



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 121**

51 Int. Cl.:
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06779250 .7**

96 Fecha de presentación : **31.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041164**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Ensayos de fosfato inorgánico mejorados.**

30 Prioridad: **01.09.2005 GB 0517855**
04.05.2006 GB 0608839

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2011

73 Titular/es: **THE MEDICAL RESEARCH COUNCIL**
20 Park Crescent
London W1N 4AL, GB

72 Inventor/es: **Corrie, John, Edgar, Thomas;**
Webb, Martin, Ronald y
Okoh, Michael, Prince

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 361 121 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayos de fosfato inorgánico mejorados

Todos los documentos mencionados en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a ensayos para fosfato inorgánico, en particular la detección y cuantificación de fosfato inorgánico en soluciones biológicas. Más particularmente, la presente invención se refiere a una proteína de unión a fosfato modificada, y al uso de tal proteína en un ensayo de fosfato.

Antecedentes de la técnica

- 10 El fosfato inorgánico (Pi) está involucrado en una gran cantidad de procesos biológicos y es conveniente poder medir la concentración de Pi y los cambios de tal concentración en los sistemas biológicos. Los ensayos de fosfato, que miden la concentración de Pi, son útiles en numerosos procedimientos diagnósticos, así como en la investigación en el funcionamiento de los sistemas biológicos.

- 15 Los ensayos de fosfato enzimático se basan en una enzima que requiere fosfato, a menudo una fosforilasa. La referencia 1 describe un procedimiento en el cual se usa una purina-nucleósido fosforilasa para convertir un nucleósido (inosina) a ribosa-1-fosfato y una base, en este caso, hipoxantina. La hipoxantina se convierte posteriormente en un agente de color, de la cual se puede determinar el grado de conversión a inosina, que es dependiente de la concentración de Pi.

- 20 Los ensayos de fosfato enzimático tienden a ser relativamente insensibles. Por ejemplo, la referencia 2 describe un procedimiento que no se puede usar por debajo de las concentraciones de Pi de 2 μ M. Además, aunque más rápidos que los ensayos químicos de fosfatos, los ensayos enzimáticos de fosfato son generalmente demasiado lentos para permitir el estudio de la cinética de muchos sistemas biológicos en tiempo real.

- 25 Un número de sistemas de ensayo de fosfato es conocido en la técnica. Por ejemplo, los kits de Detección de Fosfato con Verde de Malaquita (MGPD) son útiles para detección cuantitativa de Pi. El kit de ensayo de fosfato Quantichrom (BioAssay Systems) es uno de dichos kit MGPD. Sin embargo, el ensayo usado es muy lento y requiere la incubación para obtener el desarrollo de color. Además, los kits MGPD generalmente son útiles solo en concentraciones altas de fosfato (aproximadamente 0,3 mM – 50 mM).

- El kit de ensayo de fosfato EnzChek de Invitrogen (Molecular Probes) tiene un intervalo de detección de la concentración de fosfato de 2 μ M – 150 μ M y un intervalo de pH de trabajo de 6,5 - 8,5 (tomado de la hoja de datos). Nuevamente, esta prueba es inadecuada para la detección de concentración de fosfato baja.

- 30 Se conoce un número de proteínas que se unen específicamente al Pi. Por ejemplo, el transporte de Pi dentro y fuera de las células y organelas se realiza con proteínas de transporte específicas. En las células bacterianas, esto se logra por medio de un sistema de transporte de afinidad alta dependiente de una proteína de unión a fosfato. Tales proteínas son capaces de reconocer específicamente el fosfato inorgánico, se unen a este y lo transportan a través de las membranas celulares o entre los compartimientos celulares.

- 35 Un ejemplo de tal proteína es la proteína de unión a fosfato (PBP) de *E. coli* que está codificada por el gen *phoS* de *E. coli*. Esta proteína se localiza en el periplasma de *E. coli* como parte del sistema de depuración de Pi de la bacteria, que opera en condiciones de privación de Pi, y su afinidad de unión por Pi es muy alta. El gen de *phoS* se ha clonado y secuenciado [3,4]. Más aún, se ha determinado que PBP se une estrechamente al Pi, y la estructura cristalina de la forma unida a Pi se ha resuelto con alta resolución [5], ya que tiene la estructura de la forma libre de Pi [6]. Estos estudios han demostrado que PBP es una proteína monomérica de 35 kD separada en dos dominios, con una hendidura de unión a Pi entre ellos. La hendidura de unión a Pi se mueve entre las posiciones abierta y cerrada en la unión al Pi.

