



(51) МПК
C12N 9/38 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008135344/10**, **23.01.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.01.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
31.01.2006 GB 0601901.2

(43) Дата публикации заявки: **10.03.2010** Бюл. № 7

(45) Опубликовано: **10.02.2012** Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **WO 2005003329 A1**, **13.01.2005. RU**
93045473 A, **20.04.1996. EP 0764720 A1**,
26.03.1997. WO 2004080200 A1, **23.09.2004.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: **01.09.2008**

(86) Заявка РСТ:
GB 2007/000178 (23.01.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/088324 (09.08.2007)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры", А.В.Мицу**

(72) Автор(ы):

**ЦОРЦИС Георгиос (GB),
 ГОУЛАС Атанасиос К. (GB),
 ГОУЛАС Теодорос (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

КЛАСАДО ИНК. (РА)

(54) ГАЛАКТОЗИДАЗА С АКТИВНОСТЬЮ АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биохимии. Представлена β -галактозидаза, имеющая трансгалактозилирующую активность, с последовательностью, представленной в описании, и кодирующая ее ДНК. Описан рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий указанную ДНК, и клетка-хозяин, содержащая представленный вектор или ДНК. Предложено применение фермента, имеющего трансгалактозилирующую активность, для получения смеси олигосахаридов, состоящей из дисахаридов, трисахаридов, тетрасахаридов и

пентасахарида. Описан способ получения указанного фермента, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствующей культуральной среде в условиях, допускающих экспрессию фермента, и выделение его из культуры. Описан также способ получения смеси олигосахаридов, включающий контактирование данного фермента или клетки-хозяина с материалом, содержащим лактозу. Изобретение позволяет получить смесь олигосахаридов путем ферментативной трансформации лактозы. 11 н. и 6 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 9/38 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2008135344/10, 23.01.2007

(24) Effective date for property rights:
23.01.2007

Priority:

(30) Priority:
31.01.2006 GB 0601901.2

(43) Application published: 10.03.2010 Bull. 7

(45) Date of publication: 10.02.2012 Bull. 4

(85) Commencement of national phase: 01.09.2008

(86) PCT application:
GB 2007/000178 (23.01.2007)

(87) PCT publication:
WO 2007/088324 (09.08.2007)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
A.V.Mitsu

(72) Inventor(s):

**TsORTsIS Georgios (GB),
GOULAS Atanasios K. (GB),
GOULAS Teodoros (GB)**

(73) Proprietor(s):

KLASADO INK. (PA)

(54) **GALACTOSIDASE WITH ALPHA-GALACTOSYLTRANSFERASE ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: present invention relates to a β -galactosidase with transgalactosylating activity with the sequence provided in the description and the relative coding DNC. A recombinant vector incorporating the DNA sequence and a host cell comprising the DNA sequence or the vector are also disclosed. The enzyme with transgalactosylating activity is proposed for producing a mixture of

oligosaccharides comprising disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides and pentasaccharides. Method for producing a mixture of oligosaccharides including bringing the enzyme or the host-cell in contact with the lactose-containing material.

EFFECT: invention enables the production of a mixture of oligosaccharides by enzymic lactose transformation.

17 cl, 4 dwg, 3 tbl, 2 ex

Настоящее изобретение относится к β -галактозидазе с трансгалактозилирующей активностью, способной превращать лактозу в смесь олигосахаридов, которые соединены β -связью, и неожиданно продуцировать дисахарид α 1-6-галактобиозу с α -связью. В частности, изобретение относится к β -галактозидазе, выделенной из недавно открытого штамма *Bifidobacterium bifidum*.

В частности, изобретение относится к последовательностям ДНК, кодирующим выделенный фермент β -галактозидазу, к ферменту, кодируемому последовательностью ДНК, и к клетке-хозяину, содержащей последовательность ДНК или рекомбинантный вектор, включающий последовательность ДНК. Настоящее изобретение также относится к применению фермента, кодируемого последовательностью ДНК, или клетки-хозяина, содержащей последовательность ДНК или рекомбинантный вектор, для производства олигосахаридов.

Бифидобактерии естественным образом колонизируют нижний отдел кишечного тракта, среда которого содержит незначительное количество моно- и дисахаридов, поскольку такие сахара преимущественно потребляют хозяин и микроорганизмы, присутствующие в верхнем отделе кишечного тракта. Для того чтобы существовать в нижнем отделе кишечного тракта, бифидобактерии продуцируют различные поверхностно-связанные экзо- и эндогликозидазы и/или внеклеточные формы, с помощью которых они могут утилизировать различные углеводы.

Наряду с гидролазной активностью, некоторые ферменты бифидобактерий обладают трансферазной активностью. Эта трансгликозилирующая активность гликозидаз широко используется для ферментативного синтеза различных олигосахаридов, которые оказались способными действовать в качестве факторов, стимулирующих рост бифидобактерий.

Известно, что представители бифидобактерий продуцируют ферменты β -галактозидазы, которые участвуют в бактериальном метаболизме лактозы. Møller, P.L. et al. в *Appl & Environ. Microbiol.*, (2001), 62, (5), 2276-2283 описывают выделение и дают характеристики трех β -галактозидазных генов из штамма *Bifidobacterium bifidum*. Они обнаружили, что все три β -галактозидазы способны катализировать образование бета-связанных галактоолигосахаридов посредством трансгалактозилирования.

Dumortier et al. в *Carbohydrate Research*, 201, (1990), 115-123 описали образование бета-связанных олигосахаридов по реакции транслактозилирования при гидролизе лактозы *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456. Их анализ структуры смеси продуцируемых олигосахаридов показал, что эти связи были β -(1 \rightarrow 3)-, β -(1 \rightarrow 6)- и β -(1 \rightarrow 4)-D-галактозильными связями. Dumortier предположил, что соединения, продуцируемые *Bifidobacterium bifidum*, необходимы для адгезии бактерий в толстом кишечнике.

Был обнаружен штамм *Bifidobacterium bifidum*, способный продуцировать активный фермент галактозидазу, превращающий лактозу в новую смесь галактоолигосахаридов, которая, как неожиданно было обнаружено, содержит до 35% дисахаридов, включая галабиозу (Gal(α 1-6)-Gal). Известно (см. Paton, J C and Paton, A W (1998), *Clin. Microbiol. Revs.*, 11, 450-479; Carlsson, K A (1989), *Ann. Reviews Biochem.*, 58, 309-350), что этот дисахарид является антиадгезивом, способным предотвращать адгезию токсинов, например, токсина Shiga, и патогенов, таких как *E. coli*, к стенкам кишечника.

Этот штамм *B. bifidum* 31 марта 2003 года был депонирован в Национальной коллекции промышленных и морских бактерий, Абердин, Великобритания(Eng). Он также описан в патенте UK №2412380.

Было обнаружено, что штамм *B. bifidum* продуцирует несколько β -галактозидаз, одна из которых неожиданно демонстрирует активность α -галактозилтрансферазы. Этот фермент продуцирует ряд различных олигосахаридов, которые связаны β -связями, но также продуцирует и α -связанный дисахарид галабиозу.

Настоящее изобретение относится к последовательности ДНК, которая кодирует белок с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2, или в жестких условиях гибридизуется с последовательностью ДНК, которая кодирует этот белок. В SEQ ID NO: 1 дана эта последовательность ДНК, или ее фрагмент, или вырожденное производное.

Термин «вырожденное производное» означает последовательность ДНК, которая гомологична SEQ ID NO: 1 не менее чем на 50%, предпочтительно, на 50-98%, наиболее, предпочтительно, на 75-95%.

Такая последовательность ДНК может содержать нуклеотидные замены, добавления или делеции, которые в результате дают менее 60%, предпочтительно менее 45%, более предпочтительно менее 25% изменений в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ. ID NO: 2. Нуклеотидные замены могут в результате давать консервативные замены аминокислот.

В соответствии со вторым аспектом изобретение относится к ферменту, кодируемому последовательностью ДНК, определенной выше. Такой фермент может содержать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, или ее фрагмент.

В соответствии с третьим аспектом изобретение относится к рекомбинантному вектору, предпочтительно, вектору экспрессии, содержащему последовательность ДНК, определенную выше. Такой вектор может быть частью клетки-хозяина, такого как бактериальная, дрожжевая или грибковая клетка. Альтернативно, последовательность ДНК может быть частью такой клетки-хозяина.

Соответствующая клетка-хозяин может быть выбрана из *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis* или *Bacillus circulans*), *Escherichia* и *Aspergillus* (например, *Aspergillus niger*).

Используя лактозу в качестве субстрата, фермент, кодируемый последовательностью ДНК, определенной выше, продуцирует смесь дисахаридов, включающую Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal и Gal(α 1-6)Gal. В этой смеси олигосахаридов также присутствуют трисахариды Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc и пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.

