

**Zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne, szczepy *B. subtilis* je obejmujące  
oraz ich zastosowania**

Przedmiotem wynalazku są ulepszone zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne nazwane pUltR i pUltK oraz ich funkcjonalne pochodne, wytworzone w oparciu o plazmid pAG58 zawierający gen hemolizyny *hly A* z *Listeria monocytogenes*.

Przedmiotem wynalazku są również ich zastosowania w szczególności zastosowanie wytworzonych plazmidów do ekspresji genów heterologicznych w komórkach *Bacillus subtilis*, i ich wykorzystanie do wytwarzania skutecznych szczepionek, zastosowanie w terapii nowotworów jak i system służący do porównywania ekspresji w warunkach konstytutywnych i indukcji oparty na tych wektorach.

Wektor bakteryjny pozwala na klonowanie, sekwencjonowanie, przechowywanie oraz przenoszenie różnej wielkości odcinków DNA. Plazmid, który umożliwia wstawianie obcych genów do chromosomu bakteryjnego zwany jest integracyjnym i musi spełniać warunek, jakim jest posiadanie sekwencji umożliwiających rekombinację homologiczną. Ekspresja wprowadzonych do genomu genów warunkowana jest natomiast obecnością sekwencji DNA: promotora i sekwencji RBS wiążącej rybosom, dzięki czemu możliwe jest powstanie białka będącego produktem ekspresji genu. Plazmid pAG58 jest znanym wektorem integracyjnym, który posiada zdolność do replikacji w komórkach *Escherichia coli*, dzięki czemu możliwe jest namnożenie plazmidu oraz posiada on zdolność do integracji do chromosomu *B. subtilis*, która wynika z obecności sekwencji SP $\beta$  profaga *B. subtilis* (Jaacks K. J., Healy J., Losick R., Grossman A. D. (1989) Identification and characterisation of genes controlled by the sporulation-regulatory gene *spo0H* in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 171 (8), 4121-4129)). Plazmid pAG58 został wykorzystany do konstrukcji wektora umożliwiającego insercję do chromosomu *B. subtilis* genu *hly A* kodującego hemolizynę *Listeria monocytogenes* (listeriolizynę O - nazywaną skrótowo LLO), która jest odpowiedzialna za ucieczkę patogenu z wakuoli komórki eukariotycznej, co umożliwia przeżycie i wewnątrzkomórkowe namnażanie się bakterii. Wektor zmodyfikowano poprzez wstawienie do niego kasety zwanej SPAC, w obrębie której znajduje się indukowalny promotor operonu laktozowego P<sub>spac</sub> i będący pod jego kontrolą gen *hly A*, gen markerowy *ble* warunkujący oporność na

bleomycynę oraz gen *lacI* kodujący represor operonu laktozowego ulegający ekspresji spod promotora  $P_{pcn}$  (Bielecki J., et al. Youngman P., Connelly P., Portnoy D. (1992) *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345: 175-176). Ekspresja genu hemolizyny zależna jest od obecności w podłożu hodowlanym induktora IPTG, który łącząc się z operatorem operonu laktozowego powstrzymuje przyłączenie represora LacI. Kasetę SPAC niesie także sekwencję rozpoznawaną i nacinaną przez enzymy restrykcyjne *Sal* I i *Kpn* I, stanowiącą fragment nazywany MCS (multiple cloning site), w który wstawiany jest obcy gen. Umożliwia to klonowanie większej ilości obcych genów w wektorze. Gen oporności na ampicylinę umożliwia selekcję plazmidu w komórkach *E. coli*, w których namnażany jest wektor, a gen oporności na bleomycynę umożliwia selekcję plazmidu w komórkach *B. subtilis*. Zmodyfikowany plazmid pAG58 niosący gen *hly A* o wielkości 8,5 kb nazywany jest pKG09 (pAG58-ble-hly).

Znane szczepionki oparte na wektorach DNA są zwykle preparatami zawierającymi plazmidy kodujące określone antygeny, z których to w komórkach immunizowanego osobnika wyrażany jest określony antygen/antygeny prowadząc do immunizacji osobnika i podawane są drogą iniekcji domięśniowej.

W stanie techniki nie są znane naturalnie występujące ani uzyskane np. metodami inżynierii molekularnej wektory pochodne pAG58 umożliwiające wstawianie do nich dużych odcinków DNA, zapewniające sprawniejszy proces ich transferu do komórek *B. subtilis* i większą wydajność selekcji w *B. subtilis*. W stanie techniki nie są znane szczepy *B. subtilis* obejmujące takie ulepszone wektory oraz ich zastosowania do wytwarzania ulepszonych szczepionek do immunizacji zwierząt.

Również nie są znane szczepionki doustne oparte na *B. subtilis* zawierające usprawnione wektory pochodne pKG09 i wyrażające określone antygeny, przeciw którym immunizowany organizm ma wytworzyć odporność. W stanie techniki znane są jedynie szczepionki doustne oparte na sporach *B. subtilis* (Zhou Z., et al. (2008) Oral administration of a *Bacillus subtilis* spore-based vaccine expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein 22.3 kDa confers protection against *Clonorchis sinensis*. *Vaccine* 26 (15): 1817 – 1825; Li L., et al. Immunogenicity of self-adjuvanticity oral vaccine candidate based on use of *Bacillus subtilis* spore displaying *Schistosoma japonicum* 26 KDa GST protein (2009) *Parasitol Res* 105: 1643 – 1651).

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przewyższenie wskazanych niedogodności i dostarczenie ulepszonych zmodyfikowanych plazmidów do sprawnej ekspresji i selekcji w *B. subtilis*, jak również dostarczenie szczepów *B. subtilis*

obejmujących takie ulepszone plazmidy. Celem wynalazku jest również dostarczenie szczepionek i kompozycji szczepionkowych opartych na zmodyfikowanych szczepach *B. subtilis* obejmujących takie ulepszone plazmidy, które są bezpieczne dla przyjmującego taką szczepionkę osobnika, a jednocześnie wywołują silną odpowiedź komórkową względem antygenów eksprymowanych z kodujących je genów, wstawionych w te ulepszone plazmidy.

Istotą wynalazku jest więc wektor ekspresyjny pUltR, którego sekwencja przedstawiona jest na Sek. Id. Nr. 1, lub jego funkcjonalna pochodna. Korzystny wektor ekspresyjny pUltR albo jego funkcjonalna pochodna zawiera sekwencję nukleotydową kodującą produkt, korzystnie kodującą antygen albo antygeny, korzystnie wstawioną w obszar MCS wektora.

