	Lac	Glc	Gal
% (vekt/vekt)	Konsentrasjon (% av totalt antall sukkere)				
40	8,82	16,25	39,40	20,76	14,85

Lac: Laktose, Glc: glukose, Gal: galaktose, DP: grad av polymerisering.

P A T E N T K R A V

1. DNA-sekvens, kodende for en β -galaktosidase, idet sekvensen er valgt fra sekvensen gitt i SEKV ID NR: 1 eller et fragment eller et degenerativ derav, idet nevnte
5 degenerativ er fra 75% til 95% homolog.
2. DNA-sekvens ifølge krav 1, idet nevnte sekvens omfatter nukleotidsubstitusjoner, addisjoner eller delesjoner som resulterer i mindre enn 25% forandring i aminosyresekvensen som koder for SEKV ID NR: 2.
10
3. DNA-sekvens ifølge krav 1 eller krav 2, idet nevnte sekvens omfatter nukleotidsubstitusjoner som resulterer i konservative aminosyresubstitusjoner.
4. β -galaktosidase enzym kodende for en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av
15 kravene 1 til 3.
5. β -galaktosidaseenzym omfattende en aminosyresekvens ifølge SEKV ID NR: 2.
6. Rekombinant vektor omfattende en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av
20 kravene 1 til 3.
7. Vektor ifølge krav 6, idet nevnte vektor er en ekspresjonsvektor.
8. Vertscelle som er en gjærcele, en soppcele eller en bakteriell celle valgt fra
25 gruppen bestående av Lactococcus, Lactobacillus, Escherichia, Bacillus og Aspergillus omfattende en DNA sekvens ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3.
9. Vertscelle omfattende vektoren ifølge krav 6 eller krav 7.
- 30 10. Vertscelle ifølge krav 8 eller krav 9, idet cellen er valgt fra gruppen bestående av Bacillus subtilis, Bacillus circulans og Aspergillus niger.

11. Anvendelse av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, eller en celle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for produksjon av en blanding av oligosakkarider.

5 12. Anvendelse av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, eller en celle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for å produsere en blanding av oligosakkarider som skal være del av et produkt valgt fra gruppen bestående av melkeprodukter, så som flytende melk, tørket melkepulver, babymelkedrikker, babyformuleringer, iskrem, yoghurt, ost, fermenterte melkeprodukter, drikker så som fruktjuice, barnemat, frokostblandinger, brød, kjeks, konfekt, kaker, mattilskudd, kosttilskudd, spiselige probiotikaprodukter, spiselige
10 prebiotikaprodukter, dyrefôr, fjærkrefôr og medikamenter.

13. Anvendelse av en vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10, for produsering av et produkt valgt av gruppen bestående av melkeprodukter, så som flytende melk, tørket melkepulver, babymelkedrikker, babyformuleringer, iskrem, yoghurt, ost,
15 fermenterte melkeprodukter, drikker så som fruktjuice, barnemat, frokostblandinger, brød, kjeks, konfekt, kaker, mattilskudd, kosttilskudd, spiselige probiotikaprodukter, spiselige prebiotikaprodukter, dyrefôr, fjærkrefôr og medikamenter.

14. Fremgangsmåte for produsering av et enzym ifølge krav 4 eller krav 5, omfattende
20 dyrking av en vertscelle ifølge et hvilket som helst av kravene 8 til 10 i et egnet dyrkingsmedium under betingelser som tillater ekspresjon av nevnte enzym og utvinning av det resulterende enzymet fra kulturen.