Фермент клетки-хозяина, описанный выше, можно использовать для продуцирования смеси дисахаридов, включая Gal(α 1-6)Gal (галабиозу), которая может составить часть продукта, предназначенного для улучшения состояния здоровья кишечника. Такой продукт может быть выбран из группы, состоящей из молочных продуктов (например, жидкого молока, сухого молочного порошка, такого как порошок цельного молока, порошок обезжиренного молока, молочные порошки, обогащенные жиром, порошки молочной сыворотки, молоко для детей, детские молочные смеси, мороженое, детские пищевые продукты, йогурт, сыр, ферментированные молочные продукты), напитков, таких как фруктовый сок, детское питание, крупы, хлеб, печенье, кондитерские изделия, торты, пищевые добавки, диетические добавки, симбиотические пищевые продукты, пребиотические пищевые продукты, корма для животных, корма для птиц или вообще любые другие пищевые продукты или напитки.

Альтернативно, олигосахариды, произведенные таким образом, можно использовать для приготовления медикамента (например, в форме таблетки или капсулы) для предотвращения адгезии патогенов или токсинов, продуцируемых патогенами, к стенке кишечника. Этот медикамент можно вводить пациенту, например, после курса лечения антибиотиком, который часто изменяет или даже повреждает нормальную здоровую кишечную флору.

В соответствии с дальнейшим аспектом изобретение относится к способу производства фермента, определенного выше, который включает культивирование клетки-хозяина, определенной выше, в соответствующей культуральной среде в условиях, позволяющих экспрессию этого фермента, и выделение продуцированного фермента из этой культуры.

Изобретение также относится к способу получения смеси олигосахаридов, включая дисахарид Gal(α 1-6)-Gal (галабиозу), который включает контактирование фермента, определенного выше, или клетки-хозяина, определенной выше, с материалом, содержащим лактозу, в условиях, ведущих к образованию этой смеси олигосахаридов.

Подходящий материал, содержащий лактозу, может быть выбран из коммерчески доступной лактозы, цельного молока, полуобезжиренного молока, обезжиренного молока, молочной сыворотки и молока, обогащенного жиром, фильтрата молочной сыворотки. Такие молочные продукты могут быть получены от коров, буйволиц, овец или коз. Молоко, обогащенное жиром, определяют как цельное молоко, из которого удалили молочный жир, который затем заменили добавлением растительного жира или масла.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1 показана нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1) β -галактозидазы *Bifidobacterium bifidum* по изобретению; и

на фигуре 2 показана аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 2), соответствующая нуклеотидной последовательности фигуры 1;

на фигуре 3 представлен график, показывающий протекание во времени реакции при синтезе галактоолигосахарида с β -галактозидазой и 40% по массе лактозы в качестве субстрата в 0,1 М фосфатном буфере при pH 6,0; и

на фигуре 4 представлена высокоэффективная анионообменная хроматограмма смеси галактоолигосахаридов, синтетизированных β -галактозидазой из *B. bifidum* NCIMB 41171 с использованием 40% по массе лактозы в качестве субстрата в 0,1 М фосфатном буфере при pH 6,0. (Glc = глюкоза, Gal = галактоза, Lac = лактоза, α (1-6)галактобиоз, DP = степень полимеризации).

Геномную ДНК выделяли из штамма *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) с использованием способа Lawson et al. (1989) *Fems Microbiol Letters*, 65, (1-2), 41-45. ДНК обрабатывали ферментами рестрикции, и фрагменты с максимальным размером 15 т.п.н. лигировали с вектором pSP72, который подвергся действию тех ферментов рестрикции. Клетки *E. coli* трансформировали вектором, содержащим вставки, состоящие из хромосомной ДНК *B. bifidum*, обработанной (рестриктазами) PstI, EcoRI, Bam HI, KpnI, SmaI или HindIII. Клоны с β -галактозидазной активностью отобрали на агаровых средах Лурия-Бертани, содержащих п-нитрофенол, X- β -Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид) и изопропил- β -D-тиогалактозид (IPTG). Лигирующие смеси с хромосомной ДНК, переваренной Bam HI, дали семь клонов, положительных на β -галактозидазу, один из которых был идентифицирован как pB1.

Секвенирование вставленного фрагмента ДНК B1 проводили с использованием дидезоксинуклеотидного метода терминации цепи по Сенгеру (Russel P., 2002

iGenetics, Pearson Education, Inc., San Francisco, 187-189) с использованием набора для циклического секвенирования BigDye Terminator V.3.0 (Applied Biosystems, USA). Последовательность ДНК В1 показана на фигуре 1 (SEQ ID NO: 1).

Открытую рамку считывания (ORF) идентифицировали с помощью программы ORF Finder из NCBI (National Center of Biotechnology Information). Нуклеотидная последовательность Фигуры 1 была транслирована во всех шести возможных рамках считывания и была идентифицирована одна открытая рамка считывания (1052 аминокислот), кодирующая предполагаемую β-галактозидазу. Трансляция показана на Фигуре 2 (SEQ ID NO: 2).

Ниже настоящее изобретение описано со ссылками на следующие примеры.

Пример 1

Материалы и методы

Все химические реагенты и препараты сред, использованные в этой работе, были получены от Sigma (Dorset, UK), Invitrogen (Paisley, UK), Oxoid (Basingstoke, UK), Qiagen (West Sussex, UK) и Promega (Southampton, UK).

Бактериальные штаммы

Штамм *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) хранили на криогенных гранулах в пробирках Microbank при -70°C. Для последующих экспериментов штамм оживляли на агаре Wilkinson Chalgren (WC) (Oxoid, UK) и среде TRY (среда Триптиказа с фитонем и дрожжевым экстрактом) и выращивали анаэробно (состав CO₂ и N₂ - 80% и 20% соответственно) при 37°C в течение 48 часов. Морфологию колоний и отсутствие загрязнений проверяли окрашиванием по Граму.

Штаммы E. coli

Штамм *Escherichia coli* DH5a, использованный в этой работе, обычно инкубировали в аэробных условиях при 37°C на агаровой среде Лурия-Бертани (LB) или бульоне (Sambrook J. and Russell W. D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) и при необходимости добавляли антибиотики (100 мкг/мл ампициллина и/или 15 мкг/мл хлорамфеникола) и 40 мкл 2% X-β-Gal, 7 мкл 20% изопропил-β-D-тиокактозида (IPTG), которые наносили на поверхности заранее приготовленных 90-мм агаровых чашек.

Штамм *E. coli* DH5a (Invitrogen, Paisley, UK) (генотип: F⁻ φ80*lacZ*ΔM Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁻) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*λ⁻) является штаммом, положительным по α-галактозидазе, и его использовали в экспериментах по экспрессии и для других генетических манипуляций.

Экстракция геномной ДНК из *Bifidobacterium bifidum*

Геномную ДНК выделяли из штамма *Bifidobacterium bifidum* (NCIMB 41171) с использованием следующего способа, в котором хромосомную ДНК готовили из клеточного осадка, собранного из 100 мл анаэробного бульона WC. Клетки ресуспендировали в 10 мл TES-буфера (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 8) и обработали 200 мкл смеси лизоцима с мутанолизином (4:1, лизоцима 10 мг/мл, мутанолизин 1 мг/мл) в течение 30 минут при 37°C. Затем клетки обработали 200 мкл протеиназы K (при 20 мг/мл) и 200 мкл РНКазы (обе 10 мг/мл), перемешали и инкубировали 1 час при 65°C. Окончательно клетки обработали 2 мл 10% ДДС и инкубировали 15 мин при 65°C. Добавили 12 мл фенола с хлороформом и экстракцию повторяли до тех пор, пока водная фаза не стала легко отделяться от промежуточной фазы. Геномную ДНК осадили изопропанолом и ресуспендировали в 10 mM Tris-HCl - 1 mM EDTA (pH 8). Затем геномную ДНК переварили с ферментами рестрикции, провели лигирование в pSP72, переваренную теми же ферментами, и обработали

щелочной фосфатазой. Переваривание геномной ДНК *B. bifidum* проводили, используя EcoRI, PstI, BamHI, SmaI и KpnI. Лигирующие смеси использовали для трансформирования *E. coli* DH5a; клоны, положительные по β-галактозидазе, идентифицировали как синие колонии на пластинах, содержащих X-Gal.

Приготовление векторной ДНК

В этой работе в качестве вектора для клонирования и экспрессии использовали pSP72 (Promega, UK) (Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1987). *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods in Enzymology*. 155: 397-415).

Этот вектор выбрали вследствие отсутствия комплементарной активности α-фрагмента β-галактозидазы, который не кодирован в pSP72. Этот вектор не несет короткий сегмент ДНК *E. coli*, содержащий регуляторную последовательность и кодирующий информацию для первых 146 аминокислот β-галактозидазы, который, в комбинации со штаммами *E. coli* (т.е. DH5a), экспрессирующими С-концевую часть этой β-галактозидазы, дает активную β-галактозидазу (α-комплементация).

Вектор переваривали следующими рестрикционными ферментами: PstI, BamHI, HindIII, SmaI, KpnI and EcoRI в соответствии с инструкциями изготовителя, с использованием десятикратного избытка фермента по отношению к ДНК (единицы фермента: микрограмм ДНК равен 10 единицам фермента на один мкг плазмидной ДНК или 10 единицам фермента на 0,5 пмоль плазмидной ДНК). После термоинактивации ферментов (20 мин при 65°C) рестрикционную картину анализировали с помощью электрофореза в горизонтальном геле. Присутствие единственного фрагмента в геле означало полное переваривание вектора и его единственный сайт рестрикционного переваривания.