Wynalazek dotyczy również wektora ekspresyjnego pUltK, którego sekwencja przedstawiona jest na Sek. Id. Nr. 2 lub jego funkcjonalnej pochodnej. Korzystny wektor ekspresyjny pUltK albo jego funkcjonalna pochodna ponadto zawiera sekwencję nukleotydową kodującą produkt, korzystnie kodującą antygen albo antygeny, korzystnie wstawioną w obszar MCS wektora.

Wynalazek dotyczy również szczepu bakteryjnego *B. subtilis* obejmującego wektor według wynalazku, korzystnie pUltR (Sek. Id. Nr. 1) albo pUltK (Sek. Id. Nr. 2) albo ich funkcjonalną pochodną zawierającą sekwencję nukleotydową kodującą antygen albo antygeny, korzystnie wstawioną w obszar MCS wektora.

Wynalazek dotyczy również kompozycji zawierającej szczep *B. subtilis* według wynalazku. W korzystnej kompozycji szczep *B. subtilis* jest w postaci żywych niesporulujących bakterii i/lub liofilizowanych bakterii i/lub spor. Korzystnie taka kompozycja jest kompozycją immunogenną, korzystnie w postaci przeznaczonej do podawania drogą pokarmową, bardziej korzystnie w postaci rozpuszczalnych w jelicie, korzystnie w krańcowym odcinku jelita cienkiego kapsulek. W korzystnym wykonaniu kompozycji taka kompozycja jest kompozycją antynowotworową, korzystnie w takiej kompozycji antynowotworowej komórki szczepu *B. subtilis* są immobilizowane na nośniku, korzystnie włóknach półprzepuszczalnych.

Wynalazek dotyczy również zastosowania szczepu bakteryjnego *B. subtilis* według wynalazku albo kompozycji immunogennej według wynalazku do wytwarzania szczepionki przeznaczonej do immunizacji zwierząt, korzystnie ssaków.

Wynalazek ponadto dotyczy sposobu wytwarzania kompozycji według wynalazku, który to sposób obejmuje mieszanie szczepu bakteryjnego według wynalazku z dopuszczalną farmaceutycznie lub weterynaryjnie zaróbką lub nośnikiem, przy czym korzystnie szczep *B. subtilis* jest w postaci żywych niesporulujących bakterii, liofilizowanych bakterii, spor.

W innym aspekcie wynalazek dotyczy zastosowania szczepu bakteryjnego *B. subtilis* według wynalazku do wytwarzania preparatu przeznaczonego do terapii nowotworów, korzystnie u ssaków.

Wynalazek ponadto dotyczy systemu do porównywania ekspresji genu w warunkach konstytutywnych i indukcji obejmującego wektory ekspresyjne według wynalazku.

W jeszcze innym aspekcie wynalazek dotyczy zastosowania wektora ekspresyjnego według wynalazku do ekspresji genów w komórkach *B. subtilis*.

Termin "funkcjonalna pochodna plazmidu" pUltR (Sek. Id. Nr. 1) albo pUltK (Sek. Id. Nr. 2) obejmuje plazmidy o sekwencji nukleotydowej kodującej otwarte ramki odczytu, które kodują produkty zawierające identyczną lub wysoce homologiczną sekwencję aminokwasową lub nukleotydową do sekwencji kodowanych przez plazmid pUltR albo pUltK, których sekwencje kodujące lub inne sekwencje plazmidu zostały zmienione np. przez podstawienie, zastąpienie, delecję czy insercję tak, że nie zmienia to zasadniczo aktywności produktów tych otwartych ramek odczytu i umożliwia zachowanie funkcjonalnych właściwości niesionych przez plazmid pUltR albo pUltK. Termin ten odnosi się także do scharakteryzowanych powyżej plazmidów, w których w miejsce MCS wstawione są pełne lub częściowe sekwencje kodujące geny, których produkty białkowe wykazują immunogenność. Wytworzone ulepszone plazmidy pUltR oraz pUltK oraz ich funkcjonalne pochodne umożliwiają szerokie wykorzystanie otrzymywanych przy ich udziale szczepów *B. subtilis* do konstrukcji wektorów szczepionkowych. Plazmid pUltR zapewnia syntezę antygenów klonowanych w obszar MCS w obecności induktora IPTG dzięki obecności promotora  $p_{\text{spac}}$ , przez co możliwe jest śledzenie i uzyskanie ekspresji w ściśle określonych ramach czasowych i tym samym dobranie parametrów układu najskuteczniejszego w immunizacji. Szczepy konstytutywnie produkujące antygeny dzięki wprowadzeniu plazmidu pUltK, korzystnie służą natomiast do ich wykorzystania *in vivo*, ponieważ niemożliwe jest dostarczanie induktora do organizmów ssących. Stąd szczepy *B. subtilis* obejmujące pUltK są szczególnie stosowane do wytwarzania szczepionek i kompozycji immunogennych. Konstytutywna ekspresja antygenów będzie się przyczyniała również do zwiększonej odpowiedzi immunologicznej, czego dowodem są wyniki badań, w których wykazano, że szczepy *B. subtilis* konstytutywnie produkujące listeriolizynę O wykazują większą inwazyjność względem mysich makrofagów linii IC-21 (patrz Fig. 4). Konstytutywna ekspresja u *L. monocytogenes* innej toksyny zwanej listeriolizyną S przyczynia się do zwiększenia cytotoksyczności szczepów bakteryjnych względem komórek eukariotycznych (Cotter P. D., et al. (2008) Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 4: 1 – 10).

Powszechne wykorzystanie komórek *L. monocytogenes* wiąże się ze zdolnością do wnikania do komórek eukariotycznych oraz szeroką wiedzą na temat mechanizmów immunologicznych towarzyszących infekcji, a w szczególności indukcji odpowiedzi komórkowej. Wykorzystanie tej bakterii wiąże się jednak z ryzykiem rozległej infekcji, gdyż oprócz listeriolizyny O koduje ona także inne czynniki patogenezy, a ustalenie odpowiedniej proporcji między toksycznością a immunogennością stanowi dużą trudność (Medina E., Guzman C. A. (2001) Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 19: 1573–1580). Ryzyko stanowi zarówno możliwość rewersji atenuowanych szczepów *L. monocytogenes* do fenotypu wirulentnego, a także ich niestabilność genetyczna. *B. subtilis* wydzielający tylko jeden czynnik patogenezy *L. monocytogenes* tworzy bezpieczne narzędzie do wywoływania silnej, komórkowej odpowiedzi immunologicznej, co zostało potwierdzone w badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem spor *B. subtilis*, na powierzchni których listeriolizyna O została poddana fuzji z białkami płaszcza spory (Huang J.-M., La Ragione R. M., Cooley W. A., Todryk S., Cutting S. M. (2008) Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine* 26: 6043 – 6052).