- 45 La referencia 7 describe la modificación de la PBP para introducir una marca de cumarina en el borde de la hendidura de unión al Pi. El cambio conformacional en la hendidura de unión que ocurre después de la unión al fosfato se traduce en un aumento de la fluorescencia de la marca de cumarina. Sin embargo, la universalidad del fosfato en los sistemas biológicos y el deseo de controlar la cinética de procesos biológicos y químicos que involucran el consumo o producción de Pi hace que el desarrollo de ensayos de fosfato adicionales y mejorados sea importante.

Divulgación de la invención

- 50 La invención se basa en el descubrimiento de que, por la unión de marcas múltiples a la PBP, se pueden obtener mejoras en los cambios detectables que ocurren después la unión del Pi. Los fluoróforos tales como rodaminas se pueden apilar, sea con ellos mismo (en tal caso el apilamiento se denomina como dimerización) o con otra molécula aromática, para formar un complejo con diferentes propiedades ópticas de las de las moléculas no apiladas. Se ha hallado que la unión de Pi a la PBP puede producir cambios en el apilamiento de cromóforos ubicados

apropiadamente, de este modo producen un cambio detectable. Más aún, se ha hallado de modo sorprendente que las marcas unidas a las regiones de la PBP que están distantes de la hendidura de unión a Pi aun pueden dar cambios detectables cuando el Pi se une a la proteína, de este modo permiten que las marcas se fijen con mínima interferencia a la unión a Pi.

5 En consecuencia la invención proporciona una proteína de unión a fosfato que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión del fosfato, en la que la proteína porta una primera marca y una segunda marca, y en la que la primera y segunda marcas se disponen de modo de exhibir apilamiento molecular. Este apilamiento se altera con el cambio de conformación en la unión al Pi. La alteración del apilamiento origina un cambio detectable, que indica un cambio en el estado de la unión a Pi.

10 Preferentemente el cambio es tal que la primera y segunda marcas pueden presentar apilamiento molecular (a) en la conformación inicial pero no en la conformación final, o (b) en la conformación final pero no en la conformación inicial.

El uso de dos marcas contrasta con la referencia 28, que describe específicamente que se debe evitar la marcación de múltiples sitios cuando se fijan los fluoróforos a las PBP. La referencia 25 también se refiere a que la marcación doble lleva a una disminución de la señal cuando se usa un fluoróforo solo.

15 La invención también proporciona una proteína de unión a fosfato que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión del fosfato, en la que la unión del fosfato ocurre en un sitio de unión, y en que la proteína porta una marca que se fija a una región de la proteína distante del sitio de unión. La marca puede dar una primera señal detectable en la conformación inicial y una segunda señal detectable en la conformación final, en la que dicha primera y segunda señales detectables son diferentes entre sí.

20 La invención también proporciona una proteína de unión a fosfato que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión del fosfato, en el que la proteína porta una marca de rodamina. La marca de rodamina puede dar una primera señal detectable en la conformación inicial y una segunda señal detectable en la conformación final, en la que dichas primera y segunda señales detectables son diferentes entre sí.

25 La invención también proporciona una proteína de unión a fosfato que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión del fosfato, en la que la proteína porta una o más marcas, y en la que la/las marca(s) está/están fijadas por medio de un centro no quiral.

30 En comparación con las PBS marcadas con cumarina de la referencia 7, las PBP de la invención muestran una capacidad de unión evidente para Pi. En particular, ellas muestran un cambio de señal lineal hasta la máxima capacidad de unión para el Pi.

La proteína de unión a fosfato (PBP)

35 La invención utiliza una 'proteína de unión a fosfato', que es el nombre comúnmente dado al receptor de fosfato primario del sistema de transporte de ABC hallado en las bacterias, también conocido como receptor de unión de fosfato periplásmico. Las PBPs también están presentes en los eucariotas [8]. Las PBP son parte del sistema de transferencia de fosfato activo y se unen de modo reversible y liberan Pi. Estas son miembros de la superfamilia de proteínas de los receptores de unión al soluto extracelular [9] y consisten dos dominios ligados por una región bisagra [10]. El sitio de unión al fosfato se ubica en la interfaz entre los dos dominios. Las proteínas normalmente adoptan dos conformaciones: una forma abierta libre de fosfato y una forma cerrada unida a fosfato, que se interconvierte por medio de un mecanismo de flexión de la bisagra después de la unión del fosfato. La PBP nativa se forma después de la escisión de un precursor, y las PBP pueden ser lipoproteínas. Las PBPs son resistentes a la desnaturalización y se unen a Pi en forma específica y estrecha.

45 Se han descrito PBP en un número de bacterias y mamíferos, y la invención puede usar cualquiera de estas. Una secuencia de alineamiento de numerosas PBP de diferentes organismos se muestra en la Figura 7. Cualquiera de estas PBP o PBP similares se pueden usar en la presente invención.