Достаточность переваривания вектора проверяли также трансформацией нелигированных молекул в компетентные клетки *E. coli* DH5a. Количество образованных колоний на пластинах LB-агара с добавленным ампицилином (100 мкг/мл) служило показателем непереваренных молекул и ожидаемого фона при последующих экспериментах.

Векторы дополнительно дефосфорилировали телячьей кишечной щелочной фосфатазой CIAP (Promega, Southampton, UK) в соответствии с инструкциями производителя. Эффективность этой обработки проверяли по самолигированию (с ДНК-лигазой бактериофага T4 в соответствии с инструкцией производителя) после трансформации в клетки DH5a. Количество образованных колоний показывало количество молекул, повторно замкнутых в кольца (неклонированный вектор), а вычитание из него числа образованных колоний без обработки вектора CIAP давало количество недефосфорилированного вектора.

Построение библиотеки геномной ДНК

Геномную ДНК частично переварили шестью ферментами рестрикции, которые узнают часто встречающиеся гексануклеотидные последовательности в прокариотической ДНК. EcoRI, BamHI, PstI, KpnI, SmaI и HindIII являются рестрикционными эндонуклеазами типа II, специфично узнающими последовательности 5'G/AATTC3', 5'G/GATCC3', 5'CTGCA/G3', 5'GGTAC/C3', 5'CCC/GGG3' и 5'A/AGCTT3' соответственно и делают двухнитевые разрывы в этих последовательностях, образуя 5'-оверхенги из четырех нуклеотидов, AATT, GATC, AGCT для EcoRI, BamHI и HindIII соответственно, и 3'-оверхенги, ACGT, GTAC для PstI и KpnI соответственно и тупые концы для SmaI.

Все эти ферменты были активными и способными расщеплять ДНК только в присутствии ионов магния. Эти ионы были единственным необходимым кофактором.

Рестрикционное переваривание ДНК

Переваривание образцов ДНК всеми рестриктазами проводили при инкубации в течение 2 часов при 37°C с конечной термоинактивацией при 65°C в течение 20 минут. Реакционные смеси затем охладили до комнатной температуры и добавили соответствующее количество рабочего буфера с последующим осторожным перемешиванием запаянным стеклянным капилляром. Затем растворы загрузили в лунки 0,8% агарозного геля (при напряжении 4-5 вольт/см в течение 14-16 часов) и размер переваренной ДНК оценивали с помощью 1-тпо стандартов ДНК (Promega, UK) (Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002)).

Очистка фрагментов, образованных после переваривания рестриктазами

Из реакционных смесей и агарозных гелей фрагменты очищали с помощью набора для экстракции из гелей QIAEX от Qiagen (West Sussex, UK). Протоколы подробно описаны в инструкции производителя.

Лигирование ДНК и трансформация

После очистки фрагментов ДНК с помощью набора для экстракции из гелей Qiaex их лигировали с вектором pSP72, обработанным CIAP. Для лигирования соответствующие количества ДНК переносили в стерильные микроцентрифужные пробирки, как показано в Таблице 1.

Таблица 1	
Пробирка	ДНК
А	Вектор (15 фмоль [~29,7 нг])
В	Вектор (15 фмоль [~29,7 нг]) плюс вставка (посторонние 15 фмоль ~69,3 нг)
С	pUC контроль (0,056 фмоль [~100 пг])
Молярное отношение плазмидного ДНК-вектора к вставляемому фрагменту ДНК в реакции лигирования должно быть ~1:1. Конечная концентрация ДНК должна быть ~10 нг/мкл.	

Таблица 1. Смеси лигирования. Пробирка А показывает количество самолигированной векторной ДНК, которую следует вычесть из общего количества трансформантов после трансформации. Пробирка В показывает лигирование вектора с фрагментами ДНК, а пробирка С показывает контроль для расчета эффективности трансформации.

Перед каждым лигированием фрагменты ДНК нагревали при 45°C в течение 5 минут для расплавления любых липких концов, которые подверглись повторному отжигу при приготовлении фрагмента. Молярное отношение вектор:вставка ДНК было выбрано на уровне 1:1 для всех реакций лигирования, которые проводили по инструкциям Promega.

В пробирки А и В добавили по 1,0 мкл 10-кратного буфера лигирования и 0,5 единиц Вейсса ДНК-лигазы T4 (Promega, UK) и объем довели до 10 мкл водой молекулярно-биологической категории чистоты. В пробирку С добавили 1,0 мкл 10-кратного буфера лигирования и объем лигирования довели до 10 мкл водой молекулярно-биологической категории чистоты.

В пробирки добавили фрагменты ДНК с водой и нагрели до 45°C в течение 5 минут для расплавления всех липких концов, которые подверглись повторному отжигу при приготовлении. Перед добавлением остальных реагентов лигирования ДНК охладили до 0°C и реакционные смеси инкубировали в течение ночи при 16°C (Sambrook and Russell, 2001).

После осаждения этанолом и очистки лигированных фрагментов (для удаления лигирующей смеси, которая снижает эффективность трансформации) проводили трансформацию по инструкциям Hanahan. ~50 нг лигированной ДНК в 5 мкл раствора

добавили к 100 мкл компетентных клеток *E. coli* DH5a. После термообработки и экспрессии гена резистентности к ампициллину клетки распределили по поверхности чашек среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), X-β-Gal (40 мкл 2% X-β-Gal) и IPTG (7 мкл 20% IPTG).

5 Определяли количество трансформантов из каждой реакции лигирования. Обычно количество трансформантов, получаемых из пробирки С, составляло 2×10^5 - 1×10^6 КОЕ/мкг, тогда как из пробирки А получали 500-600 КОЕ/мкг. Количество трансформантов в пробирке А было показателем эффективности векторной ДНК.

10 Количество трансформантов в пробирке В было в диапазоне $2-4 \times 10^6$ КОЕ/мкг.

Количество трансформантов

Лигирующие смеси с хромосомной ДНК, переваренной PstI, дали 13 клонов, положительных на β-галактозидазу из ~2500 проскринированных трансформантов, тогда как после переваривания BamHI получено 7 положительных клонов (~1500 проскринированных трансформантов), обработка EcoRI дала 3 положительных клона (~1300 проскринированных трансформантов), KpnI - 7 положительных клонов (~2000 проскринированных трансформантов), SmaI - 3 положительных клона (~1600 проскринированных трансформантов) и HindIII - 2 положительных клона (~1200 проскринированных трансформантов).

Переваривание положительных клонов

Для идентификации различных генов β-галактозидазы плазмиды, выделенных из положительных клонов, подвергли перевариванию в соответствии со следующей таблицей 2.

25

Таблица 2		
	Образцы	Ферменты
1-е переваривание	pB1, pB2, pB3, pB4, pB5, pB6, pB7	BamHI
2-е переваривание	pP1, pP2, pP3, pP4, pP5, pP6, pP7, pP8, pP9, pP10, pP11	PstI
3-е переваривание	pP12, pP13, pP14	PstI
4-е переваривание	pE1, pE2, pE3	EcoRI
5-е переваривание	pP1, pP12, pB1, pP2, pE1, pE2, pE3.....	PstI и EcoRI
6-е переваривание	pS1, pS2, pS3	SmaI
7-е переваривание	pP1, pP12, pB1, pP2, pS1, pS2, pS3	PstI и SmaI
8-е переваривание	pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	KpnI
9-е переваривание	pP1, pP12, pB1, pP2, pK1, pK2, pK3, pK4, pK5, pK6, pK7	PstI и KpnI
Первая буква (р) обозначает плазмиду и вставочный ген, а вторая буква (P, B, E, S, K) обозначает фермент рестрикции, который использовали для выделения соответствующего клона из геномной ДНК.		

30

35

Гель-электрофоретический анализ фрагментов, образованных после переваривания, показал, что каждая плаزمида pB1, pP1, pP2 и pP11 имеет вставку, которая кодирует иную β-галактозидазу. Для дальнейшего анализа использовали клоны, содержащие pB1.

Секвенирование ДНК

45 ДНК секвенировали, применяя дидезоксинуклеотидную терминацию по Сэнгеру, используя набор для циклического секвенирования BigDye Terminator v.3.0 (Applied Biosystems, USA), и анализировали с помощью флуоресцентной системы анализа ДНК ABI Prism 3100, включающей капиллярный электрофорез.

5'- и 3'-концы вставленных фрагментов ДНК секвенировали с праймерами, специфичными для векторов. Для дальнейшего секвенирования вставок использовали Genome Priming System (GPS-I) (New England Biolabs, UK). GPS-I является системой, действующей in vitro, основанной на транспозоне TN7 и использующей транспозазу TnsABC для того, чтобы случайным образом вставлять транспозон в

50

ДНК-мишень. В соответствии с инструкцией производителя использовали отношение масс донор:ДНК-мишень, равное 1:4. Количество плазмид, выделенных для секвенирования после вставок транспраймера в плазмиду-мишень, составляло 25. Это количество было рассчитано в соответствии с инструкциями производителя и предполагало 5-кратную глубину покрытия.