Zmodyfikowane integracyjne wektory ekspresyjne według wynalazku będące pochodnymi pKG09 (pAG58-ble-hly) nazwane zostały odpowiednio pUltR (Sek. Id. Nr. 1) i pUltK (Sek. Id. Nr. 2). Charakteryzują się one zmniejszonym rozmiarem docelowym niż plazmid wyjściowy dzięki usunięciu zbędnej sekwencji *cat* (kodującej oporność na chloramfenikol, na który szczep *B. subtilis*, do którego wektory pochodne pAG58 ulegają integracji, jest oporny) i obecnością genu oporności na kanamycynę umożliwiającą dodatkową selekcję mutantów w *B. subtilis*. Według wynalazku pUltR i pUltK umożliwiają badanie dwóch typów ekspresji obcych białek – odpowiednio konstytutywnej oraz indukowanej, zależnej od induktora IPTG. Zaletami wektorów są: sprawniejszy proces transferu wektorów do komórki *B. subtilis* oraz zdolność do przenoszenia większych odcinków obcego DNA ze względu na ich mniejszy rozmiar, możliwość dokładniejszej oraz znacznie bardziej ekonomicznej selekcji przy użyciu kanamycyny oraz możliwość konstytutywnej ekspresji obcych genów, a co za tym idzie wykorzystania szczepu *B. subtilis* wytwarzającego listeriolizynę O w terapii i do wytwarzania preparatów do immunizacji. Komórki bakteryjne *B. subtilis* produkujące listeryjną toksynę (LLO), dzięki jej aktywności prowadzącej do perforacji błony wakuolarnej, są w stanie wydostać się z fagosomów komórki eukariotycznej do cytoplazmy. Obce antygeny trafiające do cytozolu komórki gospodarza są w konsekwencji prezentowane w kontekście układu zgodności tkankowej MHC I i przyczyniają się do powstania komórkowej odpowiedzi immunologicznej cytotoksycznych

limfocytów T skierowanej przeciw tym antygenom. Koekspresja genu *hly* z innymi antygenami prowadzi ponadto do wzmożonej prezentacji tych immunogenów przez cząsteczki MHC klasy I (Hu P. Q., Tuma-Warrino R. J., Bryan M. A., Mitchell K. G., Higgins D. E., Watkins S., Salter R. D. (2004) *Escherichia coli* expressing recombinant antigen and listeriolysin O stimulate class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells following uptake by human APC. *J Imm* 172: 1595 – 601; Radford K. J., Higgins D. E., Pasquini S., Cheadle E. J., Carta L., Jackson A. M., Lemoine N. R., Vassaux G. (2002) *Gene Therapy*: 1455 – 1463).

Rozbudowany obszar MCS wektorów pUltR oraz pUltK służy do klonowania genów kodujących antygeny, a uzyskane plazmidy są stosowane w konstrukcji szczepów bakteryjnych używanych do immunizacji. Wektory pUltR oraz pUltK mogą stanowić nośnik jakiegokolwiek genu lub jego fragmentu wstawionego w obszar MCS zgodnie z otwartą ramką odczytu, dzięki czemu szczepy powstałe przy ich udziale mogą stanowić uniwersalną platformę szczepionkową. Szczególnie obiecujące jest klonowanie genów kodujących białka patogenów wewnątrzkomórkowych (bakterii, wirusów, pierwotniaków) lub białka komórek nowotworowych, ze względu na to, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja mikroorganizmu bądź nowotworu uniemożliwia identyfikację przez układ odpornościowy i skuteczne ograniczenie stanu chorobowego. Znane są szczepionki konstruowane na bazie żywych komórek bakteryjnych gatunków patogennych jak i niepatogennych, wytwarzających immunogenne białka, m. in. toksynę tężca, białko Gag wirusa HIV czy białko LACK pasożytniczego pierwotniaka *Leishmania major* (Detmer A., Glenting J. (2006) *Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. Microbial Cell Factories* 5: 23) jednak nie są znane szczepionki oparte na żywych bakteriach *B. subtilis*. Stąd przykładowo wektory pUltR oraz pUltK oraz szczepy *B. subtilis* je zawierające mogą stanowić nośnik dla antygenów wirusowych np. dla antygenów wirusa grypy, bakterii wewnątrzkomórkowych np. *Mycobacterium tuberculosis* czy też antygenów nowotworowych np. związanych z białaczką.

Jednym z typów szczepionek, który skupia zainteresowanie w ostatnich latach są rekombinowane szczepy *L. monocytogenes*, które efektywnie, i względnie bezpiecznie niosą geny warunkujące powstanie białek charakterystycznych dla innych bakterii. Wykorzystuje się nie tylko *L. monocytogenes*, ale również inne gatunki bakterii, do których wprowadzony gen umożliwia powstanie białek charakterystycznych dla *Listeria*. Dzięki aktywności LLO, także inne bakterie, również niepatogenne, takie jak *B. subtilis* mogą wnikać do cytoplazmy komórek eukariotycznych i doprowadzić do prezentacji niesionych przez nie antygenów na powierzchni komórki w kompleksie MHC I. Taki sposób prezentacji antygenów umożliwia zwiększenie liczebności klonów swoistych limfocytów T cytotoksycznych (CTL) skierowanych przeciw wybranemu antygenowi, charakteryzującemu dany mikroorganizm

patogenny lub komórkę nowotworową. Szczepionka skonstruowana na bazie *B. subtilis* umożliwia bezpieczne dostarczanie antygenów bezpośrednio do wnętrza komórki eukariotycznej, gdyż gatunek ten jest niepatogenny, a ekspresja heterologicznego białka, jakim jest listeriolizyna O ograniczona jest jedynie do wakuoli komórki gospodarza ze względu na zakres pH, w którym aktywna jest ta toksyna. Po sklonowaniu do wektora pUltR lub pUltK sekwencji kodującej wybrany antygen uzyskuje się szczep *B. subtilis* niosący taki plazmid zawierający określony antygen i stosuje jako szczepionkę. Spektrum metod dostarczania bakterii do organizmu ssaczego jest szerokie, jednak najbardziej korzystną jest dostarczanie preparatu żywych niesporulujących bakterii lub liofilizowanych bakterii lub spor drogą pokarmową z wykorzystaniem nierozpuszczalnych kapsułek (Lee S., et al. (2010) Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1647 – 1655; Huang J.-M., et al. (2008) Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine* 26: 6043 – 6052). Nabłonek jelita cienkiego jest miejscem występowania komórek prezentujących antygen w MHC klasy I (komórek dendrytycznych, makrofagów), w związku z czym droga prezentacji antygeny dla *B. subtilis* obejmującego plazmid według wynalazku z wstawionym do niego i wyrażanym określonym antygenem jest skrócona. Ponadto, *B. subtilis* jest gatunkiem, który tworzy florę bakteryjną ssaków i powszechnie występuje w środowisku naturalnym, w związku z czym ograniczone jest wywołanie odpowiedzi immunologicznej przeciw składnikom komórki bakteryjnej innym niż obce antygeny produkowane przez szczepy bakteryjne w wyniku integracji modyfikowanych plazmidów pUltR i pUltK według wynalazku.