SEKVENSLISTE

<110> McDONALD, Sarah C

<120> Product and Process

<130> 14011:KG

<150> GB 0606112.1

<151> 2006-03-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 4395

<212> DNA

<213> Bifidobacterium bifidum

<220>

<221> Beta-galactosidase

<222> (1)..(4395)

<400> 1

tccttttagat tggattgaaa acttcctttt tttatgtaaa aggatattcg gggaaattcc	60
ctttttgaaa atttcatgac caaaaatccc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt	120
cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct	180
gctgcttgca aacaaaaaaaa cccccgtac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc	240
taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	300
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc	360
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg	420
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt	480
cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	540
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc	600
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt	660
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag	720
gggggpcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt	780
gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	840
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt	900
cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc	960
cgattcatta atgcaggtta acctggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga	1020
ccggcagatc tgatatcatc gatgaattcg agctcggtag ccggggatcc tctagagtcg	1080

acctgcagaa	gtactggcag	tccggcctcg	ccgccggcgc	cgtcaaggag	tgatctcgcg	1140
ggagggccag	tgtccgcttg	cagcatgcgt	cacgttcgtc	tgacggtctt	gacgtgcgcc	1200
tagcggctgg	ccctccctac	ggaacatgta	tatgatatgg	agggacgctc	accgtgtgcg	1260
atgcgggctg	gcgcgatatg	gcaccagccc	gcatcgcatg	tcacagttga	tttttcgtcg	1320
atgcgacggt	tcggccgggg	cgtcagacaa	tgaacaagta	atggagcgga	atatgagtaa	1380
acgcagaaaag	cacagttggc	cgcagccgct	gaagggcgcc	gaatcccgtc	tctggtatgg	1440
cgggtgattac	aatcccagacc	aatggccgga	ggaggtctgg	gacgatgata	tccgtctgat	1500
gaagaaggcc	ggcgtcaacc	ttgtatcagt	cggcatcttc	tcattggcgga	agatcgagcc	1560
ggaggaaggc	aagtacgatt	tcgactggct	ggaccgtgcc	atcgataagc	tcggcaaggc	1620
gggcatcgct	gtagacctcg	cctccgccac	cgcctccccg	ccgatgtggc	tgaccaggc	1680
ccatccggag	gtgctgtgga	aggacgagcg	cggcgacacc	gtgtggccgg	gtgcccgta	1740
gcattggcgt	ccgacgagcc	ctgtgttccg	cgagtacgcg	ctgaacctgt	gccgtcgtat	1800
ggccgagcac	tataagggca	acccatacgt	ggtggcctgg	cacgtgagca	acgaatacgg	1860
ctgccacaac	cgcttcgact	actcggacga	cgccatgcgc	gccttcagga	agtgggtgaa	1920
gaagcgctac	aagaccatcg	acgcggtgaa	cgaggcctgg	ggaacagcgt	tctggggcca	1980
gcacatgaac	gattttctccg	agatcatccc	gcctcgctac	atcggtgacg	gcaacttcat	2040
gaacccgggc	aagctgctcg	actacaagcg	gttcagctcc	gacgcgctca	aggagctcta	2100