Для плазмиды pV1 вставка транспозона, приблизительно равного 1699 тпо, в позиции у 973-й пары оснований ниже множественно клонированного сайта использованного вектора полностью элиминировала активность β-галактозидазы, тем самым демонстрируя, что стартовый кодон находился между вектором MCS (multiple cloning site) и сайтом транспозона, тогда как внедрение вставки в позиции 841 ниже MCS вело к образованию активной β-галактозидазы, тем самым указывая, что стартовый кодон существует между парами оснований в позициях 841 и 973 ниже MCS. Ферментативная активность полностью устранялась внедрением вставки в позиции 3586 пар оснований ниже MCS, тем самым указывая, что терминирующий кодон находится ниже этой позиции. Более того, вставки в позициях 1239 по, 1549 по, 1683 по, 1832 по, 2108 по, 2189 по, 2270 по, 2340 по, 2414 по, 2574 по, 2648 по, 2734 по, 2807 по и 3410 по полностью устраняли ферментативную активность.

Реакционная смесь секвенирования содержала приблизительно 400-600 нг плазмидной ДНК, 3,2 пмоль раствора праймера и 4 мкл раствора BigDye Terminator.

Идентификация открытой рамки считывания

Открытая рамка считывания (ОРС) была обнаружена с использованием ОРС-искателя от NCBI. Длина рамки, определенная с использованием бактериального генетического кода, составила 100 пар оснований. Нуклеотидная последовательность была транслирована в шесть возможных рамок, что позволило идентифицировать открытую рамку считывания 1052 аминокислот, кодирующую предполагаемую β-галактозидазу (эта трансляция показана на Фигуре 2).

Пример 2

Синтез с помощью клонированного фермента β-галактозидазы, выделенной из *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 в *E. coli* в качестве хозяина (штамм RH5a)

Синтез, описанный ниже, проводили, если не указано иначе, с целыми клетками *E. coli* DH5a в качестве хозяина после обработки биомассы *E. coli* (собранной центрифугированием при 10000 g) толуолом в концентрации 2000 чнм, для увеличения проницаемости клетки, чтобы сделать ее нежизнеспособной, разрушив ее цитоплазматическую мембрану. Биомассу *E. coli* готовили, как описано в п. «Штаммы *E. coli*» Примера 1.

Синтез с помощью клонированного фермента

Синтез с β-галактозидазой проводили при начальной концентрации лактозы, равной 40 мас.%, принятой в качестве концентрации субстрата. Раствор для этого синтеза готовили в 0,1 М фосфатном буфере при рН 6,8 (или 0,1 М цитратном буфере рН 6,2 или калий-фосфатном буфере рН 6,8). Синтез проводили при 40°C на водяной бане при встряхивании при 150 об/мин. Оптимум рН для этого специфического фермента выбрали, основываясь на измерениях активности (с использованием о-нитрофенил-β-D-галактопиранозиды в качестве субстрата) препарата специфического фермента при различных значениях рН.

Для синтеза галактоолигосахарида 5 мл суспензии клеток *E. coli* DH5a (с активностью 2,2 ед./мл) центрифугировали (при 10000 g) для сбора биомассы, отбросив супернатант. Чтобы провести синтез, эту биомассу ресуспендировали с 10 г 40% по массе раствора субстрата.

Концентрации различных сахаров, присутствующих в смеси при синтезе, показаны на фигуре 3. На Фигуре 4 показаны хроматограммы, полученные при высокоэффективной анионообменной хроматографии, сопряженной с пульсирующим амперометрическим детектированием (HPLC-PAD), для смесей галактоолигосахаридов, синтезированных клонированной β -галактозидазой из *B. bifidum* NCIMB 41171. Концентрации сахаров в этой смеси галактоолигосахаридов в оптимальное время синтеза показаны в Таблице 3.

Таблица 3					
Углеводный состав синтеза галактоолигосахаридов при начальной концентрации лактозы, равной 40% по массе, в момент времени, когда наблюдалась максимальная концентрация олигосахаридов.					
Начальная концентрация субстрата при синтезе	GOS DP>3	GOS DP=2	Lac	Glc	Gal
% по массе	Концентрация (% от общих сахаров)				
40	20,45	27,64	12,73	25,90	13,28

Обозначения: Lac - лактоза, Glc - глюкоза, Gal - галактоза, DP - степень полимеризации (degree of polymerisation) степень полимеризации.

Формула изобретения

1. ДНК или ее фрагмент, которая кодирует белок с последовательностью SEQ ID NO: 2.
2. ДНК по п.1, где ДНК имеет последовательность SEQ ID NO: 1.
3. Фермент, обладающий трансгалактозилирующей активностью, кодируемый последовательностью ДНК по п.1 или 2.
4. Фермент, обладающий трансгалактозилирующей активностью, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.
5. β -галактозидаза с последовательностью SEQ ID NO: 2.
6. Рекомбинантный вектор экспрессии, содержащий последовательность ДНК по п.1 или 2.
7. Клетка-хозяин, содержащая последовательность ДНК по п.1 или 2, которая продуцирует фермент по любому из пп.3-5.
8. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.6, которая продуцирует фермент по любому из пп.3-5.
9. Клетка-хозяин по п.7 или 8, где указанная клетка является бактериальной клеткой.
10. Клетка-хозяин по п.9, где клетка-хозяин является *Escherichia coli*.
11. Применение фермента по любому из пп.3-5 для получения смеси олигосахаридов, содержащей β -связанные галактоолигосахариды и α -связанные галактоолигосахариды Gal(α 1-6)Gal.
12. Применение по п.11, где смесь содержит дисахариды Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal и Gal(α 1-6)Gal.
13. Применение по п.11 или 12, где смесь содержит трисахариды Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc и пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.
14. Применение фермента по любому из пп.3-5 или клетки по любому из пп.7-10 для получения смеси олигосахаридов, предназначенной для того, чтобы быть частью продукта, выбранного из группы, состоящей из молочных продуктов, таких как жидкое молоко, высушенный молочный порошок, детские молочные смеси, детские питательные смеси, мороженое, йогурт, сыр, ферментированные молочные продукты,

напитки, такие как фруктовый сок, детское питание, крупяные продукты, хлеб, печенье, кондитерские изделия, торты, пищевые добавки, диетические добавки, пробиотические пищевые продукты, пребиотические пищевые продукты, корма для животных, корма для птицы и медикаменты.

⁵ 15. Применение по п.14, где смесь включает дисахариды Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal и Gal(α 1-6)Gal, трисахариды Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc и пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc.

¹⁰ 16. Способ получения фермента по любому из пп.3-5, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп.7-10 в соответствующей культуральной среде в условиях, допускающих экспрессию указанного фермента, и выделение образующегося фермента из культуры.

¹⁵ 17. Способ получения смеси олигосахаридов, содержащей дисахариды Gal(β 1-3)Glc, Gal(β 1-3)Gal, Gal(β 1-6)Gal и Gal(α 1-6)Gal, трисахариды Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc, тетрасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc и пентасахарид Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-6)Gal(β 1-4)Glc, включающий контактирование фермента по любому из пп.3-5 или клетки-хозяина по любому из пп.7-10 с материалом, содержащим лактозу.

²⁰

²⁵

³⁰

³⁵

⁴⁰

⁴⁵

⁵⁰

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

 <220>
 <221> ГЕН
 <222> (1)..(7281)

 <400> 1
 ggatccgggtg aacgcgcccga gcgcggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat 60
 cgcggggatc atgccccagt aggagatgtc ggcgagcgag tagatcacgt cgagcaggat 120
 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccggtgttc acatccacga ggccgaacag 180
 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg 240
 gcggaaccgg ccccagcggg tgttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gcgggtcgag 300
 aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gagtccggtg atcaccgcga tgaggcgttt 360
 ggcaagcgtc ttgtccacgt cgatgaacag cgcggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt 420
 gctcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtatg cgatcttctg 480
 acccgtgttc cgcgtgggct gcggccttcc ggtcgtttcc gtgtgttggtg tgggtggatcc 540
 gctcatgggtg tggtgccctc cttgcgacct gtaaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg 600
 atcccgcaaa gcgtgagtat agaactttct tgaaaaagta gaaaactata ccgcgtgtcg 660
 caaatcatgc caacgttctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt ttgaagcctg 720
 cttgatgtgc ttgaatctta agaaatccac gtattctgca tgttgaggc cttgtgccgc 780
 gaaatgctgg aaagaatttg cgcaatcaag taacaatatt tacccttgtt gtacaaggaa 840
 cccgattcaa cgaggttccc tactgcggc ggcaacgacg cgacgcaatc cgatgcgaaa 900
 gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcgggaagaa cggcgatccg atcgtctccc 960
 cgtccatacc gacgacggca tggctcgccg acccgcgcgt gtacgcgggt caccggctcg 1020
 acgcccattc cgatcatgcg tgctgggtctc gctccccagt cgacggcgag agcacgaatc 1080
 tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgtt 1140
 tccccgatgg gacgagcgac gggccggact ggatcagcga cgtgtgcct ctgttcgccc 1200
 cgcccggatt cgacgattcg tcgttctcac gcgtgcagggt gccctcgcat ctggagactg 1260

