

Винахід стосується загалом вакцин, що використовуються за ветеринарними призначеннями, більш конкретно, живої рекомбінантної атенуйованої вакцини для хворобливих станів, спричинених організмами, які включають капсулу, причому наявність капсули є потрібною для вірулентності, а не для імунізації. Винахід, зокрема, може бути використаний у виробництві рекомбінантно продукуючої вакцини, яка одержується таким чином, щоб не мала капсули.

Вакцини є препаратами, які використовуються для попередження певних хвороб у тварин та людей шляхом індукції імунітету. Це здійснюється шляхом піддавання пацієнта дії антигену до певної хвороби, який, в свою чергу, спричинює продукування імунною системою пацієнта великої кількості антитіл. Наявність антитіла у крові пацієнта захищає пацієнта від подальшого нападу збудника хвороби. Вакцини можуть складатись із субодиниць збудника, або з самого живого чи вбитого збудника. Наприклад, профілактику поліомієліту, який звичайно називають «поліо» (polio), типово здійснюють шляхом введення перорально живої атенуйованої вакцини поліовірусу, що є звичайною практикою у лікуванні дітей, або шляхом введення вбитої чи інактивованої вакцини поліовірусу, що є звичайною практикою у лікуванні дорослих, оскільки вони загалом мають підвищений ризик захворювання на поліомієліт від живої вакцини. Якщо треба використовувати живу вакцину, її вірулентність повинна бути якимось чином атенуйованою; інакше вірус у вакцині може спричинити хворобу, від якої вона повинна захищати.

Ряд хвороб спричинюється інкапсульованими бактеріями, у яких капсула, яка є смолоподібним шаром полісахариду чи поліпептиду, що знаходиться ззовні клітинної стінки цих бактерій, потрібна для патогенезу. Одним з прикладів є плеввропневмонія свиней, а фактори вірулентності бактерії *Actinobacillus pleuropneumoniae*, яка спричинює хворобу, включають капсульний полісахарид, ендотоксин та білкові екзотоксини. Плеввропневмонія свиней є однією з головних респіраторних хвороб, які завдають шкоди виробництву свинини у всьому світі та спричиняють у промисловості щорічні збитки на мільйони доларів у самих Сполучених Штатах.

У патенті США №5429818, виданому на ім'я Inzana, розкрито, що не-інкапсульовані мутанти *Actinobacillus pleuropneumoniae* є авірулентними і здатні забезпечити чудовий захист проти подальшої дії вірулентних бактерій. Не-інкапсульовані мутанти, описані у патенті Inzana, були одержані шляхом етилметансульфонатного мутагенезу. Однак така методика має ті недоліки, що деякі спонтанно чи хімічно індуквані мутанти можуть бути нестабільними, а характер мутації (мутацій) є невідомим.

Метою даного винаходу є створення безпечної та ефективної живої атенуйованої рекомбінантної вакцини для хвороб, спричинених бактеріями та грибами, які звичайно є інкапсульованими, і у яких капсула потрібна для вірулентності, але не для імунізації.

Іншою метою даного винаходу є генетична інженерія певних бактерій та грибків з метою вилучення капсули, щоб зробити їх авірулентними при відомій генетичній природі мутації.

Ще іншою метою даного винаходу є створення безпечної та ефективної живої атенуйованої рекомбінантної вакцини проти плеввропневмонії.

Згідно з винаходом, було одержано рекомбінантний живий атенуйований штам *Actinobacillus pleuropneumoniae*, який було позбавлено капсули методами генетичної інженерії. Оскільки капсула потрібна для вірулентності, а не для імунізації, штам може бути використаний як вакцина проти плеввропневмонії свиней. Вакцина була продукуюча за допомогою клонованого плазмідного вектора, який не може репродукуватись у *A. pleuropneumoniae*. Було секвовано гени екскреції та синтезу капсули серотипу 5 *A. pleuropneumoniae*. У клонованих генах синтезу капсули було зроблено велику делецію, після чого гени, що кодують стійкість до канаміцину та чутливість до сахарози, було клоновано до вилученого сайту для використання як маркерні гени. Суїцидальний вектор введено до вірулентного штамму серотипу 5 *A. pleuropneumoniae* методом електропорації для забезпечення гомологічної рекомбінації шляхом подвійного кросоверу між гомологічними ділянками хромосоми та плазміди. Було одержано чотири ізоляти, кожен з яких не виявляв іридисценції, що дозволяє припустити відсутність капсули. Відсутність капсули та вилучення ділянок генів капсули було підтверджено для одного штамму методами дот-блотування та саузерн-блотування, відповідно. Було також підтверджено наявність у рекомбінантному штамі маркерних генів. Ніяких інших змін будь-яких фенотипічних властивостей виявлено не було, і маркерних генів в інших ділянках хромосоми знайдено не було. Рекомбінантний штам, який було позначено як J45-100, був дуже чутливим до сироватки, мав знижену вірулентність у свиней при введенні дози, яка у десять разів перевищувала дозу половинної смертності вихідного штамму, і повинен забезпечити захист свиней проти плеввропневмонії.

Цей винахід буде корисним для одержання вакцин проти будь-якого інкапсульованого організму, що продукує токсини чи інші фактори вірулентності, у якого капсула потрібна для вірулентності, а не для імунізації. Потрібно лише здійснити тонування генів, що кодують синтез капсули в організмі, а потім вилучити та замінити ділянку клонованого гена маркерним геном на суїцидальному векторі, а потім ввести вектор до потрібного організму та відібрати генетично модифіковані організми, які позбавлені капсули. Винахід повинен бути корисним у одержанні вакцин проти додаткових бактеріальних інфекцій, які включають *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* та *Pseudomonas aeruginosa*, а також грибки, такі як *Cryptococcus neoformans*, який є патогеном, асоційованим з синдромом набутого імунodefіциту (СНІД) у котятих та людини.

Вищевказані та інші цілі, аспекти та переваги можна краще зрозуміти із наведеного далі детального опису варіантів втілення винаходу, яким надається перевага, з посиланнями на креслення, на яких:

Фігура 1 є фізичною картою клонованої ДНК pCW-11E із ділянки синтезу капсули *A. pleuropneumoniae* J45. Вказано місце знаходження та напрям транскрипції двох повних відкритих рамок читування (cspA та cspB, суцільна заливка), ідентифікованих дидезокси-методом визначення первинної структури. Вказано також положення часткової третьої потенційної відкритої рамки читування (cspC). Вказано також положення та напрям транскрипції неповного гена екскреції капсули cpxD, розміщеного на цьому фрагменті ДНК. Вказано фрагмент BglII-StuI розміром 2,1 тис. пар, що використовувався як ДНК-проба. Крапкова заливка вказує на неповні рамки читування.

Фігура 2 зображує результати саузерн-блот аналізу геномної ДНК *A. pleuropneumoniae*, гібридизованої до

дигоксигенін-міченого 2,1тис.пар BgIII-Stul фрагменту pCW11E. Здійснювали гібридизацію BatHI-гідролізованої геномної ДНК штаму 4074 серотипу 1 (смужка 1), штаму 1536 серотипу 2 (смужка 2), штаму J45 серотипу 5a (смужка 3), штаму K17 серотипу 5a (смужка 4), штаму 178 серотипу 5 (смужка 5), штаму 29628 серотипу 7 (смужка 6) та штаму 13261 серотипу 9 (смужка 7) з пробю, як описано нижче. Вказано молекулярну масу гібридизуючих смуг (у тис.пар).

Фігури 3a та 3b зображує нуклеотидну послідовність HindIII-EcoRV фрагменту pCW-11E довжиною 3,2тис.пар, який містить серотип-специфічну J45 ДНК *A.pleuropneumoniae* (ідентифікатор послідовності №1, SEQ ID No.1). Одержані амінокислотні послідовності двох повних відкритих рамок зчитування, виявлених у цій послідовності - cpsA (ідентифікатор послідовності №2, SEQ ID No.2) та cpsB (ідентифікатор послідовності №3, SEQ ID No.3) - та одержану N-термінальну послідовність третьої неповної відкритої рамки зчитування - cpsC (ідентифікатор послідовності №4, SEQ ID No.4) - вказано під нуклеотидною послідовністю. Гадані рибосомно-зв'язуючі сайти, що передують кожній відкритій рамці зчитування, виділено жирним шрифтом, і вказано гадані -10 та -35 промоторні послідовності, які йдуть слідом за cpsA.

Фігура 4 описує конструкцію суїцидального вектора, що містить вилучену ДНК синтезу капсули pCW11 EΔ1 KS1 та J45 *A.pleuropneumoniae* продукування некапсульованих мутантів шляхом алейного обміну. Плазмідний вектор pCW11EΔ1KS1 було сконструйовано шляхом гідролізу pCW-11E за допомогою Bg/II та Stul, затуплення кінців та лігування великого фрагмента довжиною 6,4тис.пар з 3,8тис.пар BatHI фрагментом pKS (також затупленого), що містить картридж nptI-sacRB (Kan^rSuc^s). Сайти рестрикції у дужках вказують початкові кінці фрагментів, лігованих у pCW11EΔ1KS1.

Вектор pCW11EΔ1KS1 був електротрансформований до *A.pleuropneumoniae*, і некапсульовані Kan^r-трансформанти відбирались за ознакою відсутності іридисценції на середовищі, що містило 85мг/мл канаміцину.

Фігура 5 зображує результати саузерн-блот аналізу геномної ДНК, ізольованої із J45 *A.pleuropneumoniae* (смужка 1) або J45-100 (смужка 2) за допомогою дигоксигенін-мічених проб, специфічних до nptI або ділянок локусу капсуляції *A.pleuropneumoniae*. J45 (смужка 1) або J45-100 (смужка 2) геномну ДНК *A.pleuropneumoniae* гідролізували за допомогою XbaI (стекла A та C) або BatHI (скло B) і гібридизували за допомогою 1,24тис.пар PstI-фрагмента pKS (nptI-специфічний), скло A; 2,1тис.пар Bg/II-Stul фрагмента pCW-11E (cpsABC-специфічний, дивись Фіг.1), скло B; або 2,1тис.пар C/aI фрагмента pCW-1C (cpsCBA-специфічний, дивись Фіг.3.2), скло C.

Фігура 6 зображує імуноблот колонії J45 та J45-100 *A.pleuropneumoniae* після проведення реакції з антисироваткою свиней, специфічною до капсульного полісахариду. На нітроцелюлозну мембрану наносили приблизно 5×10^5 (смужка 1) або 5×10^4 (смужка 2) колонієутворюючих одиниць (CFU) на лунку. Мембрану піддавали лізису у хлороформі та інкубували з антисироваткою свиней, яка містила антитіла до капсульного полісахариду серотипу 5a і не містила інших поверхневих антигенів *A.pleuropneumoniae*.