catcgccgaa	cgtgacgtgc	tggagtccat	cacgccgggt	ctgccgctga	ccaccaattt	2160
catggtgtct	gccggcggct	cgatgcttga	ctatgacgac	tggggtgcgg	aggtcgattt	2220
cgtctccaac	gaccactact	tcacgccggg	cgaggaccat	ttcgacgagg	ttgcgtacgc	2280
cgcgtcgctg	atggacggca	tttcacgcaa	ggaaccgtgg	ttccagatgg	agcattccac	2340
ctccgcggtg	aattggcgctc	cgatcaacta	ccgtgcggag	ccgggctcgg	tcgtgcgcga	2400
ctccctcgcg	caggctcgcta	tgggcgccga	tgccatctgc	tatttccagt	ggcgacagtc	2460
caaggccggc	gcggagaagt	ggcactcctc	gatggtgccg	catgcgggcg	aggattcgca	2520
gatcttccgt	gatgtgtgcg	agctgggcgc	cgatctggga	cgtctgtccg	acgagggctt	2580
gatgggcacc	aagacggtca	agtccaaggt	cgccgtcgtg	ttcgactacg	agtcccagtg	2640
ggccaccgag	tacaccgcga	acccgaccca	gcaggtcgat	cattggaccg	agccgttggga	2700
ttggttccgc	gcgcttgccg	acaacggcat	caccgccgac	gtggttccgg	tgcggtccga	2760
ttgggattcc	tacgagattg	ccgtgctgcc	gtgctgttat	ttgctgtccg	aagagacgag	2820
ccgcagggtt	cgggagttcg	tggcgaacgg	cggcaagttg	ttcgtgacgt	actacaccgg	2880
attgagcgac	gagaacgacc	acatctggct	tggcggctac	ccgggctcga	ttcgtgacgt	2940
cgtcggcggtg	cgcgtcgaag	agttcgcccc	gatgggcaac	gacatgccgg	gcgcattgga	3000

```

tcacctcgac ctggacaatg gcacggtggc gcatgacttt gccgacgtga tcacgtccac 3060
ggccgacacg tccacggtac tggcctccta taaggcgga cgctggaccg gcatgaacga 3120
ggtgccggcc atcgtggcca acgggtatgg cgacgggagg accgtatatg tcggatgccg 3180
tctggggcgt caggggcttg cgaagagcct gccggcgatg ctgggttcca tggggctgtc 3240
ggacctcgcc ggtgatggcc gcggtgctgc tgtcgaacgc gccgacgccg cggcgggcag 3300
ccgcttcgag ttcgtgttca accgcaccca tgaaccggtg accgtcgacg ttgaagggga 3360
ggccatcgcg gcttcgctcg cgcatgtcga cgacgggagg gccaccatcg atccgacggg 3420
tgttgctgtg ctcaggcgat aatcgttga aacactgggc tgtaagggt taggaaaggc 3480
gtatgtttgc ggtgacacgc gacatacgcc ttatgggaaa gaaggcgctg gcgcttaccg 3540
ggctgcggcg atgctggtca gcgtcgctgc gtgcggcaac tcaagcagca gctccgctcc 3600
gaagcaggaa ggcgacgtca aggaaatcac cgtgtgggct tggggcctac gctgactcag 3660
gtggccaagg acttcaaaaa aggagaccgg catcaatgtc aacctggtga acaccggcca 3720
gggcgacaag acctgggacg agttctatca ggacccaag aagattcaca cccttggcga 3780
caactactac atcacgtccg acaccggtgt cgccggcttc tacgactcga tgacctggct 3840
ggccagtgcg acgctgttct ccaccgaagg cgagacggtc accattaacc tgactggcgc 3900
cccgaaggtc aaggcccgcg gtatcttcgg cgactacctt ggcaagtcct acaccggcaa 3960
ccagaagctg agcgatggcg tcgccgttt gggaacaggc tctgaaggac tacgcgaagg 4020
atcagggtca caccgtcaag taaccttcgc agtcaagcaa tctggcgtgg taatgaccgg 4080
aatacgggtga ccttcggtca tcccttcctc gtgtgaaggc ccctcccctc aacagggagg 4140
ggccttcaca tatctgcccc tgttgcaacg cgctgtgaaa ctctacgatg agcgaattct 4200
tcccgacaca tcgagcacgc taaggagatg acatgacgat atcggcacgg ttgtggcggc 4260
tgcacctgca tatctttgtg ttgctcaaga tctgtgagat gacctggca gcacgcctcc 4320
agcgcgccgc cggacacgcg caccctcatc accgaatgga cgggggacca tatcatgacg 4380
actctgatcg ccaat 4395