cggggctgct tgccccgag tacgtgaacg tgcagtaccc atgggacgga catgaggacc 1320
 cgaaggcccc ggccatcccc gagcatggcc atgtggcggt ctaccggcgc gagttcgacg 1380
 cggatggcga agtcgcccag gccgtgcgcg aagggcgccc ggtgacgctt accttccagg 1440
 gcgcggccac agccatctac gtgtggctca acggctcgtt cgttggctac gccgaggact 1500
 ccttcacgcc cagcgagttc gacgtgacgg acgcgatcaa ggtggacggc aacgtgctgg 1560
 cggtcgtctg ctacgagtat tcgagcgcga gctggttgga ggatcaggac ttctggcgtc 1620
 tgcacggcct gttccgctcc gtcgaactca acgcgaggcc cgccgccac atcgccgacc 1680
 tccatgccga cgccgactgg gatctcgcca catcaagggg ttcgctctcg ctggatgtgc 1740
 tgatcgacgg tgccgcgaac gccgcgacgg tcgacttcgc actgtgggac aagaacggca 1800
 ccatcgctctg gcacaccgcc acgaaagcgg acggaacgct gcacgccgag gccgagatcg 1860
 atgacgcggc gccatggagc gccgaacgcc cggacctgta cgagctatcc gtcaccctgc 1920
 tcgacgcgga cggcaaggtc ctggagaccg ctcgcactcg catcggcttc cggcatgtgg 1980
 ccatcgagga cggcatcctc aagctcaacg gcaagcgctt cgtgttccgt ggcgtcaacc 2040
 gccacgagtt cgactgccgg cgcggccggg ccatcaccga agaggacatg ctgtgggaca 2100
 tccgcttcat gaagcgccac aacatcaacg cgggtgcgac ctcgcactat ccgaaccagt 2160
 cgcgctggta cgagctgtgc gacgaatacg gcatctacct gatcgacgag accaatctgg 2220
 agaccatgg cagctggaac agccccggcg acatccccgt gggaacctcc gtccccggtg 2280
 acgacgagggc ctggctgggc gcgtgcatcg accggctgga cagcatgatc ctgcgcgacc 2340
 gcaaccatcc cagcgtgctc gtctggctgc tgggcaacga atcctacgcg ggcaaggtcc 2400
 tcaaggccat gagcgcgcac gcgcaccggc ttgatccggg tcgtcccgtc cactacgaag 2460
 gtgtcaactg gaaccatgcc tacgacggga tcagcgactt cgaaagccgt atgtacgcca 2520
 agccggccga gatccaagac tggctcgaac acggcgacga acggggcgag gcgagcaagc 2580
 cgttcgtcag ctgtgagtac atgcatgcc a tgggcaactc gtgcggcggt ctgagcgagt 2640
 tcatcgacct cgaacggtac gagcgtact ccggcgggtt catctgggat tacatcgacc 2700
 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gcgaacgcct cagcgtcggc ggagaatggg 2760
 gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc 2820
 ccagcccaa ggcgcaggag gtcaagcagc tgtattcgcc ggtcaagctc gccccgacg 2880
 ggcacggcgt gaccatcgag aaccgcaacc tgttcgccgg caccgacggc tacgtgttcg 2940
 ccgacggct cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgactaccgt ttcgacgtgg 3000
 ccgacggaga taccacac catgacatcg ccttcccga catcgacgcg gacggggata 3060
 cgcgcgaagt cacctacgag gtcgatctcc tgctcgccga agccaccgca tgggcgcccgg 3120
 ccggctacga gctcgcgttc ggccaactca ccggcacgct caaccccgaa caggacatca 3180
 ccgagaccag ccatgacgac gacggccgcg caactcgcac gctcagccga tggaaacggc 3240
 gcatccggcg cgacgacgag gaaattctcc tgtcacgcac tcagggaggc atcgtctcct 3300

ggaagcgcga cgaccgggaa atggatcatcc gtcgccccga actcgtcacg ttccgcccac 3360
 tgaccgacaa cgatcgcggt aaccattccg gtttcgaccg tgccgcatgg ttcgcgcccg 3420
 gccgatacgc catcgtaacg gaaacgaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcgg 3480
 aataccagta cgaacttgcc gatccgaacc acacgcccgt gtccgtcact taccatgtca 3540
 actccgatat gcgtatgcaa ctgaccgtcg aataccccgg gaacgccact gacatggcca 3600
 gtctgcccgc gttcggatc gaatgggagc tgcccggcga atacgatcgt ctgctgact 3660
 acggccccgg ccccgaggag acctaccgcg accgtaagca gggcggcaag ctcggcatct 3720
 gggacgccac cgcaaggcg agcatggcgc cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc 3780
 acgaggacgt ccgctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc 3840
 aacgcggcga ccgtcacttc acggccagcc tgctgcccgt gaacacctac acgatcgagg 3900
 ccgctgcccg ccacgaggac ctgcccacaac cgcgccacaa ctacctgctc ctgctgcccg 3960
 cccagatggg cgtcgggtga gacgactcct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc 4020
 tgcccgcggg caggccgctc acctcgcagc tgaacctcga actcatctga ccggcaacgg 4080
 gggcgccat gcaccaccat gccgcccggg gccccgccta cgacgcggcg atcgaggcca 4140
 cggcgctgc ggccgcggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgcc ggccacgcgg 4200
 tccacggcac caccgcccag gtcctctcgc tcatcacca cccgatggac gtgatctgcc 4260
 gcaacatccg caccgtgctc gagaagatgg caaccgcccg cgacatcctc ggctgccacc 4320
 tcgaaggccc gttcctcggc ctcaagtga agggcgcgca cgattcgaac tgccctcaaag 4380
 acccgatgcc cgaactcatg gaccgcatgc tcgacgcctc gggcggccgac ctcgcccgg 4440
 gcaagctcgg gtgcatccgc cagatcacca tctcgacccc accgactgga ccgcccaca 4500
 cgtctggtgc gccggccggc aggtggagta aactccttc agcaaaatcg acgcccgtgc 4560
 cgcccgtctc gagacgacgt cttacgcctg aggaacgaag cttgcgcgcg gcaccagttc 4620
 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccgg ccgctcatgc ttcaaccat cgatcagggt 4680
 ggagaacgcc atgcccggca actccccttg atcgatcga tacgaaactca gcgcgccgca 4740
 cgtgtaccgg gcgatcgact ggttgtcac actcaccacg gccaaactcg cgggaacctc 4800
 cacgcgcagt gcgttcaacg cctgcaacgc ccccaccgca agcacgctcg cggccacgat 4860
 caaacatcg ggcgatgctc cggcctcagc atggctcagc accaactgct ccgcgagacg 4920
 atagccggtc tccacgggtga acgtgcccga cgaatacacc aatccgtccg tttccaatcc 4980
 cagatgcgcg gccactgac ggaacgacag ctcgcgaatg tcctcgggat agtcatgcat 5040
 gccatgatg ctgcccacgc cgccgagaaa cgcgatatga ctgcccggc cgcgatcat 5100
 cgcgtccaag gcgtccagca tcgtctgca cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg 5160
 cggcgccgga ttcgtgtcga tgcacacgcc atgcccggag accatattga gggctcgcag 5220
 gtccgcttcg ggaaacaccg tggctcccac ggtgatgaac ccatcaaac cgttgcgcg 5280
 ttccgtcaac tcgtgtatgg acaacgtgag ctggtccaat tccaacgact ccgcacgctc 5340