Korzystnie preparat immunologiczny według wynalazku podawany będzie drogą pokarmową w postaci umożliwiającej jego uwolnienie do układu pokarmowego w jelicie, a w szczególności w krańcowym odcinku jelita cienkiego, w którym rezydują komórki prezentujące antygen (makrofagi i komórki dendrytyczne). W ścianie jelita występują rozproszone limfocyty, jak i grudki limfatyczne będące skupiskami komórek odpornościowych zwane kępkami Peyera. Tkanka limfatyczna związana ze ścianą jelit jest więc największym skupiskiem limfocytów w organizmie ludzkim, stąd uwalnianie szczepów *B. subtilis* zawartych w preparacie immunologicznym według wynalazku dopiero w świetle jelita będzie dawało największą skuteczność działania tego preparatu.

Istnieje też możliwość wykorzystania produktów *B. subtilis* niosących pUltR lub pUltK według wynalazku do bezpośredniego zabijania komórek nowotworowych w procesie apoptozy i nekrozy, a więc działania na wzór chemioterapii, a nie immunoterapii. Umieszczenie zrekombinowanych komórek *B. subtilis* w sąsiedztwie komórek nowotworowych stwarza szansę na ich eradykację, a więc leczenie chorób nowotworowych.

Komórki *B. subtilis* poddaje się immobilizacji w nośniku tj. włóknach półprzepuszczalnych i umieszcza bezpośrednio w pobliżu guzów nowotworowych. Badania z wykorzystaniem znanego szczepu *B. subtilis* MB4 kodującego listeriolizynę O udowodniły cytotoksyczny wpływ żywych immobilizowanych komórek *B. subtilis* na komórki limfocytów T linii Jurkat wyprowadzonej od pacjenta z przewlekłą białaczką (Stachowiak R., et al. (2011) Cytotoxicity of listeriolysin O produced by membrane-encapsulated *Bacillus subtilis* on leukemia cells. J Microbiol Biotechnol 21(11): 1193 – 1198).

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są również niniejszym włączone jako referencje.

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

**Fig. 1** Przedstawia strukturę genetyczną wektora pUltR, przy czym poszczególne skróty oznaczają: *kan* – gen oporności na kanamycynę, *ble* – gen oporności na bleomycynę, *p<sub>pcn</sub>* – promotor genu *lacI*, *lacI* – gen represora operonu laktozowego, *ColEI* – *ori* replikacji plazmidu, *bla* – gen oporności na ampicylinę, *p<sub>spac</sub>* – promotor kasety SPAC, *hly* – gen kodujący listeriolizynę O. Zaznaczono również miejsca cięcia niektórych restryktaz.

**Fig. 2** Przedstawia strukturę genetyczną wektora pUltR, przy czym poszczególne skróty mają znaczenie jak podane dla Fig. 1 Zaznaczono również miejsca cięcia niektórych wskazanych restryktaz.

**Fig. 3** Przedstawia sekwencję nukleotydową obszaru MCS wytworzonego w Przykładzie 2 o wielkości 256 bp z zaznaczonymi miejscami cięcia dla różnych restryktaz.

**Fig. 4** Przedstawia wykres wyników dla badania inwazyjności szczepów *B. subtilis* produkujących listeriolizynę O względem mysich makrofagów linii IC-21. Szczepy wytwarzające konstytutywnie listeriolizynę O wykazują zwiększoną inwazyjność.

Poniższe przykłady zostały umieszczone jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach. W poniższych przykładach, jeśli nie wskazano inaczej stosowano standardowe materiały i metody opisane w Sambrook J. Et al., „Molecular Cloning: A Laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition. 1989. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor laboratory Press” lub postępowano zgodnie z zaleceniami producentów dla określonych materiałów i metod.

## Przykłady

**Przykład 1. Wytworzenie fragmentu niosącego geny oporności na kanamycynę i bleomycynę.**

Na matrycy plazmidu pUB110 (nr ATCC 37015, GenBank: X03885) przeprowadzono w standardowych warunkach reakcję PCR stosując jako startery:

KanBleR: 5' GCGGTCGACGAATAAGAACGGTGCTCTCC 3' (Sek. Id. Nr. 3), i

KanBleL: 5' GCGACGCATGCTTACCGAAAGCCAGACTCAG 3' (Sek. Id. Nr. 4)

i wytworzono fragment DNA o wielkości 1638 bp niosący geny oporności na kanamycynę oraz bleomycynę.

### **Przykład 2. Przygotowanie fragmentu MCS do klonowania w pKG11.**

Sekwencja MCS (ang. Multi Cloning Site) dsDNA o wielkości 256 bp (Fig. 3) nosząca sekwencje rozpoznawane przez liczne komercyjnie dostępne restryktazy została zaprojektowana i zsyntetyzowana *de novo* (synteza przeprowadzona w GeneArt) i wklonowana do plazmidu pMA (komercyjny nośnik syntetyzowanej sekwencji). Sekwencja obszaru MCS została zaprojektowana na nowo w taki sposób, aby dodać jak najwięcej miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez restryktazy i których przecięcie skutkowałoby linearyzacją plazmidu. Plazmid pMA, namnożono i przy pomocy enzymów *Kpn* I oraz *Sal* I i wycięto z niego fragment o wielkości 256 bp (Fig. 3), który następnie posłużył do ligacji z trawionym tymi samymi enzymami plazmidem pKG11 (patrz Przykład 4).

### **Przykład 3. Wytworzenie plazmidu pKG11.**

Wektor ekspresyjny pKG09 strawiono enzymami restrykcyjnymi *Bam* HI i *Aan* I. Mieszaninę potrawienną rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym, z którego wycięto i oczyszczono odcinek DNA o wielkości ok. 6,5 kb niosący niezbędną do powstania wektora informację genetyczną. Otrzymaną strukturę otwartą poddano ligacji do formy kolistej w warunkach znanych specjalistom, w wyniku, której powstał wektor o mniejszej wielkości nazwany pKG10. W ten sposób usunięto z pKG09 fragment DNA niosący sekwencję nukleotydową nieistotną w procesie replikacji, stabilnym utrzymaniu plazmidu w komórce gospodarza czy selekcji antybiotykowej. Produktem ligacji transformowano komórki *E. coli*, z których następnie izolowano DNA plazmidowe i prowadzono analizę restrykcyjną wektora, potwierdzającą poprawność sekwencji.