Фігура 7 зображує імуноблоти концентрованої надосадної рідини культур J45 (смужка 1) та J45-100 (смужка 2) *A.pleuropneumoniae*, яка містить переважно екзотоксини ArxI та ArxII. Скло A обробляли ArxI-специфічним моноклональним антитілом, а скло B - ArxII-специфічним моноклональним антитілом. Препарат на склі A містив як негативний контроль концентровану надосадну рідину культури штаму 1536 серотипу 2 *A.pleuropneumoniae* (смужка 3), оскільки цей серотип не синтезує ArxI. Блот на склі A обробляли ArxI-специфічним моноклональним антитілом.

Фігура 8 зображує електрофоретичні профілі ліпополісахаридів (LPS), ізольованих із J45 *A.pleuropneumoniae* (смужка 1) та рекомбінантного некапсульованого мутанта J45-100 (смужка 2). Ліпополісахариди піддавали електрофорезу через 15%-ний розділюючий гель та забарвлювали аміачним розчином хлориду срібла.

Фігура 9 зображує бактерицидну активність преколостральної сироватки теляти щодо J45 та J45-100 *A.pleuropneumoniae*. Життєздатність бактеріальних штамів у відсотках оцінювали після 60 хвилин інкубації при 37°C. Кожна точка даних є середнім значенням для трьох окремих експериментів, проведених з дублюванням. «Вуси» позначають стандартне відхилення для кожного середнього. Максимальна життєздатність у відсотках, зареєстрована для J45, становила 100%, хоч звичайно ці величини були більше, оскільки бактерії звичайно росли під час експерименту. Величини, що перевищували 100%, не реєструвались, оскільки їх не можна було точно визначити.

Фігури 10a та 10b зображують нуклеотидну послідовність фрагмента XbaI-ClaI pCW-1C довжиною 3,2тис.пар, який кодує гени J45 ДНК екскреції капсули *A.pleuropneumoniae* (Ідентифікатор послідовності №5, SEQ ID No.5). Вказано виявлені амінокислотні послідовності (Ідентифікатори послідовності №№6-8, SEQ ID Nos.6-8) протеїнів, що беруть участь у екскреції капсульного полісахариду *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a.

Фігура 11 є фізичною картою ДНК pCW-1C, одержаної із J45 *A.pleuropneumoniae*.

Винахід пропонує використання живого рекомбінантно-продукованого авірулентного штаму мікроорганізму (наприклад, бактерії чи грибка), який методом генетичної інженерії був позбавлений капсули, як вакцини проти хвороб, що спричиняються цим мікроорганізмом. Винахід може бути корисним у профілактиці хвороб, у яких капсула мікроорганізму потрібна для вірулентності, але не для імунозахисту, і хвороба викликана токсинами або іншими факторами вірулентності. Як конкретний приклад винаходу було продуковано некапсульований штам *Actinobacillus pleuropneumoniae*, який може бути використаний як вакцина проти плевропневмонії свиней. Головною ознакою винаходу є генетична модифікація мікроорганізму, яка, у конкретному варіанті втілення на *Actinobacillus pleuropneumoniae*, включає делецію у її дезоксирибонуклеїновій кислоті (ДНК) ділянки, яка кодує синтез капсули. Тільки як приклад описано синтез трансформованого мутанта серотипу 5 *Actinobacillus pleuropneumoniae*; однак, слід розуміти, що інші серотипи можуть бути одержані за методиками, аналогічними до описаної нижче, і можуть бути придатними для використання у вакцині самі або у сполученні з одним чи кількома рекомбінантними мутантами інших серотипів.

Штам, який описано нижче, разом з іншими штамми некапсульованих токсигенних бактерій або інших мікроорганізмів, одержаних згідно з описаною нижче методикою, буде чудовою вакциною, оскільки вони є

авірулентними, але продукують антигени, потрібні хазяїну для створення захисної імунної реакції. Вакцини можуть бути введені різними методами, однак перевага надається внутрішньом'язовій або підшкірній ін'єкції. Перевагою цих живих вакцин є те, що токсини, які є головною причиною хвороби, та інші компоненти, що утворюються лише живими організмами або *in vivo*, будуть утворюватись лише у місці імунізації і організм-хазяїн виробить імунну реакцію для свого захисту від ушкоджень, спричинених токсинами. Внаслідок цього хвороба (гостра або хронічна) не розвивається. Однак, організми не можуть поширюватись, оскільки без капсули вони є дуже чутливими до сироватки і негайно знищуються у кровотоку або респіраторному тракті. Крім того, імунна реакція, викликана клітинами живої вакцини, буде дужчою, і захист буде тривати довше, ніж при використанні вбитих вакцин.

ПРИКЛАД

Було ідентифіковано та проаналізовано ділянку ДНК, пов'язану з біосинтезом капсульного полісахариду *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Пробу, специфічну до гена *срхD*, який бере участь у екскреції капсульного полісахариду *A. pleuropneumoniae* серотипу 5a J45, було використано для ідентифікації та клонування прилягаючого фрагмента *Bam*HI розміром 5,8 тис. пар. геномної ДНК J45. Саузерн-блот аналіз засвідчив, що частина цієї ділянки містить ДНК, яка є серотип-специфічною. Аналіз послідовності ДНК показав, що ця ділянка містить дві повні відкриті рамки читування - *срsA* та *срsB* - та неповну третю потенційну відкриту рамку читування - *срsC*. *срsA* та *срsB* мають на низькому рівні спільну гомологію з глікозилтрансферазами, які беруть участь у біосинтезі ліпополісахариду *Escherichia coli* та капсульного полісахариду *Haemophilus influenzae* типу b, відповідно. Було сконструйовано вилучаемий фрагмент розміром 2,1 тис. пар, який охоплював клоновані відкриті рамки читування *срsABC*, який рекомбінували до хромосоми J45 методом алейного обміну для одержання мутанта J45-100. Цей мутант не продукував внутрішньоклітинного чи зовнішньоклітинного капсульного полісахариду, що свідчить про те, що *срsA*, *срsB* та/або *срsC* беруть участь у біосинтезі капсульного полісахариду *A. pleuropneumoniae*. Токсин *Арх* та ліпополісахаридні профілі J45-100 були ідентичними до показників інкапсульованого батьківського штаму J45. Однак J45-100 *in vitro* піс скоріше, ніж J45. J45-100 був чутливим до знищення у преколотральній сироватці теляти, а J45 - ні. J45-100 був авірулентним при використанні для введення свиням внутрішньотрахеально у дозах, які втричі перевищували дозу 50%-ної смертності штаму J45. При дозах, які у шість разів перевищували дозу 50%-ної смертності J45, J45-100 спричинював ушкодження легень від слабкого до середнього ступеню, але не смерть. Ці результати демонструють, що капсульний полісахарид є важливим детермінантом стійкості до сироватки та вірулентності *A. pleuropneumoniae*.

Бактеріальні штами, плазмиди та умови вирощування. Бактеріальні штами та плазмиди, використані у цих дослідженнях, описані у Таблиці 1. Для екстракції геномної ДНК та проведення бактеріальних аналізів *A. pleuropneumoniae* вирощували зі струшуванням при 37°C на мозково-серцевому бульйоні (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), який містив 5мкг/мл нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). Для електропорації штами *A. pleuropneumoniae* вирощували зі струшуванням при 37°C на трипсинизованому соєвому бульйоні (Difco Laboratories), який містив 0,6% екстракту дріжджів (Difco Laboratories) та 5мкг/мл НАД (TSY-N). Для проведення експериментів з провокаційними пробами на свинях штами *A. pleuropneumoniae* вирощували зі струшуванням при 37°C на бульйоні Columbia (Difco Laboratories), який містив 5мкг/мл НАД. Штами *Escherichia coli* вирощували на бульйоні Лурія-Бертані (Luria-Bertani) (Sambrook та ін., 1989) для звичайної культивування, або на бульйоні Terrific (Tartof and Hobbes, 1987) для екстракції плазмід. Антибіотики використовували у живильному середовищі для підтримання плазмід в *E. coli* у таких концентраціях: ампіцилін (Amp) - 100мкг/мл, і канаміцин (Kan) - 50мкг/мл. Для селекції рекомбінантних мутантів *A. pleuropneumoniae* канаміцин використовували у концентрації 85мкг/мл.

Таблиця 1

Використані бактеріальні штами та плазмиди

<i>A. pleuropneumoniae</i> штами 4074	серотип 1; (ATCC 27088)
ATCC ^a 1536	серотип 2; (ATCC 27089)
ATCC ^a J45	серотип 5a
FenwickTa ін., 1986a K17	серотип 5a
Nielsen, 1986a 178	серотип 5
m. Muiks 29628	серотип 7
LHoffman 13261	серотип 9
J. Nicolet J45-C	некапсульований мутант, ізольований після етилметансульфонатного метагенезу штаму
J-45 Inzana та ін., 1993f J-45-100	рекомбінантний некапсульований мутант із штаму J45
<i>E. coli</i> штами XL-1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac(F+proAB lacI^qZΔM15 TN10)</i> ; хазяїн для рекомбінантних плазмід
Stratagene, La Jolla, Calif., плазмиди pGEM-3z	Клонуючий вектор, 2,74 тис. пар; Amp ^r
Promega pCW-1C	XbaI фрагмент J45 розміром 5,3 тис. пар, клонований до pGEM-3Z
PCW-11E	BamHI фрагмент J45 розміром 5,8 тис. пар, клонований до pGEM-3Z
pKS	BamHI фрагмент розміром 3,8 тис. пар, що містить картридж ^c <i>npI^o-sacRB</i> , клонований до BamHI-ділянки pGEM-3Z; Amp ^r , Kan ^r
S.M. Boyle PCW11EΔ1KS1	pCW-11E з вилученим фрагментом Bg/II-StuI та з лігованим картриджем BamHI <i>npI^o-sacRB</i> розміром 3,8 тис. пар із pKS, який описано у цій главі

^a Американська колекція типових культур (American Type Culture Collection, Rockville, MD)

^b Цей маркер було спочатку одержано із гена Tn903 nptI pUC4K (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)

^c Цей картридж було описано раніше (Ried and Collmer, 1987)

Розрахунок часу генерації. Час генерації логарифмічної фази росту штаму *A.pleuropneumoniae* у TSY-N розраховували за формулою: $R=1/g$, де R позначає середню швидкість бактеріального росту, а g - час генерації популяції бактерій (Pelczar та ін., 1993). Середня швидкість росту R розраховувалась за такою формулою: $R=3,32(\log_{10}N - \log_{10}N_0) / t$, де t позначає час, що минув, N позначає кількість бактерій у момент часу t , і N_0 позначає початкову кількість бактерій у момент часу $=0$ (Pelczar та ін., 1993).