cgcaagaacc	ttccgcagat	cggcgaagta	cgcgctctgc	aattcctccc	cggacggagg	5400
cgcatccaac	accgcgatcg	cgggacggaa	cacgttgcca	taccccatct	cctcgcacac	5460
gcgcaacaca	cgccgacgcg	tctcctcctt	gatggagaac	gacgggtcgt	tcaacaagcg	5520
tgacaccgtg	ctctgcgaca	ccccggcccc	tcccgcgact	tccttgagcg	tgccatgac	5580
atcctccccg	caaaacttag	taaagggttt	tactacagca	taaccggga	aggcggggtt	5640
agcggcattg	gcggcgtgga	agtttaccca	tgactggtag	actgcacatg	tcccggcaat	5700
aggggcaatg	catagggggg	tgccgggcat	gtgcagcaac	attcccgtca	ccttacgatt	5760
cttatagcgt	gtcaggtaaa	agaattatga	ttctcaatcc	accttccggc	cgcgccgca	5820
gactcaaatg	gcatgatgc	atagcgacaa	tctctcgcac	tatggataaa	cccaatccgt	5880
gatgaggtga	tgagatccc	acatgcgat	ttatcctatt	atcctcccct	ctgttaaaag	5940
gtgacaggaa	atcatctatc	ctcgtatcgg	aaagatccat	gccggtattg	gatatgtcta	6000
tcgcaatgca	ggactcgcct	tcgtattgcc	tgctggtggc	taagtttatc	catacatgtg	6060
gttgagccgc	acgattatgc	tgaatggcat	tcgtaataag	gtttgcaatc	atctgtctaa	6120
ttagcagacc	atcggctagg	atatatgcat	tctccagatt	ggatgtact	tgaactctat	6180
ctccgataag	ttccatattt	tcctgaagaa	cattgcgaat	gatctcagct	acattaactc	6240
ggctaagatc	agctcggttt	aattgctgaa	ctttcgacaa	ttcgagcaga	tgattgacga	6300
tttcaacccc	agcatgattt	gaagccaaag	ccttttcgac	gaaaggctctg	caacgctcat	6360
cgaaaagctg	gttgtgcagc	ggaatctcca	atgcggccga	agtggccgca	agtggatttt	6420
ttaactcatg	tgacgcatcg	gcgataaatt	ccttttcccg	actgattgcg	ctgttgagat	6480
cctttaacat	gaggttgtat	gcggatgcaa	tagtgtacgc	ctcgtcgttt	tcatatggaa	6540
taacgatagg	ttgcctttcc	aatccagcgt	cggacgcgat	aatctgagag	gccacactat	6600
tgattcttcg	ttgtgtccta	gtggcgataa	tccaagttat	tcctccagat	aatatgccga	6660
aaacaatgat	gggggctatg	cttaccgcca	atatcagatc	ccgggatttt	atgtctcctt	6720
gttccatagt	tagcgttaaa	gcacccctac	cggagtcata	cccggcagaa	acgtaatcct	6780
taccggagtc	aggaggaatg	gcttgcgaat	tcaaaactatg	ttgttcatcg	gcatcttctg	6840
cctgagtaaa	agatttattt	acggtcactg	tttccagttg	ccggttcacg	acataatatg	6900
tcatggcggg	caccactccg	gtaagcatga	agaacacgat	gacgatcgtg	gtgaccaatc	6960
ttcttcttgt	agaccactga	aacggtaaac	gcagtttcgg	atggctggaa	tggtcccat	7020
tcgacgaagg	atattcaggc	ttttcatga	tatgcgatat	ccttgtccgg	gaacggtttc	7080
aatgaaatca	gtgattccga	ttttcgtgcg	aatcgcgatag	attgtggtct	tgacgattcc	7140
tctcgtatga	gcgtgatcat	cctgcaaat	ctcagatata	agacattccg	actaatcac	7200
cgcacctcgc	gcctcaatca	gcgtcctcaa	tacggcaagt	tctcgtttcc	caaaacttag	7260
ttctgcaccg	cgaaccgtga	t				7281

<210> 2

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

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

<400> 2

Met Asn Thr Thr Asp Asp Gln Arg Lys Asn Gly Asp Pro Ile Val Ser
 1 5 10 15

Pro Ser Ile Pro Thr Thr Ala Trp Leu Ala Asp Pro Arg Val Tyr Ala
 20 25 30

Val His Arg Leu Asp Ala His Ser Asp His Ala Cys Trp Ser Arg Ser
 35 40 45

Pro Val Asp Gly Glu Ser Thr Asn Leu Arg Gln Ser Leu Asp Gly Glu
 50 55 60

Trp Arg Val Arg Val Glu Thr Ala Pro Thr Gly Arg Phe Pro Asp Gly
 65 70 75 80

Thr Ser Asp Gly Pro Asp Trp Ile Ser Asp Val Ser Pro Leu Phe Ala
 85 90 95

Ala Pro Gly Phe Asp Asp Ser Ser Phe Ser Arg Val Gln Val Pro Ser
 100 105 110

His Leu Glu Thr Ala Gly Leu Leu Ala Pro Gln Tyr Val Asn Val Gln
 115 120 125

Tyr Pro Trp Asp Gly His Glu Asp Pro Lys Ala Pro Ala Ile Pro Glu
 130 135 140

His Gly His Val Ala Val Tyr Arg Arg Glu Phe Asp Ala Asp Gly Glu
 145 150 155 160

Val Ala Gln Ala Val Arg Glu Gly Arg Pro Val Thr Leu Thr Phe Gln
 165 170 175

Gly Ala Ala Thr Ala Ile Tyr Val Trp Leu Asn Gly Ser Phe Val Gly
 180 185 190

Tyr Ala Glu Asp Ser Phe Thr Pro Ser Glu Phe Asp Val Thr Asp Ala
 195 200 205

Ile Lys Val Asp Gly Asn Val Leu Ala Val Val Cys Tyr Glu Tyr Ser
 210 215 220

ser Ala Ser Trp Leu Glu Asp Gln Asp Phe Trp Arg Leu His Gly Leu

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

770	775	780
Ile 785	Leu	Leu Ser Arg Thr Gln Gly Gly Ile Val Ser Trp Lys Arg Asp 790 795 800
Asp Arg Glu Met Val 805	Ile Arg Arg Pro Glu Leu Val Thr Phe Arg Pro 810 815	
Leu Thr Asp Asn Asp Arg Gly Asn His Ser Gly Phe Asp Arg Ala Ala 820 825 830		
Trp Phe Ala Ala Gly Arg Tyr Ala Ile Val Thr Glu Thr Lys Ile His 835 840 845		
Glu Ser Asp Asp Gly Leu Val Ala Glu Tyr Gln Tyr Glu Leu Ala Asp 850 855 860		
Pro Asn His Thr Pro Val Ser Val Thr Tyr His Val Asn Ser Asp Met 865 870 875 880		
Arg Met Gln Leu Thr Val Glu Tyr Pro Gly Asn Ala Thr Asp Met Ala 885 890 895		
Ser Leu Pro Ala Phe Gly Ile Glu Trp Glu Leu Pro Gly Glu Tyr Asp 900 905 910		
Arg Leu Arg Tyr Tyr Gly Pro Gly Pro Glu Glu Thr Tyr Arg Asp Arg 915 920 925		
Lys Gln Gly Gly Lys Leu Gly Ile Trp Asp Ala Thr Ala Lys Ala Ser 930 935 940		
Met Ala Pro Tyr Leu Met Val Gln Glu Thr Gly Ser His Asx Asp Val 945 950 955 960		
Arg Trp Leu Glu Ala Thr Asp Ile Gln Gly His Gly Leu Arg Val Thr 965 970 975		
Gln Arg Gly Asp Arg His Phe Thr Ala Ser Leu Leu Pro Trp Asn Thr 980 985 990		
Tyr Thr Ile Glu Ala Ala Arg Arg His Glu Asp Leu Pro Lys Pro Arg 995 1000 1005		
His Asn Tyr Leu Arg Leu Leu Ala Ala Gln Met Gly Val Gly Gly 1010 1015 1020		
Asp Asp Ser Trp Gly Ala Pro Val His Thr Ala Tyr Gln Leu Pro 1025 1030 1035		
Ala Gly Arg Pro Leu Thr Leu Asp Val Asn Leu Glu Leu Ile 1040 1045 1050		

1 ggatccggtg aacgcgccga gccgggtgta cgtgctgcgc tcgtgcgagt cggaggagat
 61 cgcgggggac atgccccagt agggagatgtc gccagcgcag tagatcacgt cgagcaggat
 121 gaacacgatg acgaacagga ccatgaacac gccgggtgtc acatccacga ggccgaacga
 181 gccggtgaac accatgatca gcaggatgcc aggcacgatg ccgccaatga actgccacgg
 241 goggaaccgg ccccagcggg tcttcgtgtt gtccacgagg ttgccgagca gccggctgag
 301 aaagatctcc gcgatgcgga tgaccaccac gagtccgggtg atcaccgcga tgaggcgttt
 361 ggcaagcgtc tigtccacgt ccatgaacag cgcgggtggtc acgaacgtga tgaagaacgt
 421 gctcattgtg ttgtagaacg cggcctggcc caggttaccg aatgcgtag ccatctctg
 481 acccgtgttc cgcgtgggct gggcccttc ggctgttcc gtgtgtgtg ttgtggatcc
 541 gctcattgtg ttgtggcctc oitgogacct gtaagaatc cgtgcgcgtg aaccgctccg
 601 atcccgaaa gcgtgagat agaaccttct tgaanaagta gaaaactata ccgctgtcg
 661 caaatcatgc caacgtctg caaccggcac tccgtgtgga tgagtaaggt tgaagcctg
 721 ctgatgtgc tgaatctta agaatccac gtattctgca tgttcaggc ctgtgccg
 781 gaaatcgtg aaagaattg cgaatcaag taacaatatt taccctgtt gtacaaggaa
 841 cccgattcaa cgaggttccc tcaactgggc ggcaacgacg cgacgcaatc cगतcgcgaa
 901 gcgaggacat catgaacaca accgacgatc agcggagaagaa cggcgatccg atcgtctccc
 961 cgtccatacc gacgacggca tggctcggcg acccgcgcgt gtacgcgggt caccgctcg
 1021 acgcccattc cगतcatgcg tctgtgtctc gctcccagt cgacggcgag agcacgaatc
 1081 tcaggcagag ccttgacggc gaatggcggg tccgcgtcga gacggcgccg acgggcccgt
 1141 tccccgatgg gacgagcgcac gggccggact gगतcgcga cgtgtccct ctgttcggc
 1201 cggccggtt cgacgatcg tcttctac gcgtgcaggt gccctcगत ctggagactg
 1261 cggggctgct tccccgcag tacgtgaacg tgcagtacc atgggacgga catgaggacc
 1321 cgaaggcccc ggccatcccc gगतggtcc atgtggcgt ctaccggcg gagtgcagc
 1381 cggatggcga agtcgccag gccgtgcgcg aaggggcccc ggtgacgtt acctccagc
 1441 gcgggccac agccatctac gtgtggtca accgctcgt cgttggtac gcgaggact
 1501 ccttcacgc cagcgagttc gacgtgacgg acgcgatcaa ggtggacggc aactgtcgtg
 1561 cggctgtctg ctacgagtat tcgagcgcga gcgtgtgga gगतcaggac ttctggcgtc
 1621 tgcacggcct gtccgctcc gtgaactca accgagggc cgcgccccac atcgcgcacc
 1681 tccatgccga cgcgactgg gगतtgcga catcaagggg ttgotctcg ctggatgtc
 1741 tgatgcagcg tccgcgaac gccgcgacgg tcgacttgc actgtgggac aagaacggca
 1801 ccatcgtctg gcacaccgcc acgaagcgg acggaacgt gcacgccgag gccgagatc
 1861 atgacgggc gccatggagc gccgaacgcc ccgacctgta cgagctatcc gtcacctgc
 1921 tcgacgcgga cggcaaggtc ctggagacc ctcgactcg catcgcttc cggcatgtg
 1981 ccatcgagga cggcatctc agctcaacg gcaagcgcct cgtgtccgt ggcgtcaacc
 2041 gccacgagt cगतcgcgg cgcggccgg ccatcaccga agaggacatg ctgtgggaca
 2101 tccgttcat gaagcgcac aacatcaac cgggtgcgac ctcgactat ccgaaccagt
 2161 cgcgtggtc cgagctgtc gacgaatag gcatctacct gatgcgag accaatctg
 2221 agacctatg cagtggaa agccccggc acatccccgt gggaacctc gtccccgtg
 2281 acgacgagc ctggctggc gcgtgatcg accggctgga cगतgatc ctgcgcgac
 2341 gcaaccatc cagcgtctc gtctgtcgc tgggcaacga atctacgcg ggcaagtc
 2401 tcaaggccat gacgcgcac gcgcaccggc ttgatccggc tctccctc cactacgag
 2461 gtgtcaact gaaccatgc tacgacggga tcagcactt cgaagcct atgtaccca
 2521 agccggcca gatccaagac tggctgaac accgacga accggggcgag gcgagcaag
 2581 cgttcgtcag ctgtgagac atgatcca tgggcaactc gtccggcgt ctgagcagt