```

```

<210> 2
<211> 738
<212> PRT
<213> Bifidobacterium bifidum

```

```

<220>
<221> Beta-galactosidase
<222> (1)..(738)

```

```

<400> 2

```

```

Met Tyr Met Ile Trp Arg Asp Ala His Arg Val Arg Cys Gly Leu Ala
1          5          10          15

```

Arg Tyr Gly Thr Ser Pro His Arg Met Ser Gln Leu Ile Phe Arg Arg
 20 25 30

Cys Asp Gly Ser Ala Gly Ala Ser Asp Asn Glu Gln Val Met Glu Arg
 35 40 45

Asn Met Ser Lys Arg Arg Lys His Ser Trp Pro Gln Pro Leu Lys Gly
 50 55 60

Ala Glu Ser Arg Leu Trp Tyr Gly Gly Asp Tyr Asn Pro Asp Gln Trp
 65 70 75 80

Pro Glu Glu Val Trp Asp Asp Asp Ile Arg Leu Met Lys Lys Ala Gly
 85 90 95

Val Asn Leu Val Ser Val Gly Ile Phe Ser Trp Ala Lys Ile Glu Pro
 100 105 110

Glu Glu Gly Lys Tyr Asp Phe Asp Trp Leu Asp Arg Ala Ile Asp Lys
 115 120 125

Leu Gly Lys Ala Gly Ile Ala Val Asp Leu Ala Ser Ala Thr Ala Ser
 130 135 140

Pro Pro Met Trp Leu Thr Gln Ala His Pro Glu Val Leu Trp Lys Asp
 145 150 155 160

Glu Arg Gly Asp Thr Val Trp Pro Gly Ala Arg Glu His Trp Arg Pro
 165 170 175

Thr Ser Pro Val Phe Arg Glu Tyr Ala Leu Asn Leu Cys Arg Arg Met
 180 185 190

Ala Glu His Tyr Lys Gly Asn Pro Tyr Val Val Ala Trp His Val Ser
 195 200 205

Asn Glu Tyr Gly Cys His Asn Arg Phe Asp Tyr Ser Asp Asp Ala Met
 210 215 220

Arg Ala Phe Gln Lys Trp Cys Lys Lys Arg Tyr Lys Thr Ile Asp Ala
 225 230 235 240

Val Asn Glu Ala Trp Gly Thr Ala Phe Trp Ala Gln His Met Asn Asp
 245 250 255

Phe Ser Glu Ile Ile Pro Pro Arg Tyr Ile Gly Asp Gly Asn Phe Met
 260 265 270

Asn Pro Gly Lys Leu Leu Asp Tyr Lys Arg Phe Ser Ser Asp Ala Leu

275					280					285					
Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ala	Glu	Arg	Asp	Val	Leu	Glu	Ser	Ile	Thr	Pro
290						295					300				
Gly	Leu	Pro	Leu	Thr	Thr	Asn	Phe	Met	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Met
305					310					315					320
Leu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Trp	Gly	Ala	Glu	Val	Asp	Phe	Val	Ser	Asn	Asp
			325						330					335	
His	Tyr	Phe	Thr	Pro	Gly	Glu	Asp	His	Phe	Asp	Glu	Val	Ala	Tyr	Ala
			340					345					350		
Ala	Ser	Leu	Met	Asp	Gly	Ile	Ser	Arg	Lys	Glu	Pro	Trp	Phe	Gln	Met
		355					360					365			
Glu	His	Ser	Thr	Ser	Ala	Val	Asn	Trp	Arg	Pro	Ile	Asn	Tyr	Arg	Ala
	370					375					380				
Glu	Pro	Gly	Ser	Val	Val	Arg	Asp	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Ala	Met	Gly
385					390					395					400
Ala	Asp	Ala	Ile	Cys	Tyr	Phe	Gln	Trp	Arg	Gln	Ser	Lys	Ala	Gly	Ala
				405					410					415	
Glu	Lys	Trp	His	Ser	Ser	Met	Val	Pro	His	Ala	Gly	Glu	Asp	Ser	Gln
			420					425					430		
Ile	Phe	Arg	Asp	Val	Cys	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser
		435					440					445			
Asp	Glu	Gly	Leu	Met	Gly	Thr	Lys	Thr	Val	Lys	Ser	Lys	Val	Ala	Val
	450					455					460				
Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Ser	Gln	Trp	Ala	Thr	Glu	Tyr	Thr	Ala	Asn	Pro
465					470					475					480
Thr	Gln	Gln	Val	Asp	His	Trp	Thr	Glu	Pro	Leu	Asp	Trp	Phe	Arg	Ala
				485					490					495	
Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Ile	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Pro	Val	Arg	Ser	Asp
			500					505					510		
Trp	Asp	Ser	Tyr	Glu	Ile	Ala	Val	Leu	Pro	Cys	Val	Tyr	Leu	Leu	Ser
		515					520					525			
Glu	Glu	Thr	Ser	Arg	Arg	Val	Arg	Glu	Phe	Val	Ala	Asn	Gly	Gly	Lys
	530					535					540				