Аналіз гібридизації ДНК. Гідролізовану за допомогою ендонуклеази рестрикції ДНК (приблизно 5мкг на лунку) піддавали електрофорезу через 0,7% агарозні гелі і переносили під дією капілярних сил на найлонові мембрани MagnaGraph (Micron Separations Inc., Westboro, Mass.), використовуючи 20X сольовий розчин цитрату натрію (20X SSC (сольовий розчин цитрату натрію) відповідають 3M NaCl, 300мМ цитрату натрію, pH7), як було описано раніше (Sambrook та ін., 1989; Southern, 1975). ДНК ковалентно зв'язували з найлоновими мембранами за допомогою ультрафіолетового випромінювання, використовуючи UV Stratalinker (Stratagene, La Jolla, Calif.). Дигоксигенін-мічені проби для гібридизації ДНК синтезували за методом випадкового праймера, використовуючи набір нерадіоактивного мічення та детектування Genius System (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) відповідно до інструкцій виробника. Гібридизацію ДНК здійснювали при 68°C у розчинах, які містили 5X SSC. Мембрани промивали та проявляли згідно з інструкціями Genius System для колориметричного Детектування.

Методи та реагенти для рекомбінантної ДНК. Геномну ДНК ізолювали із вирощених на бульйоні клітин *A.pleuropneumoniae* згідно з методом, описаним S.Spinola. Стисло, він полягав у тому, що бактерії ресуспендували у 10мМ Трис - 1мМ ЕДТА (pH8) та інкубували з додецилсульфатом натрію (0,66%) та РНКазою протягом 1 години при 37°C. Додавали протеїназу К до кінцевої концентрації 100мкг/мл, і суміш інкубували при 56°C протягом 1 години. Суміш екстрагували однократно буферизованим фенолом та чотири рази буферизованою сумішшю фенол-хлороформ (Amresco, Inc., Solon, Ohio), геномну ДНК осаджували етанолом та ресуспендували у 10мМ Трис-1мМ ЕДТА (pH8). Плазмідну ДНК ізолювали методом швидкого лужного лізису (Ish-Horowicz and Burke, 1981). Фрагменти рестрикції, потрібні для клонування та синтезу проб, елюювали із агарозних гелів, як описано раніше (Zhen and Swank, 1993). Рестрикційний гідроліз, електрофорез на агарозному гелі та лігування ДНК здійснювали, як було описано раніше (Sambrook та ін., 1989). Кінці фрагментів рестрикції затулювали шляхом заповнення 5'-кінцевих надмірностей нуклеотидами (dNTPs), використовуючи фрагмент Кльонова (Klenow fragment) ДНК-полімерази Ш, як було описано раніше (Sambrook та ін., 1989). Плазмідну ДНК трансформували до штамів *E.coli* методом електропорації (Dower та ін., 1988), використовуючи електропоратор BTX ECM 600 (BTX, Inc., San Diego, Calif.).

Ендонуклеази рестрикції та фрагмент Кльонова ДНК-полімерази І були одержані від Promega Corporation (Madison, Wis.). ДНК-лігаза Т4 була одержана від Gibco BRL (Gaithersburg, Md.). Нуклеотиди (dNTPs) для реакції заповнення були одержані від Boehringer-Mannheim Corporation (Indianapolis, Ind.).

Секвенування та аналіз ДНК. Нуклеотидні послідовності обох нитей 2,7-тис.пар (kb) XbaI-EcoRV фрагменту ДНК pCW-11E визначали дидезокси-методом встановлення первинної структури з обривом ланцюга (Sanger та ін., 1977), з використанням набору для секвенування Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio) з α -³⁵[S]dATP (DuPont/NEN Research Products, Boston, Mass.). Двонитеві кодуєчі фрагменти ДНК секвенували з використанням звичайних олігонуклеотидних праймерів (DNAgency, Inc., Malveme, Pa.) для продовження зчитування кожної ниті.

Одержані нуклеотидні послідовності комбінували з нуклеотидною послідовністю 4,6 тис.пар XbaI-Clal фрагмента ДНК pCW-1C, кодуєчого структурні гени капсули (Фігура 10), і аналізували за допомогою комп'ютерної програми для проведення аналізу DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.). Пошуки подібності послідовностей по базах даних EMBUGenBank/DBJ проводили з використанням комп'ютерної програми BLAST (Altschul та ін., 1990) у Національному центрі біотехнологічної інформації (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.).

Стійкі ділянки сар-локусу *H.influenzae* типу b (сарb), який бере участь у екскреції капсульного полісахариду, були використані для ідентифікації, клонування та аналізу ділянки локусу *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a, який бере участь у екскреції капсульного полісахариду. Було проведено саузерн-блот аналіз геномної ДНК штаму J45 *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a з використанням проб, специфічних до зціплених ділянок локусу капсуляції *H.influenzae* типу b (сарb). Ці проби не гібридизувались з геномною ДНК *A.pleuropneumoniae* за дуже жорстких умов (68°C, 5xSSC), але гібридизувались за умов від середньої до низької жорсткості (55°C, 5xSSC). Фрагмент EcoRI розміром 4,4тис.пар локусу сарb *H.influenzae* із плазмиди pSKH1, який містить ділянку 1 гена bexD, що бере участь у екскреції капсульного полісахариду та дві відкриті рамки зчитування ділянки 2, що беруть участь у біосинтезі капсульного полісахариду, гібридизували з фрагментами HindIII розміром 1,2тис.пар та XbaI розміром 5,3тис.пар геномної ДНК J45. Фрагмент EcoRI локусу сарb *H.influenzae* розміром 9,0тис.пар із плазмиди pSKH2, який містить ділянку 1 генів bexCBA, що беруть участь у екскреції капсульного полісахариду, певну неохарактеризовану ділянку 3 ДНК, яка є спільною для кількох серотипів *H.influenzae*, та певні фрагменти ділянки 2 ДНК, що беруть участь у біосинтезі капсульного полісахариду, гібридизували з фрагментами 1,5тис.пар HindIII, 5,3тис.пар XbaI та 2,4тис.пар XhoI геномної ДНК J45. Ці дані вказують на те, що локуси капсульних генів *H.influenzae* типу b та *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a мають спільні гомологічні ділянки. Обидві проби, специфічні до *H.influenzae* сарb, містять ДНК ділянки 1, що бере участь у екскреції капсульного полісахариду, внаслідок чого можна припустити, що фрагмент 5,3тис.пар XbaI геномної ДНК J45, який гібридується з обома *H.influenzae* сарb-пробами, може містити гени, які кодуєть протеїни, що беруть участь у екскреції капсульного полісахариду

серотипу 5a *A.pleuropneumoniae*. Фрагмент 5,3 XbaI геномної ДНК J45, який гібридується з двома *H.influenzae* сарб-пробами, клонували до ділянки XbaI плазмиди pGEM-3Z (в обох напрямках) із XbaI-гідролізованих фрагментів геномної ДНК J45 в інтервалі від 4,8 до 6,0 тис. пар, які одержували електроелекцією (після електрофоретичного розділення) із агарозного гелю. Одну з одержаних плазмід було позначено pCW-1C. Здійснювали саузерн-блот аналіз для визначення того, чи будуть *bexD*, *bexC*, *bexB* та *hexA* *H.influenzae* типу b гібридуватись з прилягаючими фрагментами pCW-1C у такому самому порядку (*bexDCBA*), в якому ці гени знаходяться в *H.influenzae*. Результати дають змогу припустити, що ділянка ДНК *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a, потрібна для екскреції капсульного полісахариду, була клонована вдало, і що ця ділянка організована аналогічно до *bex*-локусу *H.influenzae* типу b.

Електротрансформування *A. pleuropneumoniae*. *A. pleuropneumoniae* вирощували до фази середини логарифмічного росту у TSY-N, збирали центрифугуванням при 7000хg при 4°C і промивали чотири рази у охолоджену (4°C) стерилізованому на фільтрі буфері, який містив 272мМ манітолу, 2,43мМ K_2HPO_4 , 0,57мМ KH_2PO_4 , 15% гліцерину, рН 7,5. Цей буфер було модифіковано (так, щоб він замість сахарози містив манітол) порівняно з раніше описаним буфером, який використовувався для промивання клітин *A. pleuropneumoniae* перед електропорацією (Lalonde та ін., 1989b). Потім клітини один раз промивали у охолоджену стерилізованому на фільтрі 15%-ному гліцерині та ресуспендували до приблизно 10^{10} колонієутворюючих одиниць (CFU)/мл у 15%-ному гліцерині. Аліквоти цієї суспензії змішували з 1,5-2,0мкг плазмідної ДНК (у 1,5мл дистильованої води), яку очищали ультрацентрифугуванням у градієнті густини хлориду цезію (Sambrook та ін., 1989), поміщали до охолоджуваних кювет для електропорації з 2мм зазором (BTX, Inc.) і піддавали електропорації за допомогою електропоратора BTX ECM 600 (BTX, Inc.) при напрузі заряду 2,5кВ та регуляторі опору, встановленому у положення R7 (246Ом). Реально був генерований імпульс 2,39кВ тривалістю 10,7 мілісекунд. Після електропорації клітини відновлювали у 1мл TSY-N, що містив 5мМ $MgCl_2$, при слабкому струмуванні протягом 3,5 годин при 37°C. Після відновлення клітини культивували на TSY-N-агарі, який містив 85мкг канаміцину на мл та інкубували при 37°C.