Następnie wektor pKG10 strawiono kolejno enzymami restrykcyjnymi *Sal* I oraz *Sph* I, a zlinearyzowany wektor zligowano z produktem PCR również trawionym *Sal* I oraz *Sph* I otrzymanym w Przykładzie 1 niosącym geny oporności na kanamycynę oraz bleomycynę. Uzyskany plazmid transformowano do komórek *E. coli*, namnożono i wyizolowano oraz sprawdzono poprawność jego konstrukcji przy pomocy trawień enzymami restrykcyjnymi. Uzyskany w ten sposób wektor nazwano pKG11.

### **Przykład 4. Wytworzenie plazmidu pUltR.**

Plazmid pKG11 uzyskany w Przykładzie 3, strawiono enzymami restrykcyjnymi *Kpn* I oraz *Sal* I i wstawiono za pomocą ligacji w to miejsce fragment MCS (którego sekwencja przedstawiona jest na Fig. 3) o wielkości 256 bp, niosącego sekwencje rozpoznawane przez liczne komercyjnie dostępne restryktazy otrzymane w Przykładzie 2, uprzednio trawione tymi samymi restryktazami. Produktem ligacji transformowano komórki *E. coli*, izolowano z nich plazmidowy DNA i potwierdzono insercję MCS w analizie restrykcyjnej. Otrzymany ostateczny wektor nazwano pUltR. Jego schematyczną budowę przedstawiono na Fig.1 natomiast pełną sekwencję na Sek. Id. Nr. 1. Zsyntetyzowany obszar MCS umożliwia, oprócz klonowania kolejnych fragmentów DNA przy użyciu lepkich bądź tępych końców, usunięcie genu *hly* poprzez strawienie plazmidu pUltR enzymami *Xba* I i *Bcu* I, gdyby zaistniała potrzeba usunięcia genu kodującego toksynę (genu *hly*) z wektora.

#### **Przykład 5. Wytworzenie plazmidu pUltK.**

W celu uzyskania wektora pUltK umożliwiającego konstytutywną ekspresję w *B. subtilis* z wektora pUltR usunięto gen represora *lacI*. W tym celu plazmid pUltK uzyskany w Przykładzie 4 strawiono plazmid restryktazami *Sph* I i *Psy* I i poddano przecięty wektor cyrkularyzacji przy pomocy ligazy w standardowych warunkach. Produktem ligacji transformowano *E. coli*, izolowano DNA plazmidowe i analizowano restrykcyjnie. W ten sposób uzyskano wektor pUltK. Jego schematyczną budowę przedstawiono na Fig.2 natomiast pełną sekwencję na Sek. Id. Nr. 2.

#### **Przykład 6. Zwiększona wydajność selekcji dla *B. subtilis* z zastosowaniem plazmidu pUltK w porównaniu do plazmidu pUltR.**

W celu zmierzenia wydajności selekcji kanamycynowej, wykonano szereg antybiotykový, w którym komórki szczepu *B. subtilis* 979 lub szczepów pochodnych wysiewano na szalki zawierające różne stężenia antybiotyku. Analizowano wzrost szczepu *B. subtilis* o fenotypie dzikim, komórek kompetentnych tego szczepu, komórek kompetentnych inkubowanych z plazmidem pUltR oraz szczepu transformowanego plazmidem pUltK. Wzrost kolonii po transformacji plazmidem pUltR jest zahamowany przy stężeniu 10 µg/ml (kolonie widoczne przy 5 µg/ml), podczas gdy transformanty uzyskane po transformacji plazmidem pUltK rosną jeszcze przy stężeniu 40 µg/ml.

#### **Przykład 7. Zbadanie inwazyjności szczepów *B. subtilis* produkujących listeriolizynę O względem mysich makrofagów linii IC-21.**

Inwazyjność szczepów *B. subtilis* o fenotypie niezmodyfikowanym (979), fakultatywnie produkującego listeriolizynę O (BR1S) oraz konstytutywnie wytwarzającego toksynę (BR1C) analizowano na podstawie testu gentamycynowego. Hodowle bakteryjne odmładzano do osiągnięcia odpowiedniej gęstości optycznej odpowiadającej określonej ilości komórek

bakteryjnych, a następnie dodawano przygotowane komórki bakteryjne do hodowli mysich makrofagów linii IC-21. Po godzinnej inkubacji bakterie, które nie wniknęły do wnętrza makrofagów eliminowano na drodze odpłukiwania i inkubacji w podłożu z gentamycyną. Bakterie znajdujące się we wnętrzu komórek eukariotycznych były chronione przed działaniem antybiotyku. Po odpowiednich czasach inkubacji, określonych na Fig. 4, makrofagi zostawały poddane lizie przy użyciu Tritonu X-100, a otrzymane lizaty wysiewano na szalki z pożywką hodowlaną dla bakterii. Dzięki temu możliwe było określenie liczby bakterii, które dokonały inwazji i określenie współczynnika inwazyjności dla poszczególnych szczepów. Wyniki przedstawiono na Fig. 4.

Na poniższym wykazie sekwencji:

- Sek. Id. Nr. 1 odpowiada sekwencji plazmidu pUltR;
- Sek. Id. Nr. 2 odpowiada sekwencji plazmidu pUltK;
- Sek. Id. Nr. 3 odpowiada sekwencji startera KanBleR;
- Sek. Id. Nr. 4 odpowiada sekwencji startera KanBleL.