ФИГ. 1

2641 tcacgacct cgaacggtag gaggogctact ccggcgggtt catctgggat tacatcgacc
 2701 aggggctcgt ccagcgtctg cccgacggga gegaacgctt cagcgtcggc ggagaatggg
 2761 gcgaccgtcc aaccgactac gaattcgtgg gcaacggcat cgtgttcgcc gaccgcacgc
 2821 ccagcccaaa ggcgcaggag gtaagcagc tgatcggcc ggtaagtc gccccgacg
 2881 ggcacggcgt gaccatcgag aacggcaacc tgttcgccgg caccgacggc tacgtgttcg
 2941 ccgacggget cctcgaagac gggcatgaga tctggcatgc cgaactaccgt ttcgacgtgg
 3001 ccgacggaga tacccaacac catgacatcg ccttcccggg catcgacgcg gacgggggata
 3061 cggcgaagt cacctacgag gtcgatctcc tgcctgccga agccaccgca tgggcgcggg
 3121 ccggctacga gctcgcgttc gggcaactca ccggcacgct caaccocgaa caggacatca
 3181 ccgagaccag ccatgacgac gacggccgcg caactcgcac gctcagccga tggaaacggc
 3241 gcatccgcgg cgaacgacgag gaattctcc tgcacgcac tcagggaggc atcgtctct
 3301 ggaagcgcga cgaaccggaa atggtcatcc gtcgcccgga actcgtcagc ttcgcccac
 3361 tgaccgacaa cgatcgcggg aaccattccg gtttcgacc tgcgcattgg ttcgcccgcg
 3421 gccgatacgc catcgtaac gaaacgaaa tccatgaaag cgatgacggt ctcgtagcgg
 3481 aataccagta cgaacttgc gatocgaacc acacgcccgt gtcgctact taccatgca
 3541 actccgatat gcgtatcaa ctgaccgtc aataccocgg gaacgccact gacatggcca
 3601 gtctgccgcg gttcggatc gaattgggagc tgcggcgga atacgatcgt ctgcgctact
 3661 accgccccgg ccccgaggag aactaccgcg accgtaagca gggcggcaag ctggcatct
 3721 gggacgccac cgcgaaggcg agcatggcgc cgtatctcat ggtgcaggaa accggcagcc
 3781 acgaggacgt ccgctggctc gaagccaccg acatccaagg ccacggattg cgcgtcacc
 3841 aacgcccga ccgtacttc accgccagcc tgcctcccg gaacacctac acgatcgagg
 3901 ccgcccgcgg ccacgaggac ctgcccaac cgcgcccaaa ctacctgcg ctgctcggg
 3961 ccagatggg cgtcgggtga gacgactct ggggagcccc cgtccacacg gcctaccagc
 4021 tgcggccgg caggccgctc aacctcagc tgaacctga actcatctga ccggcaacgg
 4081 gcggcggcat gcaccaccat gccggccgcg gccccgccta cgaacggcg atcgaggcca
 4141 cgggcgctgc ggccgcggac ggcaccggcg aggaggcgtt cgagcgcgc gccacgcgg
 4201 tccacggcac caccgcggc gtcctctcgc tcataccaa cccgatggac gtgatctgc
 4261 gcaacatccg caccgtcgc gagaagatgg caaccgcgcc cgaatcctc ggtgcacc
 4321 tcgaaggccc gttcctcgc ctaangtca agggcgcgca cgattcgaac tgcctcaag
 4381 accgatgcc cgaactcatg gaccgcatgc tcgacgcctc gggcggcgac ctgcggccg
 4441 gaaagctcgg gtgcacgc cagatacca tctcagccc accgactgga ccgcccaaca
 4501 cgtctgtgct gccggccgc aggtggagta aactcctcc agcaaatcg acgcccgtgc
 4561 cgcctcctc gagacgacgt ctacgcctg aggaacgaag ctgcgcgcg gcaccagtc
 4621 ggtcgtcagc aggatgtgac gacgcaccg ccgctcatgc tcaacctat cgatcagggt
 4681 ggagaacgcc atgcgggcca actcccttg atcgatcga tacgaactca gccggcgga
 4741 cgtgtaccgg gcgatcact ggtgttcac actcaccag gccaaactgt cgggaacctc
 4801 cacgcgcagt ggttcaacg cctgcaacg cccaccgca agcacgtcgg cggccacgat
 4861 caaacatcg ggcgatctgc cggcctcagc atggtcagcc accaactgct ccgagagacg
 4921 atagccgctc tccacgggta acgtgcggga cgaatacacc aatcgtccg ttccaatcc
 4981 cagatgcgcg gccactgac ggaacgacag ctgcggaatg tctcgggat agtcatgat
 5041 gccatgatg ctgccacgc cggcgagaaa cgcgatatga ctgcggccc cgcgatcat
 5101 ccgctccaag gcgtccagca tegtctcga cagatcggga cacacggagt cgaacaggcg
 5161 cggcggcgga ttcgtctga tgcacagcc atgcgggagc accatagca gggtcgcag
 5221 gtccgcttc ggaacaccg tggctccac ggtgatgaac ccatcaact ccgttcgcg
 5281 ttcgtcaac tegtgtatg aacacgtg ctggtccaat tcaacgact ccgacgctc
 5341 cgcgaagacc tccgcgat cggcgaagta cgcgtcctc aattcctcc cggacggagg
 5401 cgcatacaac accgcgatc cgggacggaa cacgttgcga taccatct cctcgcacac

ФИГ. 1 (продолжение)