Імуноблотування концентрованої надосадної рідини культур *A. pleuropneumoniae* проводили за описаною раніше методикою (Ma and Inzana, 1990). Стисло, вона полягала у тому, що відокремлювали приблизно 15мкг загального протеїну надосадної рідини культури методом безперервного електрофорезу у поліакриламідному гелі, який містив додецилсульфат натрію SDS-PAGE (Laemmli, 1970), через 8% розділюючий гель. Протеїни переносили на нітроцелюлозну мембрану (NitroBind; Micron Separations, inc.) за методикою Towbin та ін. (1979). Мембрану інкубували у TBS, який містив 2% бичачого сироваткового альбуміну для блокування неспецифічного зв'язування і розрізали на смужки. Смужки інкубували протягом ночі при 4°C або з моноклональним антитілом, специфічним до токсину *Ap_{xII}* (Ma and Inzana, 1990), або з моноклональним антитілом, специфічним до токсину *Ap_{xI}* (Devendish та ін., 1989; Frey та ін., 1992), і промивали у TBS. Відбиток, що реагував з *Ap_{xII}*-специфічним моноклональним антитілом, інкубували з анти-мишачим козиним IgG, кон'югованим до пероксидази хрому, у розведенні 1:2000 (Cappel), промивали у TBS та проявляли, як описано вище. Відбиток, що реагував з *Ap_{xI}*-специфічним моноклональним антитілом, інкубували з анти-мишачим козиним IgG, кон'югованим до лужної фосфатази, у розведенні 1:2000, і проявляли, як було описано раніше.

(Frey та ін., 1992).

Екстракція та електрофорез ліпополісахаридів (LPS). Ліпополісахариди ізолювали із *A.pleuropneumoniae* за методом мікроекстракції у гарячому фенолі-воді, як було описано раніше (Inzana, 1983). Очищені ліпополісахариди піддавали електрофорезу через 15%-ний розділюючий поліакриламідний гель, який містив сечовину, як було описано (Inzana та ін., 1988). Електрофоретичні профілі ліпополісахаридів візуалізували шляхом забарвлення гелю аміачним розчином хлориду срібла (Tsai and Frasch, 1982).

Аналіз бактерицидності сироватки. Визначали чутливість *A.pleuropneumoniae* до бактерицидної активності преколостральної сироватки теляти. Відносну життєздатність бактеріальних штамів у 5, 10, 15, 20, 30, 40 та 50%-ній преколостральній сироватці теляти визначали після 60 хвилин інкубування при 37°C.

Дослідження вірулентності. Свиней у віці від 7 до 9 тижнів одержували із двох місцевих стад, не вражених інфекцією *A.pleuropneumoniae*, і випадковим чином розподіляли на групи. Групи свиней поміщали до окремих загонів, не дозволяючи прямого фізичного контакту між групами. Приміщення для тварин Політехнічного інституту та Університету штату Віргінія функціонують та утримуються у відповідності до вимог Американської асоціації акредитації догляду за тваринами у лабораторіях. Для проведення експерименту з контрольним зараженням штами *A.pleuropneumoniae* вирощували зі струшуванням у бульйоні Columbia (Difco Laboratories) з доданням 5мкг/мл нікотинамідаденіндинуклеотиду (NAD) до середини лог-фази (10^9 CFU/мл). Бактерії збирали центрифугуванням при 7000хg і ресуспендували до концентрації приблизно 10^9 CFU/мл у фосфатно-сольовому буфері. Свиней заражали інтратрахеально 10мл розбавленого препарату цієї суспензії з наступним слабким заспокоєнням седативним засобом Stresnil (Pittman-Moore, Inc., Washington Crossing, N.J.). Аутопсію свиней здійснювали якомога скоріше після смерті або негайно після еутаназії пентобарбіталом натрію. Ступінь ушкодження легень оцінювалась патологом-ветеринаром у відповідності до таких критеріїв: 0 - непримітні легень (великих ушкоджень не спостерігається); 1+ -1-10% тканини легень вражено будь-якою комбінацією гіперемії, набряку, кровотечі, консолидації та/або плевриту; 2+ - вражено 11-49% тканини легень; 3+ - вражено 50-74% тканини легень; 4+ - вражено 75% або більше тканини легень. Зразки легень брали при аутопсії із правої краніально-дорсальної сторони каудальної долі і культивували на мозково-серцевому живильному середовищі, яке містило нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD) для виявлення присутності *A.pleuropneumoniae*.

Ідентифікація та клонування серотип-специфічної ділянки ДНК *A.pleuropneumoniae*. Для ідентифікації та клонування ДНК *A.pleuropneumoniae* J45, що бере участь у біосинтезі капсульного полісахариду, було здійснено саузерн-блот аналізи для ідентифікації суміжної ділянки ДНК (в напрямку 5'), розміщеної слідом за генним кластером *срхDCBA*, що бере участь у екскреції капсульного полісахариду, який було описано вище (Фігури 10а-б та 11). Очікувалось, що ця наступна ділянка ДНК буде кодувати серотип-специфічні гени, які беруть участь у біосинтезі капсульного полісахариду, оскільки, як вважалося, локус капсуляції (*сар*) *A.pleuropneumoniae* організований аналогічно до локусу капсуляції *Haemophilus influenzae* типу b та *Neisseria meningitidis* групи B. Для аналізу *Bam*HI-гідролізованої геномної ДНК *A.pleuropneumoniae* J45 використовували мічений дигоксигеніном 1,2тис.пар *Bam*HI-XbaI фрагмент *рCW-1C*, який містив частину гена *срхD*. Цю *срхD*-специфічну пробу гібридизували до окремого *Bam*HI-фрагмента геномної ДНК J45 розміром приблизно 5,8тис.пар (дані не зображено). Цей 5,8тис.пар *Bam*HI-фрагмент клонували до *Bam*HI-ділянки *рGEM-3Z* із *Bam*HI-гідролізованих фрагментів геномної ДНК J45 в інтервалі 5,0-6,5тис.пар, які одержували електроелеюцією (після електрофоретичного розділення) із агарозного гелю. Одержана плазміда була позначена *рCW-11E*, і було складено її рестрикційну карту (Фіг.1). Частина *рCW-11 E*-вставки ДНК (фрагмент 1,2тис.пар *Bam*HI-XbaI) перекривала ДНК, присутню на вставці *рCW-1C*.

*Bam*HI-гідролізована геномна ДНК від кількох різних серотипів *A.pleuropneumoniae* гібридизували з 2,1тис.пар *Bgl*II-StuI фрагментом *рCW-11E* (Фіг.1) для визначення специфічності цієї ділянки ДНК щодо серотипу (Фіг.2). Фрагмент ДНК *Bgl*II-StuI розміром 2,1тис.пар гібридизувались з *Bam*HI-фрагментом геномної ДНК розміром 5,8тис.пар від трьох протестованих штамів *A.pleuropneumoniae* серотипу 5, але не гібридизувались з геномними ДНК від серотипів 1, 2, 7 та 9 (Фіг.2). Таким чином, ДНК *A.pleuropneumoniae* у *рCW-11E* містить ДНК, яке є специфічним до штамів серотипу 5. Оскільки ця ДНК була специфічною щодо серотипу, вона, імовірно, брала участь у біосинтезі капсульного полісахариду.

Нуклеотидна послідовність та аналіз серотип-специфічної ділянки ДНК *A.pleuropneumoniae*. Було визначено нуклеотидну послідовність XbaI-EcoRV фрагмента ДНК *рCW-11E* розміром 2,7тис.пар. Цю нуклеотидну послідовність об'єднували з нуклеотидною послідовністю ClaI-XbaI фрагмента *рCW-1C* та аналізували на присутність відкритих рамок зчитування, які не були раніше ідентифіковані. Нуклеотидна послідовність HindIII-EcoRV фрагмента *рCW-11E* розміром 3,2тис.пар, яка містила щойно ідентифіковані відкриті рамки зчитування, наведена на Фіг.3. Дві повні відкриті рамки зчитування, позначені *сpsA* та *сpsB* (*сps* використано для позначення синтезу капсульного полісахариду), були ідентифіковані далі та на протилежному ланцюгу від гена *срхD*, який бере участь у екскреції капсульного полісахариду *A.pleuropneumoniae* (Фіг.1 та Фіг.3). Ініціюючий кодон AUG *сpsB* був розміщений через 3 нуклеотиди після термінуючого кодону UAA *сpsA*. Ініціюючий кодон AUG третьої потенційної відкритої рамки зчитування -*сpsC* - був ідентифікований на 15 нуклеотидів далі від термінуючого кодону UAA *сpsB*. Узагальнюючі послідовності зв'язування рибосом Шайна-Далгарно (Shine and Dalgarno, 1974) були ідентифіковані у межах 13 основ від ініціюючих AUG-кодонів *сpsA*, *сpsB* та *сpsC* (Фіг.3). Гаданий промотор, який містив послідовності, аналогічні до узагальнюючих -10 (TATAAT) та -35 (TTGACA) послідовностей *E.coli*⁷⁰ (Hawley and McClure, 1983), був ідентифікований після *сpsA* (Фіг.3). Близькість до *сpsABC* та ідентифікація гаданого промотора, розміщеного далі по ланцюгу, дають змогу припустити, що ці відкриті рамки зчитування можуть бути спів-транскрибовані. Вміст G+C для ділянки ДНК, кодуючої *сpsABC*, становив 28%.

Передбачені поліпептиди *сpsA* та *сpsB* склались з 321 (*сpsA*) та 526 (*сpsB*) амінокислот (Фігура 3). Передбачені молекулярні маси *сpsA* та *сpsB* становили 36,9 та 61,7 кілодальтонів (кДа), відповідно. Графіки гідропатії демонструють, що *сpsA* та *сpsB* є відносно гідрофільними протеїнами, що дає змогу припустити, що ці протеїни можуть бути асоційовані з цитоплазматичною ділянкою *A.pleuropneumoniae* (дані не зображено). Пошуки з використанням системи BLAST (Altschul та ін., 1990) в об'єднаних базах даних нуклеотидів та

протеїнів, що не містять надлишкових послідовностей, Національного центра біотехнологічної інформації не виявили скільки-небудь суттєвої гомології між *cpsABC* на нуклеотидному або амінокислотному рівні з іншими послідовностями у базах даних (дані не зображено). Однак спостерігався низький рівень гомології (ступінь подібності 15%) між *CpsA* та протеїном Rfb *E.coli*, який є O-антигенглікозилтрансферазою, що бере участь у біосинтезі ліпополісахаридів (Cheah and Manning, 1993). Було виявлено низький рівень гомології (приблизно 14% подібності) між *CpsB* та ділянкою 2 відкритої рамки зчитування 3 передбачуваного протеїнового продукту локусу капсуляції *H.influenzae* типу b. Передбачуваний протеїн відкритої рамки зчитування 3 бере участь у біосинтезі капсульного полісахариду полірибосилрибітолу *H.influenzae* типу b (Van Eldere та ін., 1995). Ніякої суттєвої гомології не спостерігалось між 83 N-термінальними амінокислотами *CpsC* та будь-якими протеїнами у базах даних.