## PK/1623/AGR

### WYKAZ SEKWENCJI

<110> Uniwersytet Warszawski  
<120> Zmodyfikowane plazmidowe wektory ekspresyjne, szczepy *B. subtilis* je  
obejmujące oraz ich zastosowania  
<130> PK/1623/AGR  
<160> 4  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 7634  
<212> DNA  
<213> plasmid pUltR

<400> 1

```
cgagcactgt gtagactag tgtggcgcgc catggcgatc gcagatccta ggctttcgaa      60
aacctcagg tagctcagca cacctgactg aggtgtgctg cgcgaccgc ggtgcccggg      120
ctcggaccgt cgagctcatg ttaattaatg cctcgagatc ccaggggtgac cctgcaggtg      180
aggcccatat ggccagctcg ccggcgatgc acgtgtagag acatctgtct gatcgcgaac      240
agtgcagcga taagaacggt gctctccaaa tattcttatt tagaaaagca aatctaaaat      300
tatctgaaaa gggaatgaga atagtgaatg gaccaataat aatgactaga gaagaaagaa      360
tgaagattgt tcatgaaatt aaggaacgaa tattggataa atatggggat gatgttaagg      420
ctattgggtg ttatggctct cttggctcgc agactgatgg gccctattcg gatattgaga      480
tgatgtgtgt catgtcaaca gaggaagcag agttcagcca tgaatggaca accggtgagt      540
ggaaggtgga agtgaatttt gatagcgaag agattctact agattatgca tctcaggtgg      600
aatcagattg gccgcttaca catggtcaat ttttctctat tttgccgatt tatgattcag      660
gtggatactt agagaaaagt tatcaaaactg ctaaactcgg agaagcccaa acgttccacg      720
atgcgatttg tgcccttata gtagaagagc tgtttgaaata tgcaggcaaa tggcgtaata      780
ttcgtgtgca aggaccgaca acatttctac catccttgac tgtacaggta gcaatggcag      840
gtgccatggt gattgggtctg catcatcgca tctgttatac gacgagcgt tccggtcttaa      900
ctgaagcagt taagcaatca gatcttcctt caggttatga ccatctgtgc cagttcgtaa      960
tgtctgggtca actttccgac tctgagaaac ttctggaatc gctagagaat ttctggaatg     1020
ggattcagga gtggacagaa cgacacggat atatagtgga tgtgtcaaaa cgcataccat     1080
tttgaacgat gacctctaat aattgttaat catgttgggt acgtatttat taacttctcc     1140
tagtattagt aattatcatg gctgtcatgg cgcattaacg gaataaaggg tgtgcttaaa     1200
tcgggccatt ttgcgtaata agaaaaagga ttaattatga gcgaattgaa ttaataataa     1260
ggtaatagat ttacattaga aaatgaaagg ggattttatg cgtgagaatg ttacagtcta     1320
tcccggcatt gccagtcggg gatattaaaa agagtatagg tttttattgc gataaactag     1380
gtttcacttt ggttcaccat gaagatggat tcgcagttct aatgtgtaat gaggttcgga     1440
ttcatctatg ggaggcaagt gatgaaggct ggcgctctcg tagtaatgat tcaccggttt     1500
gtacaggtgc ggagtcgttt attgctggta ctgctagttg ccgcattgaa gtagagggaa     1560
ttgatgaatt atatcaacat attaagcctt tgggcatttt gcaccccaat acatcattaa     1620
aagatcagtg gtgggatgaa cgagactttg cagtaattga tcccgacaac aatttgatta     1680
gcttttttca acaataaaaa agctaaaaatc tattattaat ctgttcagca atcgggcgcg     1740
attgctgaat aaaagatacg agagacctct cttgtatctt ttttattttg agtggttttg     1800
```

PK/1623/AGR

tccgttacac tagaaaaccg aaagacaata aaaattttat tcttgctgag tctggctttc 1860  
 ggtaagcatg caagctaatt cggtggaaac gaggtcatca tttccttccg aaaaaacggt 1920  
 tgcatttaaa tcttacatat gtaatacttt caaagactac atttgtaaga tttgatgttt 1980  
 gagtcggctg aaagatcgta cgtaccaatt attgtttcgt gattgttcaa gccataacac 2040  
 tgtagggata gtggaaagag tgcttcatct ggttacgatc aatcaaatat tcaaacggag 2100  
 ggagacgatt ttgatgaaac cagtaacggt atacgatgtc gcagagtatg ccggtgtctc 2160  
 ttatcagacc gtttcccgcg tggtgaacca ggccagccac gtttctgcga aaacgcggga 2220  
 aaaagtggaa gcggcgatgg cggagctgaa ttacattccc aaccgcgtgg cacaacaact 2280  
 ggcgggcaaa cagtcggtgc tgattggcgt tgccacctcc agtctggccc tgcacgcgcc 2340  
 gtcgcaaatt gtcgcggcga ttaaatctcg cgccgatcaa ctgggtgcca gcgtggtggt 2400  
 gtcgatggta gaacgaagcg gcgtcgaagc ctgtaaaacg gcggtgcaca atcttctcgc 2460  
 gcaacgcgtc agtgggctga tcattaacta tccgctggat gaccaggatg ccattgctgt 2520  
 ggaagctgcc tgcactaatg ttccggcgtt atttcttgat gtctctgacc agacacccat 2580  
 caacagtatt attttctccc atgaagacgg tacgcgactg ggcgtggagc atctggtcgc 2640  
 attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc gggcccatta agttctgtct cggcgcgtct 2700  
 gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagccga tagcggaacg 2760  
 ggaagcgcac tggagtgcca tgtccggtt tcaacaaacc atgcaaatgc tgaatgaggg 2820  
 catcgttccc actgcgatgc tggttgccaa cgatcagatg gcgctgggcg caatgcgcgc 2880  
 cattaccgag tccgggctgc gcgttggtgc ggatatctcg gtagtgggat acgacgatac 2940  
 cgaagacagc tcatgttata tcccgcggtt aaccaccatc aaacaggatt ttcgctgct 3000  
 ggggcaaac agcgtggacc gcttgtgca actctctcag ggccaggcgg tgaagggcaa 3060  
 tcagctggtg cccgtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgccca atacgcaaac 3120  
 cgcctctccc cgcgcggttg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact 3180  
 ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta ggatctaata tgagataatg 3240  
 ccgactgtac tttttacagt cggttttcta atgtcactaa cctgccccgt tagttgaaga 3300  
 aggtttttat attacagctc cactgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct 3360  
 gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac 3420  
 aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgtg gcgggtgtcg gggcgcagcc atgaccagc 3480  
 cacgtagcga tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact 3540  
 gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat 3600  
 caggcgtct tccgcttct cgtcactga ctgcgtgcgc tcggtegttc ggctgcggcg 3660  
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 3720  
 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt 3780  
 gctggcggtt ttccataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 3840  
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 3900  
 cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc 3960  
 ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 4020  
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagcc gctgcgcctt 4080  
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacct ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 4140  
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa 4200  
 gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 4260  
 gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 4320  
 tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 4380