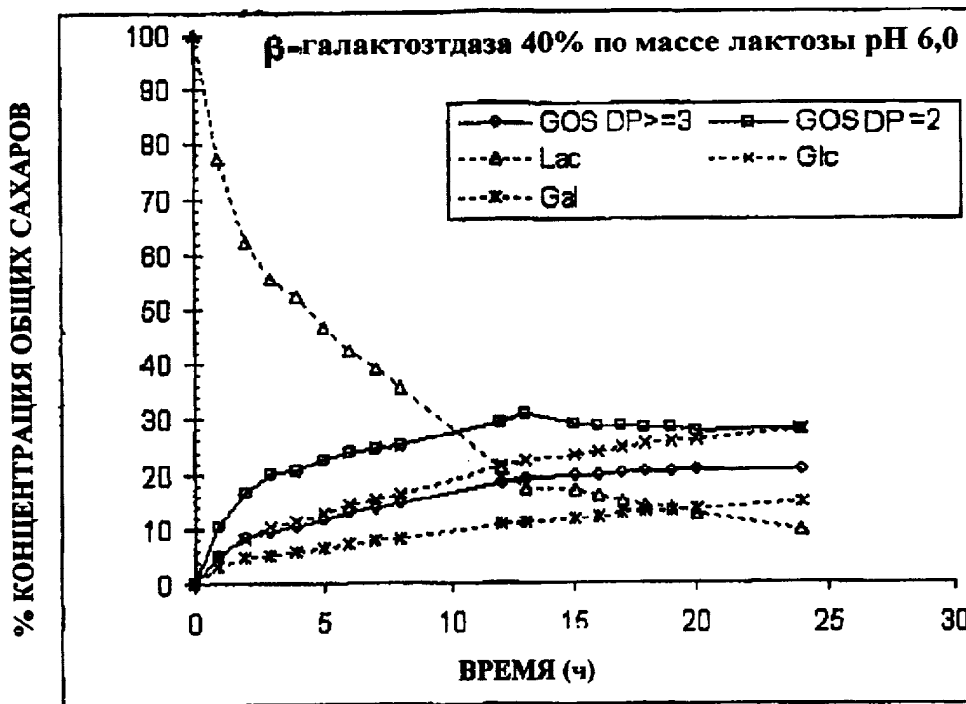
5461 gcgcaacaca cgccgacgcg tctctcctt gatggagaac gacgggtcgt tcaacaagcg
 5521 tgacaccgtg ctctgogaca ccccgcccg tcccggact tcttgagcg tggccatgac
 5581 atcctccccg caaaccttag taagggtt tactacagca taaccggga aggcggggt
 5641 agcggcattg gggcgtgga agttacca tactggtag actgcacatg tccggcaat
 5701 aggggcaatg catagggggg tggcggcat gtgcagcaac attcccgca cctacgatt
 5761 cttatagcgt gtcaggtaaa agaatatga ttcaatcc acctccggc cgcgcctgca
 5821 gactcaaatg gccatgatgc atagcgaca tctctgcac tatggataaa cccaatcgt
 5881 gatgaggta tgcagatccc acatgggtat ttactctatt atcctccct ctgtaaaag
 5941 gtgacaggaa atcatctatc ctctatcgg aaagatccat gccggattg gatatgcta
 6001 tcgcaatgca ggactcgcct tctatggcc tgcgttggc taagttatc catacatgtg
 6061 gttgagccgc acgattatgc tgaatggcat tctgaataag gttgcaatc atctgtetaa
 6121 ttgacagacc atcggtagg atatatgcat tctccagatt ggtatgact tgaactctat
 6181 ctccgataag ttcatattt tctgaagaa cattcgcaat gatctcagct acattaactc
 6241 ggctaagatc agctcgggtt aattgotgaa cttcgacaa ttcgagcaga tgattgacga
 6301 ttcaacccc agcatgattt gaagccaag cctttcgac gaaaggtctg caacgctcat
 6361 cgaaaagctg gttgtcagc ggaatctcca atcgggcca agtggccgca agtggatttt
 6421 ttaactcatg tgacgcacg gogataaatt cctttcccg actgattcg ctgttgagat
 6481 cctttaacat gaggttgat gggatgcaa tagtgcagc ctctcgttt tcatatggaa
 6541 taacgatagg ttgccttcc aatcagcgt cggacgcgat aatctgagag gccacactat
 6601 tgattctcg ttgttctca gtggcgataa tccaagttat tctccagat aatagccga
 6661 aaacaatgat gggggctatg ctaccgcca atatcagatc ccgggatttt atgtctctt
 6721 gttccatagt tagcgtaaa gcatccttac cggagtcata cccggcagaa acgtaatcct
 6781 taccggagtc aggaggaatg gcttgogaat tcaaatatg ttgtcatcg geatctctg
 6841 cctgagtaaa agattattt acggctactg ttccagttg ccggttcag acataatag
 6901 tcatggcggg caccactccg gtaagcatga agaacacgat gacgatcgtg gtgaccaatc
 6961 ttctcttgt agaccactga aacggtaaac gcagttcgg atggctggaa tggtcccat
 7021 tcgacgaagg atattcaggc ttttcaiga tatcgatat cctgtccgg gaacggttc
 7081 aatgaaatca gtgattcga tttcgtcgc aatcgcatag atttggctc tgacgatcc
 7141 tctctatga gcgtgatcat cctgccaat ctcacgatat agacattccg cactaatcac
 7201 cgcacctcgc gctcaatca gcgtctcaa tacggcaagt tctctttcc caaaccttag
 7261 ttctgcaccg cgaaccgtga t

ФИГ. 1(продолжение)

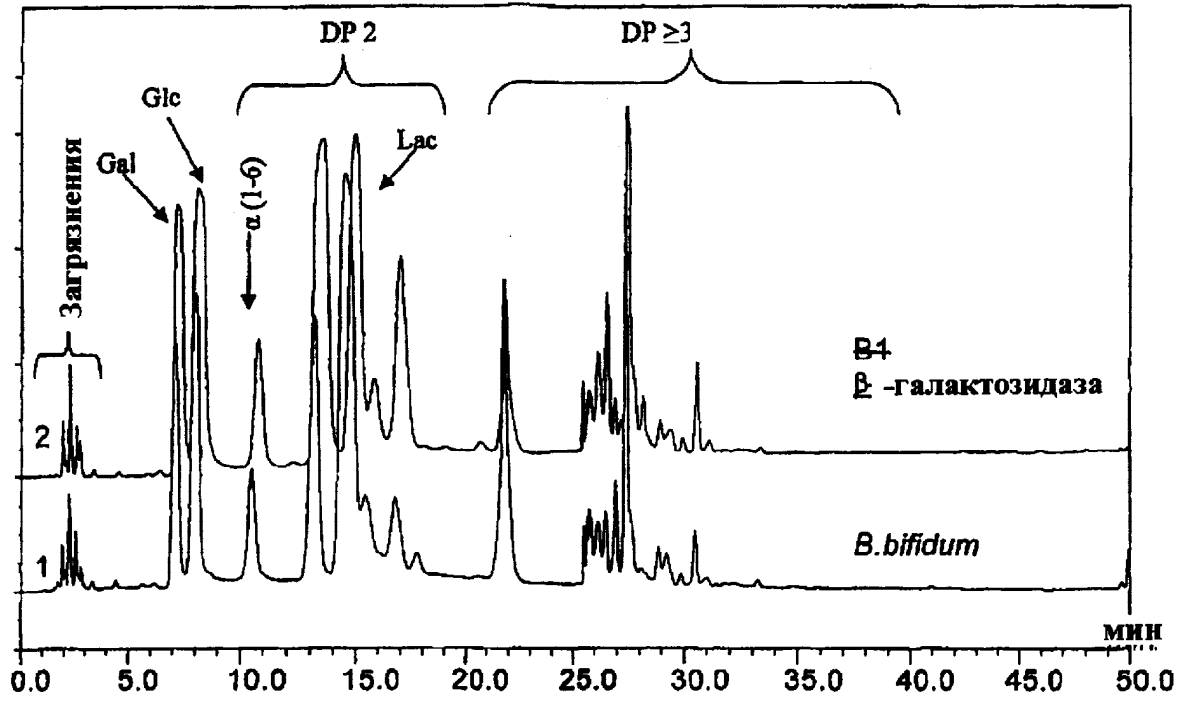
```

1  MNTTDDQRKMGDPVVSFPIPTTAWLADPRVTAVNRLDAHSDRACWSRSFVGDGSETNLRQSLDCEWRVRVETAPTGRFPDGTSDGPDWISEDVSLFAAPGF
101 DDSSFSRVQVPSNLETAGLLAPQYVNVQYFWDGHEDPKAPAIPSHSHVAVYRREFDADGEVAQAVREGRPVTLTFOGAATAIYVNLNGSFVGYAEDSFTF
201 SEFDVTDALIKVDGNVLAVCYEYSASWLEDDPFRLHGLFRSVELNARPAAHIDELHADADNDLATSNGSLSLDVLIDGAANAATVDFALWDKNGTIVN
301 HTATKADGTLNASEAEIDDAAPWBAERFDLYELSVTLDDADGKVLLETARTRIGFRHVAIEDGILKLNKRLVFRGVNRHEFDCRRGRAITEEDMLWDIRFM
401 KRKNIHAVRTSHYPNQSRYELCDEYGIYLIDETNLETHGSMNSFGDIPVGTSEVPGDDEAWLGACIDRLDQHILRDRNHPSVLVNSLGNESYAGEVLKAM
501 SAHANRLDPGRPVHYBGMVWHAYDGISDFESRNYAKPAEIQDNLHNGDERGEASKPFVSCSEYMHAMGNSCGGLSEFIDLERYERYSGGFINDYIQGLV
601 ORLPDGSERLSVGGGENDRPTDYEYVNGIVFADRTSPKAOEVKQLYSPVKLADPGHGVTIENRNLFACTDGYVFAARLLEDGHEIWHADYRFDVAAGD
701 TORNDIAFPDIDADGDTREVTYEVDLLAEATANAPAGYELAPGQLTGTLPQDITETSHDDDGRTLSRHNAGIRRDDESILLERTQGGIVSWKRD
801 DREMVIIRPELVTFRPLTNDRGNHSGFDRAAWFAAGRYAIVTETKIHESDDGLVAEYQYELADPHNTFVSVTYHVNSDMRMLTVEYFGWATDMASLPA
901 FCIEMELPGEYDRLRYGPGPESTYDRKQGGKLGINDATAKASMAPYLMVQETGSKEDVRNLEATDIQHGRLVTRQGDHPTASLLPWNTYTIKAARR
1001 HEDLPKPRHNYLRLLAAGMGVGGDDBWGAPVHTAYQLPAGRPLTLDVNLLELI
    
```

ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4