Продуктування канаміцин-стійких некапсульованих трансформантів *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a. На Фіг.4 схематично зображено процедури, які було використано для продукування рекомбінантних некапсульованих мутантів *A.pleuropneumoniae* J45 шляхом гомологічної рекомбінації та алейного обміну. Вектор pCW11EΔ1KS1 було вперше сконструйовано для використання як суїцидальний вектор, що не реплікується, для сприяння обміну ДНК капсуляції *A.pleuropneumoniae* дикого типу з генетично-зміненим ДНК капсуляції *A.pleuropneumoniae* шляхом подвійної гомологічної кросвер-рекомбінації. Вектор pCW11EΔ1KS1 було сконструйовано шляхом проведення спочатку гідролізу pCW-11E за допомогою Bg/II та StuI для створення великої делеції у серотип-специфічній ДНК капсуляції *A.pleuropneumoniae*. Кінці цієї гідролізованої ДНК затуплювали, і великий 6,4тис.пар фрагмент лігували до 3,8тис.пар BamHI-фрагмента pKS (кінці якого також затуплювали), що містив картридж *nptI-sacR-sacB*. Цей картридж містив ген Tn903 *nptI*, який, як було визначено раніше, надає *A.pleuropneumoniae* стійкість до канаміцину (Кап^r) (Tascon та ін., 1994), і послідовності *sacRB*, які надають чутливість до сахарози (Suc^c) багатьом грам-негативним бактеріям (Gay та ін., 1983; Ried and Collmer, 1987). Ділянка делеції, створена у PCW11EΔ1KS1, охоплювала *cpsABC* (Фіг.1, Фіг.4) і тому, імовірно, впливала на продукування протеїнів з цих відкритих рамок зчитування.

Вектор pCW11EΔ1KS1 не реплікується у *A.pleuropneumoniae* і, таким чином, функціонує як суїцидальний вектор. Після електропорації pCW11EΔ1KS1 до *A.pleuropneumoniae* J45 та інкубування одержаних сумішей при 37°C протягом 2 днів було одержано сім стійких до канаміцину трансформантів. Чотири з цих канаміцин-стійких трансформантів J45 не давали іридисценції при візуалізації на планшетах з навискісним напрямом світла від джерела, що дає змогу припустити, що ці трансформанти є некапсульованими (дані не зображено). Одним із факторів впливу було середовище, яке використовували для вирощування *A.pleuropneumoniae* перед електропорацією з PCW11EΔ1KS1, оскільки некапсульовані канаміцин-стійкі трансформанти ніколи не одержували при вирощуванні *A.pleuropneumoniae* на мозково-серцевому бульйоні з доданням NAD.

Генотипний аналіз канаміцин-стійких трансформантів *A.pleuropneumoniae*. Попередні аналізи гібридизації колоній для семи канаміцин-стійких трансформантів показали, що чотири трансформанти, які здавались некапсульованими (при візуальному спостереженні), гібридизувались з *nptI*-специфічною ДНК-пробою (1,24тис.пар PstI-фрагмент pKS), але не гібридизувались з пробами, специфічними до pGEM-3Z (1,1тис.пар BglI-фрагмент pGEM-3Z) або з серотип-специфічним 2,1тис.пар Bg/II-StuI фрагментом pCW-11E (дані не зображені). Ці результати вказують на те, що подвійна рекомбінація відбулась в кожному з цих чотирьох канаміцин-стійких трансформантів. Навпаки, колонії інших трьох канаміцин-стійких трансформантів гібридизувались з пробами, специфічними до гена *nptI* pGEM-3Z та до 2,1тис.пар Bg/II-StuI фрагмента pCW-11E, що дає змогу припустити, що відбувся один кросвер, і суїцидальний вектор pCW11EΔ1KS1 було цілком інтегровано до хромосоми цих трансформантів (дані не зображені). Результати саузерн-блот аналізів геномної ДНК, виділеної з чотирьох канаміцин-стійких, потенційно некапсульованих трансформантів (з використанням проб, як було описано вище), були ідентичними, що вказує на те, що одна й та сама подвійна рекомбінація відбулась у кожному з цих трансформантів. Один з цих трансформантів було обрано випадковим чином для подальших досліджень і позначено J45-100.

Було здійснено саузерн-блот аналізи геномної ДНК, ізольованої із J45 та J45-100 за допомогою ДНК-проб, специфічних до гена *nptI*, 2,1тис.пар BglII-StuI фрагмента pCW-11E та 2,1тис.пар ClaI-фрагмента pCW-1C (Фіг.5). *nptI*-специфічна ДНК-проба гібридизувалась з 5,0тис.пар фрагментом XbaI-гідролізованої ДНК J45-100, але не гібридизувалась з ДНК J45, що засвідчує наявність маркера *nptI* в хромосомі J45-100 (Фіг.5A). Гібридизація *nptI*-проби з 5,0тис.пар XbaI-фрагментом геномної ДНК J45-100 узгоджується з розміром цього XbaI-фрагмента у суїцидальному векторі pCW11EΔ1KS1, який було використано для одержання J45-100. 2,1тис.пар BglII-StuI фрагмент pCW-11E гібридизувався з 5,8тис.пар фрагментом BamHI-гідролізованої ДНК J45, але не гібридизувався з ДНК J45-100, що засвідчує делецію цього фрагмента у J45-100 (Фіг.5B). Проба, специфічна до генів *srxCBA* (2,1тис.пар ClaI фрагмент pCW-1C), які беруть участь у екскреції капсульного полісахариду, гібридизувався з 5,3тис.пар XbaI-фрагментом як J45, так і J45-100 (Фіг.5C). Цей результат засвідчує, що ця ділянка локусу капсуляції *A.pleuropneumoniae* залишається незачепленою подвійною рекомбінацією, яка відбувається на суміжній ділянці ДНК. Проба, специфічна до pGEM-3Z, не гібридизується з геномною ДНК як J45, так і J45-100, що засвідчує відсутність векторної ДНК у геномі J45-100. Загалом, ці результати гібридизації ДНК вказують на те, що у J45-100 відбулась бажана подвійна рекомбінація та алейний обмін.

Фенотипічний аналіз канаміцин-стійкого трансформанта *A.pleuropneumoniae* J45-100. Оцінювали рівень продукування капсульного полісахариду у J45-100 шляхом імуноблотування колоній та аглютинації з латексом. Антисироватка, яка містила антитіла, специфічні до капсульного полісахариду *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a, але не містила інших поверхневих компонентів бактерій, вступала до реакції з J45, але не реагувала з J45-100 (Фіг.6). Оскільки бактеріальні колонії на мембрані було піддано лізису у хлороформі, ці результати вказують на те, що J45-100 не продукує внутрішньоклітинного або зовнішньоклітинного капсульного полісахариду. Цілі або озвучені J45-100 не аглютинують з латексними кульками, ковалентно кон'югованими з очищеним антитілом до капсульного полісахариду *A.pleuropneumoniae* серотипу 5a (Inzana,

1995), тоді як цілі клітини J45 та озвучені клітини J45-C сильно аглютинують з реагентом, нанесеним на латексні кульки (дані не зображено). Ці результати засвідчують, що делеція, зроблена у сар локусі *A.pleuropneumoniae* J45-100, призвела до втрати здатності біосинтезу капсульного полісахариду. Крім того, ці результати вказують на те, що некапсульований мутант J45, ізольований після етилетансульфонатного мутагенезу (Inzana та ін., 1993a), а саме J45-C. продукував внутрішньоклітинний, але не зовнішньоклітинний капсульний полісахарид.

Було проведено порівняння експресії токсину *Arx* та електрофоретичних профілів ліпополісахаридів J45 та J45-100 для визначення того, чи вплинула мутація, здійснена у сар локусі J45-100, на ці важливі детермінанти вірулентності. Не було виявлено ніякої різниці у секретії протеїнів токсинів *ArxI* та *ArxII* вагою 105кДа до надосадної рідини культур між J45 та J45-100 (Фіг.7). Крім того, не було виявлено ніякої різниці між електрофоретичними профілями ліпополісахаридів J45 та J45-100 (Фіг.8).

Було досліджено ріст J45 та J45-100 у TSY-N та чутливість J45 та J45-100 до бактерицидної дії преколостральної сироватки теляти для визначення впливу втрати капсуляції на ці фенотипічні властивості. Криві росту J45 та J45-100 у TSY-N були аналогічними, але не ідентичними (дані не зображено). Однак, визначення титру життєздатності на планшетах продемонструвало, що під час логарифмічної фази росту J45-100 ріс скоріше (час генерації = біля 23 хвилин), ніж батьківський капсульований штам J45 (час генерації = біля 28 хвилин) (дані не зображено). Рекомбінантний некапсульований мутант J45-100 був ефективно знищений при витримуванні протягом 60 хвилин у 10-50% преколостральній сироватці теляти як джерелі живлення, тоді як капсульований батьківський штам J45 не був знищений (Фіг.9).

Дослідили чутливість J45-100 до сахарози для визначення того, чи можуть послідовності *sacRB* функціонувати як контрелективний маркер у *A.pleuropneumoniae* і внаслідок цього викликати ексцизію картриджу *npI-sacRB* із хромосоми J45-100. Вирощені на бульйоні J45-100 росли дуже бурхливо при прямому висіванні або при розведенні з послідовним висіванням на TSY-N або середовище Лурія-Бертано (Luria-Bertani) (до якого було додано 5 ІІг/мл NAD), що містило від 5 до 8% сахарози. Присутність послідовностей *sacRB* у хромосомі J45-100 була підтверджена саузерн-блотуванням. Ці результати дають змогу припустити, що або *sac/RS*-маркер не експресувався у *A.pleuropneumoniae*, або, можливо, леван, який утворюється *sacRS*-левансахарозою у присутності сахарози, був нетоксичним для J45-100.

Інтрахеальне контрольне зараження свиней рекомбінантним некапсульованим мутантом *A.pleuropneumoniae* J45-100. Рекомбінантний некапсульований мутант J45-100 не спричинював ніякої смертності у свиней при введенні у дозах, які в 3 та в 6 разів ($1,45 \times 10^7$ колонієутворюючих одиниць та $2,95 \times 10^7$ колонієутворюючих одиниць, відповідно) перевищували дозу половинної смертності (LD_{50}) капсульованого батьківського штаму J45 (5×10^6 колонієутворюючих одиниць) (Inzana та ін., 1993a) (Таблиця 2). Навпаки, у всіх трьох свиней, яких було заражено дозами, що у 6,5 разів перевищували LD_{50} J45, розвинулись тяжкі ушкодження легень, які призвели до їх загибелі (Таблиця 2).