PK/1623/AGR

agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	4440
gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	4500
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	4560
aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	4620
ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	4680
gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	agccagccgg	4740
aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	ctattaattg	4800
ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagtctgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	ttgttgccat	4860
tgctgcaggc	atcgtggtgt	cacgctcgtc	gtttggtatg	gcttcattca	gctccggttc	4920
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	4980
cggctctccg	atcgtttgtca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	5040
agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	tgactgggtga	5100
gtactcaacc	aagtcatctt	cagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	cttgcccggc	5160
gtcaacacgg	gataataaccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgctca	tcattggaaa	5220
acgttcttcg	gggcgaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	5280
accactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	5340
agcaaaaaca	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatggtg	5400
aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	5460
gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaacia	ataggggttc	cgcgcacatt	5520
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	taacctataa	5580
aaataggcgt	atcacgaggc	cctttcgtct	tcaagaattc	tacacagccc	agtccagact	5640
attcggcact	gaaattatgg	gtgaagtgg	caagacctca	ctaggcacct	taaaaatagc	5700
gcaccctgaa	gaagatttat	ttgaggtagc	ccttgcctac	ctagcttcca	agaaagatat	5760
cctaacagca	caagagcgga	aagatgtttt	gttctacatc	cagaacaacc	tctgctaaaa	5820
ttcctgaaaa	attttgcaaa	aagttgttga	ctttatctac	aaggtgtggc	ataatgtgtg	5880
gaattgtgag	cggataaacia	ttaagcttaa	ggaggtgatc	tagaagagag	gggtggcaaa	5940
cggtatattg	cattattagg	ttaaaaaatg	tagaaggaga	gtgaaacca	tgaaaaaat	6000
aatgctagtt	tttattacac	ttatattagt	tagtctacca	attgcgcaac	aaactgaagc	6060
aaaggatgca	tctgcattca	ataaagaaaa	ttcaatttca	tccatggcac	caccagcatc	6120
tccgcctgca	agtcctaaga	cgccaatcga	aaagaaacac	gcggatgaaa	tcgataagta	6180
tatacaagga	ttggattaca	ataaaaaacia	tgtattagta	taccacggag	atgcagtgac	6240
aatgtgccg	ccaagaaaag	gttacaaga	tggaaatgaa	tatattgttg	tgagaaaaa	6300
gaagaaatcc	atcaatcaaa	ataatgcaga	cattcaagtt	gtgaatgcaa	tttcgagcct	6360
aacctatcca	ggtgctctcg	taaaagcgaa	ttcggaaata	gtagaaaatc	aaccagatgt	6420
tctccctgta	aaacgtgatt	cattaacact	cagcattgat	ttgccaggta	tgactaatca	6480
agacaataaa	atagttgtaa	aaaatgccac	taaatcaaac	gttaacaacg	cagtaaatac	6540
attagtggaa	agatggaatg	aaaaatatgc	tcaagcttat	ccaaatgtaa	gtgcaaaaat	6600
tgattatgat	gacgaaatgg	cttacagtga	atcacaatta	attgcgaaat	ttggtacagc	6660
atntaaagct	gtaaataata	gcttgaatgt	aaacttcggc	gcaatcagtg	aagggaat	6720
gcaagaagaa	gtcattagtt	ttaaacaat	ttactataac	gtgaatgta	atgaacctac	6780
aagaccttcc	agatttttcg	gcaaagctgt	tactaaagag	cagttgcaag	cgcttgaggt	6840
gaatgcagaa	aatcctcctg	catatatctc	aagtgtggcg	tatggccgtc	aagtttattt	6900
gaaattatca	actaattccc	atagtactaa	agtaaaagct	gcttttgatg	ctgccgtaag	6960

PK/1623/AGR

cggaaaatct gtctcaggtg atgtagaact aacaaatata atcaaaaatt cttccttcaa 7020  
 agccgtaatt tacggagggt cgcgaaaaga tgaagttcaa atcatcgacg gcaacctcgg 7080  
 agacttacgc gatatthttga aaaaaggcgc tactthttaat cgagaaacac caggagttcc 7140  
 cattgcttat acaacaaact tcctaaaaga caatgaatta gctgttatta aaaacaactc 7200  
 agaatatatt gaaacaactt caaaagctta tacagatgga aaaattaaca tcgatcactc 7260  
 tggaggatac gttgctcaat tcaacatttc ttgggatgaa gtaaattatg atcctgaagg 7320  
 taacgaaatt gttcaacata aaaactggag cgaaaacaat aaaagcaagc tagctcattt 7380  
 cacatcgtcc atctatthtg ctggtaacgc gagaaatatt aatgthttacg ctaaagaatg 7440  
 cactggtthta gcttggggat ggtggagaac ggtaattgat gaccggaact taccacttgt 7500  
 gaaaaataga aatatctcca tctggggcac cacgctthtat ccgaaatata gtaataaagt 7560  
 agataatcca atcgaataat tgtaaaagta ataaaaaatt aagaataaaa ccgcttaaca 7620  
 cacacgaaag gtac 7634

<210> 2

<211> 6028

<212> DNA

<213> plasmid pUltK

<400> 2

cgagcactgt gtgagactag tgtggcgcgc catggcgatc gcagatccta ggctthtcgaa 60  
 aaccctcagg tagctcagca cacctgactg aggtgtgcgg ccgacgaccgc ggtgcccggg 120  
 ctcggaccgt cgagctcatg ttaattaatg cctcgagatc ccagggtgac cctgcagggtg 180  
 aggcccatat gccagctcg ccggcgatgc acgtgtagag acatctgtct gatcgcgaac 240  
 agtcgacgaa taagaacggt gctctccaaa tattcttatt tagaaaagca aatctaaaat 300  
 tatctgaaaa gggaatgaga atagtgaatg gaccaataat aatgactaga gaagaaagaa 360  
 tgaagattgt tcatgaaatt aaggaacgaa tattggataa atatggggat gatgttaagg 420  
 ctattgggtgt ttatggctct cttggctcgc agactgatgg gccctattcg gatattgaga 480  
 tgatgtgtgt catgtcaaca gaggaagcag agttcagcca tgaatggaca accggtgagt 540  
 ggaagggtgga agtgaattht gatagcgaag agattctact agattatgca tctcagggtg 600  
 aatcagattg gccgcttaca catggtcaat thttctctat thtgccgatt tatgattcag 660  
 gtggatactt agagaaaagt tatcaaaactg ctaaatcggg agaagccca acgtthccacg 720  
 atgcgatttg tgcccttatc gtagaagagc tgthttgaata tgcaggcaaa tggcgtaata 780  
 thcgtgtgca aggaccgaca acatthctac catccttgac tgtacaggta gcaatggcag 840  
 gtgccatgth gattggthctg catcatcgca tctgttatac gacgagcgtc thcgtcttaa 900  
 ctgaagcagt taagcaatca gatctthcct caggthtatga ccatctgtgc cagthcgtaa 960  
 tgtctggthca actthtccgac tctgagaaac thctggaatc gctagagaat thctggaatg 1020  
 ggattcagga gtggacagaa cgacacggat atatagthga thgtgtcaaaa cgcataccat 1080  
 ththgaacgat gacctctaat aatthgttaat catgthtggt acgththtat taactthctc 1140  
 tagthattag aattatcatg gctgtcatgg cgcattaacg gaataaaggg thgtgctthaa 1200  
 thcgggccatt thcgcgtaata agaaaaagga thtaattatga gcgaattgaa thtaataata 1260  
 ggtaatagat thacattaga aatgaaagg ggaaththtat cgtgagaatg thacagthcta 1320  
 thcccgccatt gccagthcgg gataththaaa agagthtatg thththattgc gataaactag 1380  
 gththcactth gththcaccat gaagatggat thcgcagthct aatgthgthaa gagththcgg 1440  
 thcatctatg ggaggcaagt gatgaaggct ggcgctctcg thagthaatg thcaccgthth 1500