Leu Phe Val Thr Tyr Tyr Thr Gly Leu Ser Asp Glu Asn Asp His Ile
545 550 555 560

Trp Leu Gly Gly Tyr Pro Gly Ser Ile Arg Asp Val Val Gly Val Arg
565 570 575

Val Glu Glu Phe Ala Pro Met Gly Asn Asp Met Pro Gly Ala Leu Asp
580 585 590

His Leu Asp Leu Asp Asn Gly Thr Val Ala His Asp Phe Ala Asp Val
595 600 605

Ile Thr Ser Thr Ala Asp Thr Ser Thr Val Leu Ala Ser Tyr Lys Ala
610 615 620

Glu Arg Trp Thr Gly Met Asn Glu Val Pro Ala Ile Val Ala Asn Gly
625 630 635 640

Tyr Gly Asp Gly Arg Thr Val Tyr Val Gly Cys Arg Leu Gly Arg Gln
645 650 655

Gly Leu Ala Lys Ser Leu Pro Ala Met Leu Gly Ser Met Gly Leu Ser
660 665 670

Asp Leu Ala Gly Asp Gly Arg Val Leu Arg Val Glu Arg Ala Asp Ala
675 680 685

Ala Ala Ala Ser Arg Phe Glu Phe Val Phe Asn Arg Thr His Glu Pro
690 695 700

Val Thr Val Asp Val Glu Gly Glu Ala Ile Ala Ala Ser Leu Ala His
705 710 715 720

Val Asp Asp Gly Arg Ala Thr Ile Asp Pro Thr Gly Val Val Val Leu
725 730 735

Arg Arg

Figur 1

1 tccittagat tggattgaaa acttccittt titatgtaaa aggatattcg gggaaattcc
 61 ctttttga aa attcatgac caaaaatccc ctttaacgtga gttttcgttc caactgagcgt
 121 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttcgt cgcgtaatct
 181 gctgcttgca aacaaaaaaa ccccccgtac cagcgggtgt tgtttgcgc gatcaagagc
 241 taaccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc
 301 ttctagtgtt gccgtagtta gcccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc
 361 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg
 421 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt
 481 cgtgcacaca gccagcgtt gagggaacga cctacacoga actgagatac ctacagcgtg
 541 agctatgaga aagcgccaog ctcccgaag ggagaaaggc ggacagggtat ccggtaagcg
 601 gcaggggtcg aacaggagag cgcacggagg agcttcagg gggaaacgcc tggatcttt
 661 atagctctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtcg attttgtga tgcctgtcag
 721 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acggggcctt ttacgggttc ctggccttt
 781 gctggcctt tgcacatg ttcttctg cgttatccc tgattctgtg gataacogta
 841 ttacogcctt tgagtgcgt gatacgcct gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt
 901 cagtgcgcga ggaagcggaa gaggcggcaa tacgcaaacc gcctctccc gcgcgttggc
 961 cgaticatta atgcaggta acctggctta tcgaaattaa tacgactcac tatagggaga
 1021 ccggcagatc tgatacatc gatgaattc agctcggta cgggggatcc totagagtcg
 1081 acctgcagaa gtactggcag tccggcctcg ccggcgccgc cgtcaaggag tgatctcgc
 1141 ggaggggcag tgcctgttg cagcatggt caogttcgtc tgacggtctt gacgtgcgc.
 1201 tagcggctgg ccttccctac ggaacatgta tatgatattg agggacgcct accgtgtgog
 1261 atcggggtcg gcgcgatatg gcaccagccc gcatogcatg tcacagtga ttttcgtc
 1321 atcgacgggt tggccgggg cgtcagacaa tgaacaagta atggagcggg atatgagtaa
 1381 acgcagaaag cacagtggc cgcagccgt gaaggcgccc gaatccogtc totggtatgg
 1441 cgtgattac aatcccgacc aatggccgga ggaggtctgg gacgatgata tccgtctgat
 1501 gaagaaggcc ggcgtcaacc ttgtatcagt cggcatcttc tcatgggoga agatcgagcc
 1561 ggagggaaggc aagtacgatt tcgactggct ggaccgtgcc atcgataagc tcggcaaggc
 1621 gggcatcgt gtagacctc cctccggcac cgcctcccc cgatgtggc tgaccagggc
 1681 ccatccggag gtgctgtgga aggaogagcg cggogacacc gtgtggccgg gtgcccgtga
 1741 gcattggcgt ccgacgagcc ctgtgtccg cgagtacgg ctgaacctgt gccgtctgat
 1801 ggcggagcac tataagggca acccatatct ggtggcctgg cactgagca accaatacgg
 1861 ctgccacaac cgttcgact actcggaga cgcctatgcg gccttcaga agtgggtgcaa
 1921 gaagcgttac aagaccatcg acgcggtgaa cgaggcctgg ggaacagcgt tctgggcca
 1981 gcacatgaac gatttccg agatcatccc gcctcgtac atcgggtgac goaacttcat
 2041 gaaccggggc aagctgctcg actcaagcg gttcagctcc gacgcgtca aggagctta
 2101 catcgccgaa cgtgacgtc tggagtccat caogccgggt ctgcccgtga ccaaccaatt
 2161 catggtgtct gccggcggct cgtgcttga ctatgacgac tggggtgccc aggtcgatt
 2221 cgtotccaa gacactatc toagcgggg ogaggacat ttogagagg ttgcgtacgc
 2281 cgcgtcgtg atggacggca ttacacgcaa ggaaccgtgg ttccagatgg agcatccac
 2341 ctccgggtg aattggcgtc cgatcaacta ccgtgcggag ccgggctcgg tctgctgcga
 2401 ctccctcgc caggtcgcta tggggccga tgcctctgc tatttccagt ggcgacagtc
 2461 caaggccggc ggggagaagt ggcactctc gatgtgccc catgcgggcg aggattcgca
 2521 gatcttccgt gatgtgctg agctggggcg cgatctggga cgtctgtcc acgagggtct