Таблиця 2

Вірулентність *A.pleuropneumoniae* J45 ТА J45-100 для свиней

Штам, використаний для контрольного зараження	Доза контрольного зараження	Середня оцінка ушкодження легень	Кількість позитивних/загальна кількість тестованих	
			Смертність	Виділення ^a
J45	$1,6-3,3 \times 10^7$ CFU ^b	4+	3/4 ^c	4/4
J45-100	$1,5 \times 10^7$ CFU	0	0/5	0/5
J45-100	$3,0 \times 10^7$ CFU	1+	0/5	2/5 ^d
J45-100	$8,4 \times 10^7$ CFU	1+	1/4 ^e	4/4 ^d
J45-100	$1,8 \times 10^8$ CFU	2+	0/4	4/4 ^d
J45-C ^f	$1,7 \times 10^8$ CFU	1+	0/2	2/2 ^d

^a Виділення штаму, використаного для контрольного зараження, із зразка легень, взятого при аутопсії. Аутопсію свиней, заражених J45-100, проводили через 4 дні після зараження.

^b Ця доза у 6,6 разів перевищує дозу 50%-ної смертності (5×10^6 CFU), описану у попередніх дослідженнях (Inzana та ін., 1993a).

^c Всі свині у цій групі померли на протязі 36 годин після контрольного зараження.

^d *A.pleuropneumoniae* виділяли з легень, а некапсульований характер встановлювали за відсутністю іридисценції та нездатності аглютинувати серотип 5-специфічні сенситизовані латексні частинки.

^e Аутопсія однієї з померлих свиней вказувала на те, що смерть була спричинена неналежним введенням контрольної дози.

^f J45-C є хімічно індукованим некапсульованим мутантом, який було описано раніше.

П'ять свиней, який було піддано контрольному зараженню низькою дозою J45-100 ($1,45 \times 10^7$ колонієутворюючих одиниць (CFU)), не виявляли ніяких клінічних симптомів, характерних для плевропневмонії свиней, і у них не утворювалось ніяких ушкоджень легень. Крім того, із зразків легень, взятих при аутопсії через чотири дні після контрольного зараження, не було виділено культур *A.pleuropneumoniae*. Дві з п'яти свиней, заражених більшою високою дозою J45-100 ($2,95 \times 10^7$ CFU), були клінічно нормальними, і при аутопсії ушкоджень легень у них виявлено не було. У однієї свині з цієї групи, зараженої більшою високою дозою J45-100, спостерігалась помірна задишка, а при аутопсії було виявлено певні ознаки гіперемії легень та легку кровотечу (оцінка ушкодження легень = 1+). У двох свиней з цієї групи, що залишились, спостерігалась слабка задишка,

а при аутопсії було виявлено певні ознаки плевриту та консолідації (оцінка ушкодження легень =2+). Культури *A. pleuropneumoniae* J45-100 було виділено лише з цих двох свиней з найбільш тяжкими ушкодженнями легень. Бактерії, виділені з цих двох свиней, не аглютинують латексні кульки з реагентом аглютинації серотипу 5а. Таким чином, виділені бактерії залишались некапсульованими, що вказує на те, що J45-100 не перетворюється на капсульований фенотип *in vivo*.

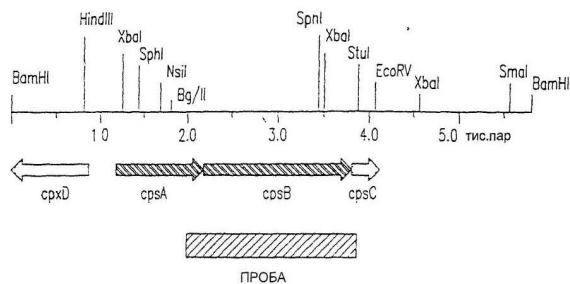
Хоч гени *nptI* (надає стійкості до канаміцину) та *SacB/SacR* (надає чутливості до сахарози) були клоновані до ділянки делеції, вони були призначені для використання лише як маркерні гени. Можуть бути також використані альтернативні варіанти маркерних генів. З причин, пов'язаних з охороною здоров'я та безпекою, може бути бажаним уникнення використання антибіотик-стійких маркерів, таких як *nptI*, або створення механізму вилучення або інактивації антибіотичного маркера. Придатні не-антибіотичні маркери можуть включати стійкість до ртуті.

Некапсульований штам *Actinobacillus pleuropneumoniae* серотипу 5, одержаний згідно з описаною вище процедурою, продукує лише два з трьох токсинів, які виробляються *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Крім того, що модифіковані *Actinobacillus pleuropneumoniae* мають захисну та імуногенну дію, вони можуть бути також корисними для клонування до ділянки делеції гена третього RTX токсину. Це можна зробити шляхом клонування гена токсину RTX до касети гена канаміцину штаму J45-100, тим самим інактивуючи ген канаміцину.

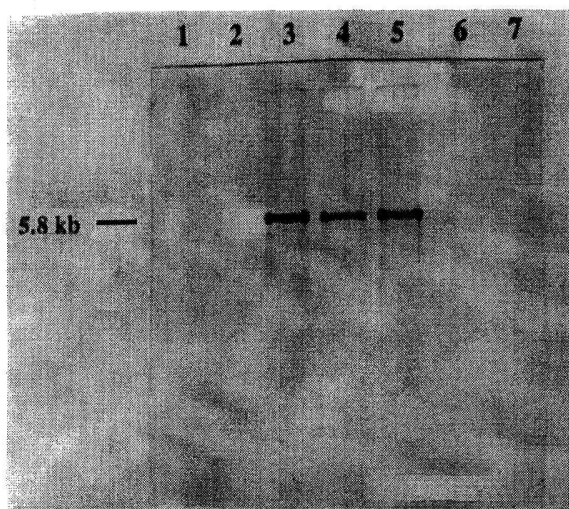
Вакцина повинна бажано бути виготовлена у формі, аналогічній до інших вакцин, добре відомих фахівцям. Бажано, щоб вакцина була закупорена у вигляді ліофілізованої мікстури, і вона може включати один чи кілька серотипів мутантних штамів. Для збереження життєздатності може бути додана речовина, така як бульйон Columbia, трепалоза, або альбумін, гліцерин чи деякі інші агенти. Треба буде лише регідратувати вміст ліофілізованої мікстури стерильною водою або сольовим розчином та зробити ін'єкцію (внутрішньом'язову, внутрішньовенну, інтраперитонеальну, підшкірну і т.ін.). Композиція вакцини може бути також сформульована і для інших шляхів введення (наприклад, перорального, трансдермального, сублінгвального і т.ін.), з використанням відповідних матриць носіїв (наприклад, крохмаль, полісахариди, масла, ліпосоми, смоли і т.ін.).

Доза вакцини, яка вводиться тварині, буде залежати від таких факторів, як вік або стать тварини, а також спосіб введення. У всіх випадках, треба забезпечити введення достатньої кількості живої авірулентної некапсульованої *Actinobacillus pleuropneumoniae* для викликання у вакцинованої тварини імуногенної реакції. Вдалі результати було одержано при 2 імунізаціях по 10 колонієутворюючих одиниць, проведених через інтервал часу від 2 до 3 тижнів.

Хоч даний винахід було описано на, прикладі варіантів втілення, яким надається перевага, фахівцям у цій галузі зрозуміло, що винахід може бути використаний з певними модифікаціями у межах духу та обсягу формули, що додається.