PK/1623/AGR

gtacaggtgc ggagtcgttt attgctggta ctgctagttg ccgcattgaa gtagagggaa 1560  
 ttgatgaatt atatcaacat attaagcctt tgggcatttt gcaccccaat acatcattaa 1620  
 aagatcagtg gtgggatgaa cgagactttg cagtaattga tcccgacaac aatttgatta 1680  
 gcttttttca acaataaaaa agctaaaaatc tattattaat ctgttcagca atcgggcgcg 1740  
 attgctgaat aaaagatacg agagacctct cttgtatctt ttttattttg agtggttttg 1800  
 tccgttacac tagaaaaccg aaagacaata aaaattttat tcttgctgag tctggctttc 1860  
 ggtaagcatg cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca 1920  
 gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 1980  
 agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtctca ctgactcgtc gcgctcggtc 2040  
 gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 2100  
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 2160  
 aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 2220  
 aatcgacgct caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 2280  
 ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg 2340  
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 2400  
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 2460  
 gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 2520  
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct 2580  
 acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc 2640  
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 2700  
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 2760  
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 2820  
 aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 2880  
 ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 2940  
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcattc 3000  
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 3060  
 cccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 3120  
 aaccagccag ccggaagggc cgagcgaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc 3180  
 cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 3240  
 aacgttgttg ccattgctgc aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 3300  
 ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa 3360  
 gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 3420  
 ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 3480  
 tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctcagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 3540  
 tgctcttgcc cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 3600  
 ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 3660  
 tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 3720  
 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 3780  
 acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 3840  
 ggattattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 3900  
 gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg 3960  
 acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcctttc gtcttcaaga attctacaca 4020  
 gcccagtcca gactattcgg cactgaaatt atgggtgaag tggtaagac ctactaggc 4080

PK/1623/AGR

accttaaaaa tagcgcaccc tgaagaagat ttatttgagg tagcccttgc ctacctagct 4140  
 tccaagaaag atatcctaac agcacaagag cggaaagatg ttttgttcta catccagaac 4200  
 aacctctgct aaaattcctg aaaaattttg caaaaagttg ttgactttat ctacaaggtg 4260  
 tggcataatg tgtggaattg tgagcggata acaattaagc ttaaggaggt gatctagaag 4320  
 agaggggtgg caaacggtat ttggcattat taggttaaaa aatgtagaag gagagtgaaa 4380  
 cccatgaaaa aaataatgct agtttttatt aactttatat tagttagtct accaattgcg 4440  
 caacaaactg aagcaaagga tgcatctgca ttcaataaag aaaattcaat ttcattccatg 4500  
 gcaccaccag catctccgcc tgcaagtcct aagacgcca tcgaaaagaa acacgcggtat 4560  
 gaaatcgata agtatataca aggattggat tacaataaaa acaatgtatt agtataccac 4620  
 ggagatgcag tgacaaatgt gccgccaaga aaaggttaca aagatggaaa tgaatatatt 4680  
 gttgtggaga aaaagaagaa atccatcaat caaaaataatg cagacattca agttgtgaat 4740  
 gcaatttcga gcctaacctt tccaggtgct ctctgtaaaag cgaattcggga attagtagaa 4800  
 aatcaaccag atgttctccc tgtaaaacgt gattcattaa cactcagcat tgatttgcca 4860  
 ggtatgacta atcaagacaa taaaatagtt gtaaaaaatg ccactaaatc aaacgttaac 4920  
 aacgcagtaa atacattagt ggaaagatgg aatgaaaaat atgctcaagc ttatccaaat 4980  
 gtaagtcaa aaattgatta tgatgacgaa atggccttaca gtgaatcaca attaattgcg 5040  
 aaatttggtgta cagcatttaa agctgtaaat aatagcttga atgtaaactt cggcgcaatc 5100  
 agtgaaggga aaatgcaaga agaagtcat agtttttaaac aaatttacta taacgtgaat 5160  
 gttaatgaac ctacaagacc ttccagattt ttcggcaaag ctgttactaa agagcagttg 5220  
 caagcgcttg gagtgaatgc agaaaaatcct cctgcatata tctcaagtgt ggcgtatggc 5280  
 cgtcaagttt atttgaaatt atcaactaat tcccatagta ctaaagtaaa agctgctttt 5340  
 gatgctgccg taagcggaaa atctgtctca ggtgatgtag aactaacaaa tatcatcaaa 5400  
 aattcttcct tcaaagccgt aatttacgga ggttccgcaa aagatgaagt tcaaatcatc 5460  
 gacggcaacc tcggagactt acgcgatatt ttgaaaaaag gcgctacttt taatcgagaa 5520  
 acaccaggag ttcccattgc ttatacaaca aacttcctaa aagacaatga attagctggt 5580  
 attaaaaaca actcagaata tattgaaaca acttcaaaaag cttatacaga tggaaaaatt 5640  
 aacatcgatc actctggagg atacgttgct caattcaaca tttcttggga tgaagtaaat 5700  
 tatgatcctg aaggtaacga aattgttcaa cataaaaact ggagcggaaa caataaaagc 5760  
 aagctagctc atttcacatc gtccatctat ttgcctggta acgcgagaaa tattaatggt 5820  
 tacgctaaag aatgcactgg tttagcttgg gaatggtgga gaacggtaat tgatgaccgg 5880  
 aacttaccac ttgtgaaaaa tagaaatc tccatctggg gcaccacgct ttatccgaaa 5940  
 tatagtaata aagtagataa tccaatcgaa taattgtaaa agtaataaaa aattaagaat 6000  
 aaaaccgctt aacacacacg aaaggtac 6028

- <210> 3
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleotide
- <400> 3

gcggtcgacg aataagaacg gtgctctcc 29

**PK/1623/AGR**

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 4

gcgacgcatg cttaccgaaa gccagactca g

31