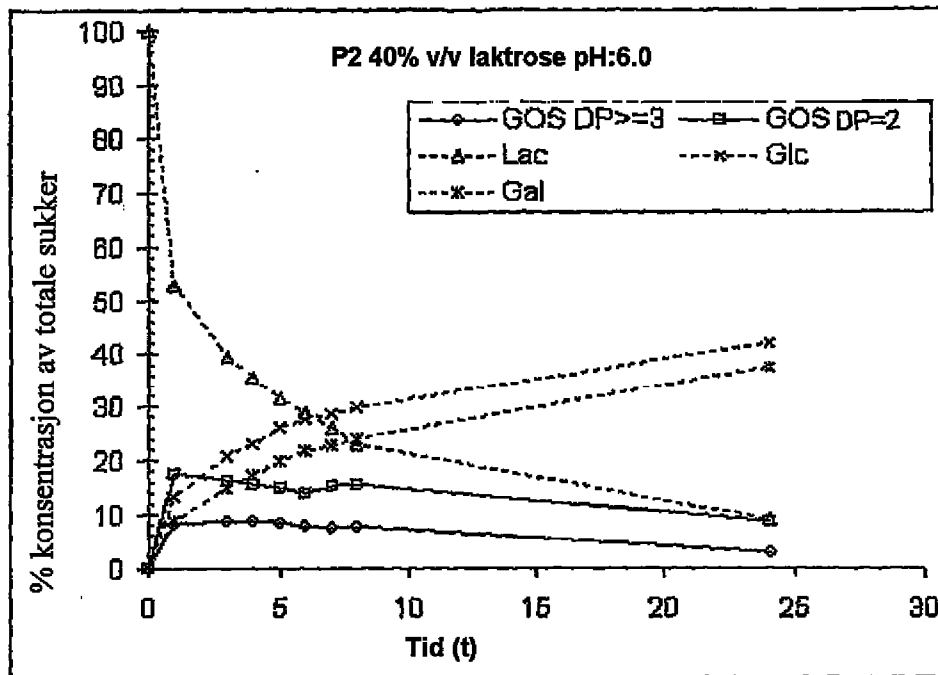
2581 gatgggcacc aagacgggtca agtccaaggt cgcgcgtcgtg ttgactacg agtcccagtg
 2641 ggccaccgag tacaccgcga acccgaccca gcagggtgat cattggaccg agccgttggga
 2701 ttggttccgc gcgcttccg acaacggcat caccgccgac gtggttccgg tgcggtccga
 2761 ttgggattcc tacgagattg ccgtgctgcc gtgcgtgtat ttgctgtccg aagagacgag
 2821 ccgcaggggt cgggagtto ggcgaacgg cggcaagtgt ttggtgacgt actacaccgg
 2881 attgagcgac gagaacgacc acatctggct tggcggctac cgggylwga ilcgtgacgt
 2941 cgtcggcgtg cgcgtcgaag agtccgccc gatgggcaac gacatgccgg gcgcattgga
 3001 tcacctcgac ctggacaatg gcaagggtggc gcatgacttt gccgacgtga tcactccac
 3061 ggccgacacg tccacggtac tggcctccta taaggcggaa cgtgggaccg gcatgaacga
 3121 ggtgcgggcc atcgtggcca aonggtatgg cgacgggcgg accgtatag toggatgccg
 3181 tctgggcccgt caggggcttg cgaagagcct gccggcgatg ctgggttcca tgggctgtc
 3241 ggacctggcc ggtgatggcc cgtgtctgcg tctgaacgc gccgacgccg cggcggcgag
 3301 ccgcttcgag ttctgttca accgcacca tgaaccgggt accgtcgacg ttgaaggga
 3361 ggccatcgcg gcttcgctcg cgcatttcca cgacgggcgg gccaccatcg atccgacggg
 3421 tgtgtcgtg ctcaggcgat aatcgttggg aacactgggc tgaagggt taggaaaggc
 3481 gtatgttgc ggtgacacgc gacatagcc ttatgggaaa gaaggcgctg gcgcttaccg
 3541 ggctgcggcg atgtgttca gcgtcgctgc gtgcggcaac tcaagcagca gctccgctcc
 3601 gaagcaggaa ggccagctca aggaatcac cgtgtgggtt tggggcctac gctgactcag
 3661 gtggccaagg acttcaaaa aggagaccgg catcaatgtc aacctgtga acaccggcca
 3721 gggcgacaag acctgggacg agtttatca ggaogcaag aagattcaca cccttggcga
 3781 caactactac atcacgtccg acaccggtgt cgcgggcctc tacgactcga tgacctggct
 3841 ggccagtgcg accgtgttct ccaccgaagg cgagacggtc accattaac tgaactggcg
 3901 ccgaagggtc aaggcccgcg gtatcttogg cgaactacct ggcaagtcct acaccggcaa
 3961 ccgaagctg agcgatggcg tcgccgttt gggaacaggc tctgaaggac tacgcaagg
 4021 atcagggtga caccgtcaag taaccttgc agtcaagcaa tctggcgtgg taatgaccg
 4081 aatacgggtga ccttoggta tcccttctc gtgtgaaggc ccttccctc aacagggagg
 4141 ggccttcaca tatctgccc tgttgcaac cgcgtgtaaa ctctacgatg agcgaattct
 4201 tcccgacaca tcgagcagc taaggagatg acatgacgat atcggcacgg ttgtggcggo
 4261 tgcacctgca tatcttgtg ttgtcaaga tctgtgagat gacactggca gcacgcctcc
 4321 agcgcgcgcg cggacacgcg caccctcctc accgaatgga cggggggacca tatcatgacg
 4381 actctgatcg ccaat