ФІГ. 1



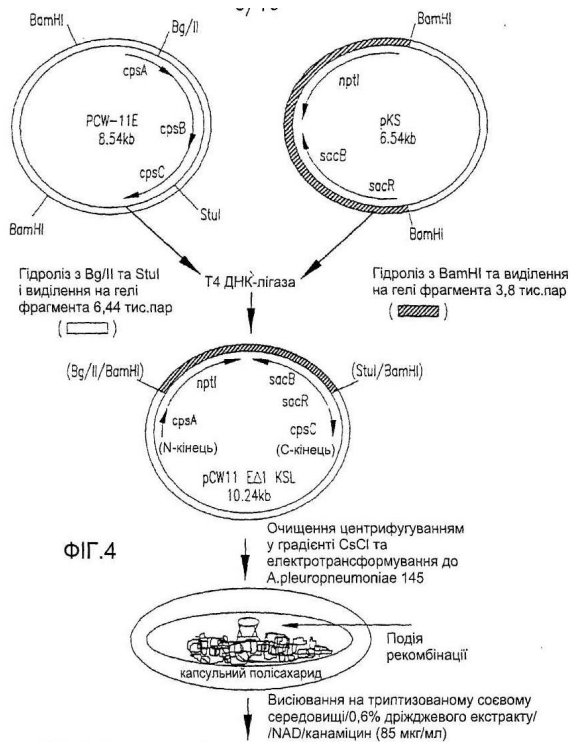
ФІГ. 2

AAGCTTCAGCAGCCAGCCAACTAGCAGCCAGCCCAAGCAAGGAGTAATCTAGTTTGATGAGTTTCATCTAATTTCTCTCAATATATAGCAATACAC
 105
 TATATAGGTATGCTTAAATCCACATAAACATTGATTTTAAATAGTTACCTAATCAGAGAAATTAATATAGCAAAATTAACAAATTAATATGATTT
 210
 TTTTAAAAAGTAATCAGAGCGCGGTATACAGATAAACATAATATTAAGCCATAAATACCGAGTTTCCCTAGTAGTTGATAAATTTCTCA
 315
 TTTATATTATCAAAATCCGATCAAAATTTATCACTATAGGTAACCTATACCTATTCATTCAGGATTTTAAATGCTAGCAATAGCTGCT
 420
 CCTATAATATCATGTAATGCTAGAGATTCAAGTGCGCATTTAGTCTTATTTAGMATTTTACTGATTTGGTCCATGAATTCACATATGTC
 525
 P I I N H V W S R D I O S G I F S S I L E Y F T D F G S W E F Q H I V
 AGTGTATCTCCATACCTCGAGCTAAAGTTTATCACTATACCGTCCACACCTAGAGAAAATTAATACCTAATTCGTGTACAGCATCATGACCTCAT
 630
 S V S P I P E A K V Y H Y R R P H L E E K L P N S Y C T V N H O L N
 GATCCAGATCTTGGCATGATAGTATGATCTAGATATGAGAGCTGGGCGTATAATTTGTTAAATACACTCAAAAAGATTTTATATCTCAG
 735
 D P D P W H A K Y R F I P R Y W E A G A I C L N Y T O K E I L I S Q
 GGACTCCGACATAGTATTTGATCTCCAGGATATATCAAAATGATATTTCTTAGAAATTAAGAAATATCAAGTACAGATAAATACCTTA
 840
 G L P E H K L E Y I P H G Y W Q K V L F P K K I K E I S S T O X I T L
 GGAATGCTCCAGGATATGATAGAGATAAAGGAGTACATATTTATGATTAGCAAAAAGATTAATCCAGACCATTTTAAATTTATTTTGGT
 945
 G I A S R R Y G R R V K C D A Y L F E L A K R L N P D H F K F I F V G
 AAAGTACAGCATATAGCTCTAGAAATCCAGATCTAGGATTTGAGCTCAGTATATCAAGATTCGATACATATGTTCAAGCTTTTATATATAT
 1050
 K R Q Y S A L E W Q B L G F E A Q V Y E R L P Y R W F Q S F Y N N I
 GATGTACTATGCTAGTACTAGAGGCTGGAGCTGCATATCCGCCAGCATAGCTACTGGACACCTATATTTCACTACATAGCTATAGT
 1155
 D Y L L W C S S H E G G P A N I P E A L A T C T P I F S S W I G I P K
 CATGTGTTATATATAGAGTGGGTGATCTAACCTTAGATCCAGATATAGATCTGACACATTAATTTATTCCTCTCAAAAACCAATATATTTGA
 1260
 D V V I N Y K N G L I L T L D P D I D A E Q I N F I C L E K P N I F E
 ATATATAGATTTTCACTAAGACGCTCCAGCTTAGCAATTTCTGGCAGAAATGATTCACAAAATATTTAGTTATAAAAATATAGGGTAA
 1365
 N I L D F S L K O S P S L A I S W E X C I O O H I L V Y K K I K G
 TATGCTCATTTCTATCTAGTACTGATCTTACACATTAACAAATCTTACTTCTCTCAGTGGATTGAGAAAATAAATATATCCATTTG
 1470
 CpsB →
 W S I S I L Y P D S L H I N K R N F S S F F S W I E K K I N I H T
 AAAATATATAGAGTGGATTTATATAGGTTTTCATATAGGTTTACGATCAAAATCGGTATCTATATGAGAAAATAGATATCTTACTAGATTGAGAGCAGGAT
 1575
 E N H N K D W I S L Y G F Y D S K L G I L Y E K I D I L T I E E E

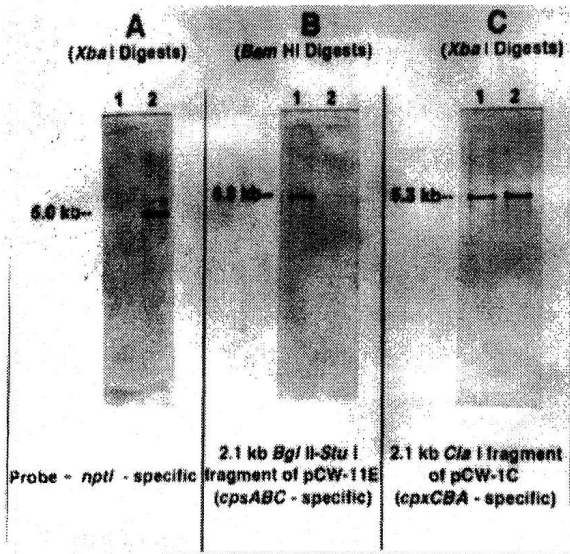
Фиг.3А

TATTCCTTTTGTGTATGATCAAAATATTTCAATATTTGTAGAGCTGAATATATCTTTAGTAGCCAGAGCCGAAATGATATGAAGATATCTCA
 1680
 L E A T C Y Y D L N I F K I C R A E L L S L Y A T R P E W Y N E D Y P
 ATACTTAAGAGAAATACAAAACTCTATACATATAGAGTAAATATGCAAAACAGCTGCTCTGCTGATGGTGGATTTCTGGAAAAACGCC
 1785
 K K L E I Y K K L Y T N H R S E L L Q N W A A A Y W Y D F W K R
 TATCTGATTAAGACATTTCTCATTTGTGTATTTTACAGAGGTTTAAATATCAAAATCTTTCATGAGTATTAATAATATCTCAACTAAAGTATG
 1890
 L S L K O F S H C C V F S G G L I Y O E S L I E L L N Y T P I K Y W
 TATGGAACCTCTATTACAGGAAGCAATATATGAGGAGCTTATTCATCAATGCTAATATAGCGATTAACATTAAGCTATTTTAACTCTATA
 1995
 Y W E S L F T G N E Y Y C E E R Y S S I A N N S D I K H L A I F H S Y
 AAAAAATTAAGTATGATATGATAGAGCAATGAGCTATTAATAGTTCTCTATTAATCAAAAATAGATGCTCCACAACTACTGATCTG
 2100
 K K T F S S N S E Y D K E R N K A I N K G I L W K H W Y D Q P I O S
 AAATATGATTTTAAACAAAAACAAATATAGTATTTGAGCAGCTGATTAATGTTTTTCAGCTCAGATATTAAGGAGAGCTATACAGATTA
 2205
 F I L V F K O Q K P I I T I I G Q V I N D F S V L E Y K G R G L S I I
 AAATCTAATAAGACTATATCTAACTATCAGAGATGATTAATGATTAATAACTCAGCTTGGCAGAGAAAAATATATCGGTACATCTTAA
 2310
 K I Y E L I S K L S E N G F N V V L K T H P W E E K K N I R T S L
 CTAATAATATAGAGGATTTCTAAAAATCTAAGTACAGATCAACAGATGATTAATAATAGTTTCATCACTATCAATAAGAAATATTTAAACATCTG
 2415
 I X N I I E E F L K N L T E N Q O E C I R I V D H Y S I K K I F K O S
 ATTTATATAGTTTAAATCTCAGCGCTCTTCAAGCTGATTTGATGATTAATAAACTATACAGTATAGTATGCTTTTATGSAAAAAGGATTCAGCT
 2520
 D F I I S L N S Q G L E A A F D G I K P I O L G H A F Y C K K G F T
 AGGATATGACTTTTATGATATGATCAATGGTAAATGACTAGTAAATAAAGTAACTACTCCAACACTATCTTACAGAGGTTTGATTTGTTGAGAGTTCA
 2625
 Y O Y D F L D I D O L V N D L Y N K L T P T L S L E E F D I F E E F
 TTAGCTATATATCAAAAGCATGCTGTTCTATCAGCGCTCTGGCGTAGGTGTTTATCTAGATATTTAATTAACCTACTATATACCATAGTACGAAATG
 2730
 I T I L I Q X H A Y S I H A S G Y S V L S R I F H L P T I I P L V E N
 TCCCTAGCAGAGCTAAACACATACCTACTCAAAAAGTGGTAAAAAGCAAAATACACATTTGTTAATGTTGCTGATAGCTAAAGTATGCTAC
 2835
 Y P K E K S V T T L P I O X D V Y K K E W T T I V N N V E I P K V Y P
 AAAGTATAGAGAGAAATATCAAAATAGAAACATCTCCGCAATCTTTGCGATCTAGGATCCAGTATTAAGAGTTTATGATTTTCCCTT
 2940
 Q S D K N R K Y O K F R N N P R Q F F A D S R N P Y I R S L W Y F F P
 ATAAATATAGCTCAATATATGTAATAAATACAGCTTTGATTTAGCAAAATATAGAGGCCACTCTAGTATGCTAGTACTTTTATCTCTCA
 3045
 Y K CpsC → W L K Y Q P I G U R K I A E G H S S N A K L V L H S I
 GGCCCTGATATAGCTCAAAATCTCTAGTTTTCCTTCAAGAGTACACATTAATAGAAAACTTTATGCAACATTTACTGATATAGAGCAGCAGCA
 3150
 A C N I D A K I S K F F C S Q D D I N L E N F I A T F T D N Y K A P E
 AGTATATAGCGGATTTTAAAGATTTGTTATACACCTAGACACCTAAGCTACAGAT
 3212
 Y Y T A I L K N C C I T P R A P K L P R

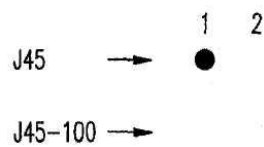
Фиг.3В



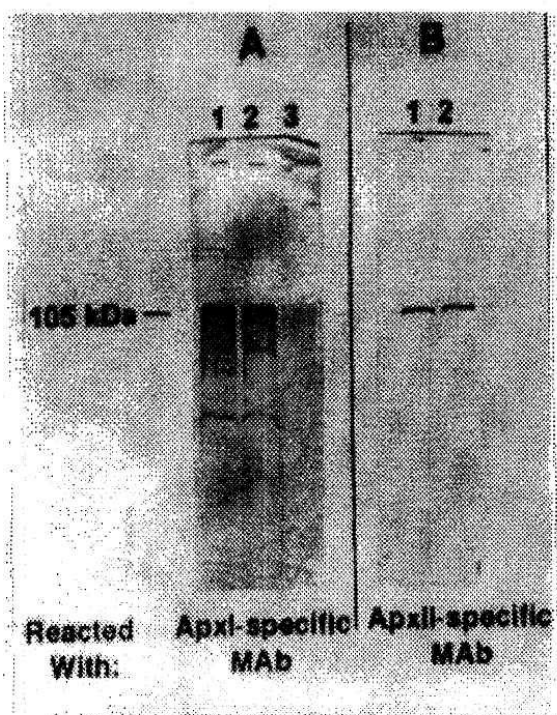
- Відбір Кап⁺-трансформантів за ознаками:
- 1) відсутність продукування капсульного полісахариду (імуноблотування)
 - 2) наявність маркерів nptI та sac-RB (саузерн-блотування)
 - 3) відсутність фрагмента ДНК 2,1 тис.пар BglII/StuI (саузерн-блотування)
 - 4) відсутність послідовностей вектора pGEM-3Z (саузерн-блотування)