3/5

Figur 2

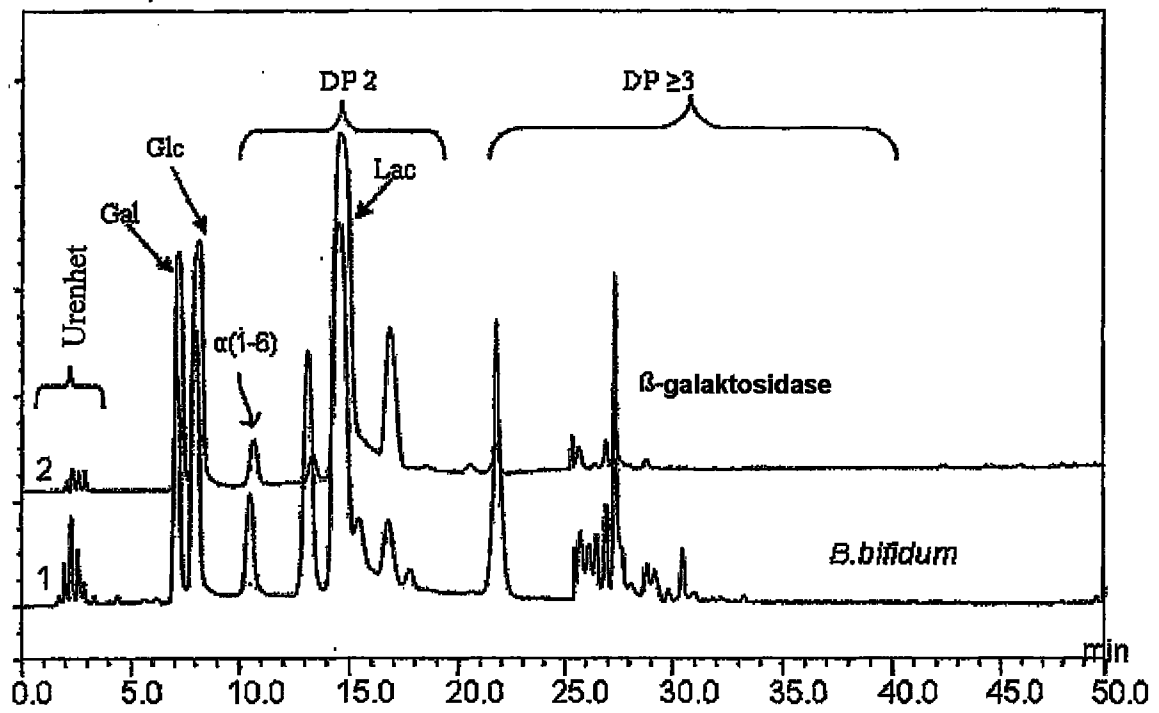
MYMIWRDAHRVRCGLARYGTSPHRMSQLIFRRCDGSAGASDNEQVMERNMSK
RRKHSWPQPLKGAESRLWYGGDYNPDQWPEEVWDDDIRLMKKAGVNLVSV
GIFSWAKIEPEEGKYDFDWLDRAIDKLGKAGIAVDLASATASPPMWLTQAHF
EVLWKDERGDTVWPGAREHWRPTSPVFREYALNLCRRMAEHYKGNPYVVAWH
VSNEYGCHNRFDYSDDAMRAEQKWCKKRYKTIDAVNEAWGTAFWAQHMNDFS
EIIPPRYIGDGNFMNPGKLLDYKRFSSDALKELYIAERDVLESITPGLPLTT
NFMVSAGGSMLDYDDWGAEVDFVSNDHYFTPGEDHFDEVAYAASLMDGISRK
EPWFQMEHSTSAVNWRPINYRAEPGSVVRDSLAQVAMGADAICYFQWRQSKA
GAEKWHSSMVPHAGEDSQIFRDVCELGADLGRLSDEGLMGTKTKVKSIVAVVF
DYESQWATEYTANPTQQVDHWTEPLDWFRALADNGITADVVPVRSDWDSYEI
AVLPCVYLLSEETSRRVREFVANGGKLFVTTYTGLSDENNDHIWLGGYPGSIR
DVVGVRVEEFAPMGNDMPGALDHLDLNGTVAHDFADVITSTADTSTVLASY
KAERWTGMNEVPAIVANGYGDGRTVYVGCRLGRQGLAKSLPAMLGSMGLSDL
AGDGRVLRVERADAAAASRFEFVFNRTHEPVTVDVEGEAIAASLAHVDDGRA
TIDPTGVVVLRR

4/5



Figur 3

5/5



Figur 4