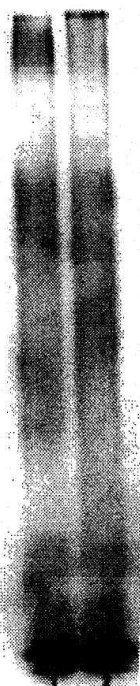
ФІГ. 5



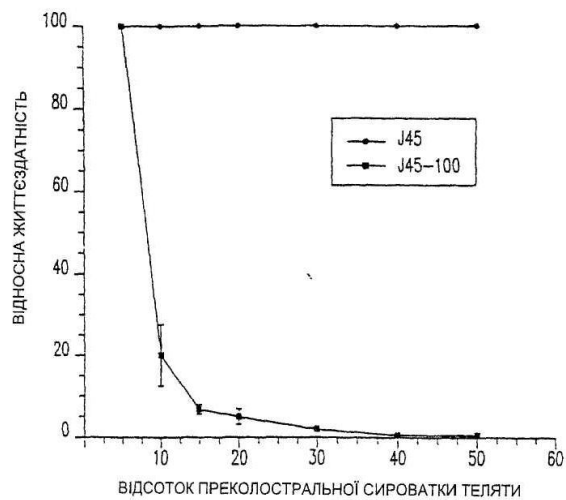
ФІГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



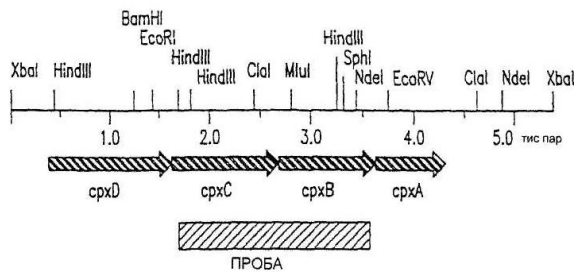
ФІГ.9

CTAGACATTACATGATTATATAGGACGAGTCATTATGCTAGACATTAATACTCCTGAAATACGAATACGTTATGGAGTTACCTA
 90
 GATAGTTGATAAATTTTCATCGGAATTCATAAATAATGAGAAATTCATCACTATCTAGGGGAACTCCGATTTTATATGGCT
 180
 TTAATTAATATGTTTATCTGTATAACCCCTCTTGATTACTTTTTTAAAAAAAATACATTTTAAATTGTTTGAATTTCTTA
 270
 TATTAAATTCCTCTGATTAGTAACCTTATTAATCAATCTTATGCGATTTTAAGACATACCTATATAGTTGTTATTCCTTAATATA
 360
 TTGAAGAGAAATAGATGAACCTCATCAACTTAGATTACTCCTTTCTTGGGGCTGGTGTAGTTTGGCTGCCCTCAACCTTACCC
 450
 CpxD → WKLIKLRLLLSGLVASLAAYCSSLP
 ACTTCAGGCCCTAGCCATAGTGGGATTTTAGAGGTAATCCAGAACTCAGATAAACCTTTACCGGAAGTTAATTAGTGGAGTTAGAT
 540
 TSGPSSHSAILEANSONSDKPLPEVWLVELD
 AATGGCTTAGTTCAGCAGTTGTATCAGACTCAGCAAGTCAGCAATTTCCGGCTTTTAGGCACGGCTGGCGGTGCTGATAGCCGT
 630
 NGLVQQLYQTQQSQQFSGLGTAGGAGYAG
 GCGGTCAATGTGGGGATGTTCTGAAATTCATTTGGGAGCGCCACGGCAGTGTGTTGGCGGTACTTTAGTCTGACGGCAA
 720
 AVNVCDDVLEISIEWEAPPVLFGGTFSSEGG
 GGTAGCGGCAATTACCGCAATACCGGCCAATGTTAACCAAAACGGTACGGTACTGTGCCGTTTGGGTGATATGCTGTGTCA
 810
 GSGH!TQLPAQWYNQNGTVTVPFFVGNIRVA
 CGTAAACACCGGAGCGGATCAGTCTCAATTTGGGGATTCGACGTAAGCGGAATCAGCCACAGTATTAGTAAAAATGGCAAT
 900
 GKTPREALDSQIVGALQQRKANQPVLVKIAN
 AATACTCTGGGATGTACGGTTATTCGTCAGGGTAACAGTATTCGTATGCCGCTGAGTGGCAATACGACGTTGTGTAGATGCTGT
 990
 NNSADVTIVIRQGNIRWPLSANNNERVLOAV
 GCAGCAGTAGCGGTACACGTAATATTGAAGAGCTTACCGTAATTAATCTCGTGGCTCCCAAGTCAAAACATTAGCGTTTGAACCT
 1080
 AAYGTTENIEDVTVKLTRGSQVKTLLAFET
 CTAATTCGATCCGGCGCAAAATATATGATCGTCCGGCGATGCTGTTCTGCTAAACAGCCTTATAGCTTACCGGTTAGGT
 1170
 LISDPAQNIWLRAGDVSLLNTPTYSFTGLG
 CGCGTGGTAAACACGCAATGAATCTCAAGTAAGGAATTACGCTTCCGAGCTATCGTAAGATGGGTGGCTAATTGATCT
 1260
 AYGHNQQWKFSKGITLAEAIKMGGLIDT
 CGTTCGATCCGAGAGGGGATTCGCTTCCGTCATGTGCCTTTTCTCAATTAAGTTAGATCAGCAACACATGGAGCGAAGCGC
 1350
 RSDPRGVFVFRHVFFSOLSLDQOTQWCAKG
 TATGGTATGGTATGATGATACCGAGGTTATCGTGTGAATTAATCTGAGCGGCAATCACTGTTTATTACACGCTTCCGATGCAA
 1440
 YGWMGWDPVTYRVNLLLEPQSLFLLQRFPMQ
 GATAAGATATGCTATGATCAATGACCGTGTCCGAATCCAAAAATCTGAGAATGATTTCTCGATTAATTCGCGGTTTACA
 1530
 DKDIVVYSNAPLSEFQKFLRWIFSITSPVI

ФІГ.10A

AGTACGACTAATGCTATTCTGCTTATTAATATGATTAATGAAGCAAAATATGGAACACTATTACGGCAAGTCGGACAGAAAA 1620
 S T T H A I R A Y . CpxC → M E T T I T A S P T E K
 ACTACAAAACCGGTAAACAGAAAAAGTTGGTAAAAAGCTTAATCCGTTATTTGGGTAACTGTAGCGATTCCTACGGTATTATC 1710
 L Q K P V K Q K S W L K K L N P I F W V I V A I P T V L S
 AGCCTTTTATTCGGTCTGTCTTCCGATATTATTTCCGAATCAGCTTCGTTGAAGATCTCCTCAAAATCAGACCGCTTAAAC 1800
 A F Y F G S V A S D I Y I S E S S F V V R S P Q N Q T A L T
 CGGTGCTCGTCCCTATTACAGGTCCGGATTTCTCGAGCTCAAGATGATCTATTACCGTACAGATATATGCTTCTCTACGGC 1890
 G V G A L L Q G S G F S R A Q D D T Y T V Q E Y W H S R T A
 ACTAGACAGTAAATGAAGACTTCCCATACGTGATCTATGAGATCAAGCCGATATTACGCTCGCTTAAATGGAATGCTTTAA 1980
 L E Q L M K D . P I R E Y Y E A Q G D . I A R F N G F G L N
 TAAATGATAAAGCGCTTTTATAAATATTCCGAGATCCCTTAAGTGTGGACTTTGACTCTGTTCCGGTATCCGCAAGCTTACGTATTCG 2070
 N S K E A F Y K Y F R D R L S V D F D S V S G I A S L R I R
 AGCATTAAACGGGAGAGGGGACACAAATTAATCAAAATTAATCTCCGAGCTGAAGCGCTTAATACGCTTAAACGAGCTGCAAG 2160
 A F N A E E G C Q I N O K . L A E G E T . I N P L N E P A R
 AAAAGATACATTTCATTGCGGACAAACCGGTACAGAGCGGAAATATGTAACGAACCGGAATCGTTAAGTAATACCGTAT 2250
 K D T I S F A E Q A V T E A E N W V N E T A N A L S K Y R I
 CAAAAAATAATCTTTGATTACGGGCAATCCGGCTACACCTTTCATTAATTTCCAGCTAAAAAGCGAATTGCTGCTGTAAGAAC 2340
 K N K I F D L P A Q S G V Q L S L ! S S ! K S E L I R V E T
 ACAATGGCTCAATTGCAATTAATACCGGACACCCACAGGTGATGCTTATCCGCCAAAAAGTTTACGTAAAGGAATCGA 2430
 Q L A Q L Q S ! T P D N P Q V D A L L W R O K S L R K E ! D
 TGAGCAATCAAAACAGCTTTCCAGTACAGTAATAGCTTATGCTATTCAACTGCCGATTACACCGCTTAGTACTTGCAGACGAGCT 2520
 E Q S K Q L S S N S N S S I A I Q T A D Y Q R L V L A H E L
 GGCACAGCAATTAACCGGACGATTAACCTGATTACAAATACGAAATGAGCGGATCCGACGACCTTATTAAGTAATCAG 2610
 A Q Q Q L T A A L T S ! Q N T K N E A D R Q Q L Y L E V I
 TCAGCCAGCAACCGGACTGGCGGAGAGCCCTATCCCTATATATATTAGCGACATCTTATCGGCTGATGCTTATGCTGT 2700
 Q P S K P D W A E E P Y R L Y N I L A T F F I G L W L Y G V
 ATTAAGTTATTAATGCAAGCGTAAGAGAGCAGCAAACTAATGCAATACGGTATCAACACACTTCCGCCAATCTCTCGCCATTCAA 2790
 L S L . ! A S V R E H X N .
 CpxB → W Q Y C D Q I T F R O S L A I Q
 GGGAGAGTAATCGGTGCATTACTCATCGCGGAATATATACCGGTACGGACGAAAAATTTGGGTTTTATGCGCTTTTGTGTGAGCCG 2880
 G R V I G A L L W R E I I T R Y G R K N I G L W L F V E P
 CTATTACTCACTTATTATCGTTTGTGAGTAATTTCCGAGCGGATCGCGTTCCGATTAAATATTATGCTTTTGTGATTACC 2970
 L L L T L F I V L W W K F I R A D R V S D L N I A F V I I
 GGTATCCATGCCATGATGCGCTATCGCTCAACCCGACTATCGTGCAATTCCGGTAAGTCTCTTATCATCGTAAT 3060
 G Y P W A W W R N A S N R T I G A I S G N L S L L Y H R N
 GTTCGGCTATTAGATCCTACTGCGCTGTCATCTTGAGTAGCAGGTGCAACGATTGCCAAATCATTATATGCAATAGTCATT 3150
 Y R V L D T L L A R V I L E V A G A T I A Q I I I M A L V I

Фиг.10В



Фиг.11