50 Los receptores de fosfato primarios del sistema de transporte ABC de las bacterias gramnegativas son proteínas de unión periplásmica. Las proteínas de unión periplásmica forman una de las familias de proteínas más grandes en los genomas de eubacterias y arqueobacterias y se considera que derivan de un ancestro común basado en la semejanza de la estructura tridimensional, el mecanismo de unión del ligando y la estructura del operón del gen. Las proteínas de unión periplásmica comparten rasgos comunes de la estructura tridimensional y patrones de unión del ligando a pesar de la gran variación de longitud y baja identidad de secuencia. Las proteínas de unión periplásmica consisten en dos dominios globulares de principalmente tipo α/β . El ligando se une en una hendidura entre los dos dominios y es absorbido por ambos. Un movimiento de flexión de la bisagra entre los dos dominios se acompaña con la unión al ligando [10]. Preferentemente, los receptores de fosfato usados en la presente invención tienen estas tres características.

55 Los genes para el sistema de transporte de ABC también se han descubierto en las bacterias sin un espacio

periplásmico, tales como Micobacterias grampositivas [11]. Los receptores de fosfato primarios de las Micobacterias y otras bacterias grampositivas tienen una ligadura para sujetarlos a la membrana y tienen una función similar a los receptores de fosfato primarios periplásmicos. La función de las proteínas similares en los mamíferos es desconocida.

- 5 Las proteínas de unión periplásmica se clasifican como de tipo I o de tipo II sobre la base de la disposición topológica de las hojas β centrales en su estructura nuclear [12]. Preferentemente las PBP de la presente invención son de Tipo II en el que la topología de la hoja de ambos dominios proteicos adopta la forma de $\beta_2\beta_1\beta_3\beta_n\beta_4$ donde β_n representa la cadena justo después del primer cruce del dominio N-terminal al dominio C-terminal, y viceversa.

- 10 La invención también puede usar precursores, mutantes, y variantes de estas PBP, con la condición de que se retenga la función esencial de la unión del fosfato con su cambio de conformación asociado. Las PBP mutantes que retienen la unión de fosfato se han descrito en la técnica, y estas mutantes se pueden usar con la invención. Para la proteína de *E. coli*, por ejemplo: la referencia 13 desvela una PBP mutante con Asp-137 reemplazado por Asn, Gly o Thr, con poco efecto sobre la afinidad del fosfato; las referencias 14 y 15 desvelan una mutante Thr-141-Asp, con el propósito de cambiar la afinidad del fosfato; las referencias 7, 27, 28 y 29 desvelan una mutante Ala-197-Cys de la PBP de *E. coli*; la referencia 16 desvela una mutante Ala-197-Trp; la referencia 14 desvela una mutante Asp-56-Asn, etc. Se prefiere al uso de las mutantes, debido a que las uniones de las marcas a la proteína requerirán con frecuencia que introducir un residuo de aminoácido adecuado (por ejemplo, un residuo de Cys) en una posición deseada de la estructura.

- 20 Debido a su papel en la captación de fosfato, la expresión de las PBP está reprimida por el Pi en las condiciones normales, pero está inducida en condiciones de limitación de Pi. En consecuencia PBP algunas veces se denomina como la 'proteína de unión a fosfato reprimible por fosfato'. Su nomenclatura génica es normalmente *PstS* (de 'Transporte específico de Pi') o *PhoS*, pero la proteína también se ha denominado como *nmpA*, *phoR2*, *R2pho* y *phoR2a*. En *Mycobacterium tuberculosis* la proteína se ha denominado como 'antígeno de la proteína B' (PAB).

- 25 Las PBP nativa se unen a Pi monobásico y dibásico, pero se puede usar la mutagénesis para dar especificidad. Por ejemplo, la referencia 15 describe cómo la secuencia de *E. coli* fue mutada en el sitio de unión del ligando a fin de restringir la unión solo al ion monobásico.

Una proteína particularmente preferida para usar en la invención es la proteína PhoS de *E. coli*, ya que se ha estudiado exhaustivamente. La secuencia de la PhoS de *E. coli* nativa es de la siguiente manera (acceso de PDB P06128; SEQ ID NO: 1 de la presente):

**MKVMRTTVATVVAATLSMSAFSVFAEASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQ
GIGSSGGVKQIIANTVDFGASDAPLSDEKLAQEGLFQFPPTVIGGVVLAVNIPGLKSGEL**

**VLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAKLNPLGLKLPSONIAVRRADGSGTFSVFVTSYLAKV
NEEWKNNVGTGSTVKWPIGLGGKNDGIAAFVQRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLIS
ADGKPVSPTEENFANAAGADWSKTFADLTNQGKEDAWPITSTTFILIHKDQKKPEQG
TEVLKFFDWAYKTGAKQANDLDYASLPDSVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY**

- 30 Este 346-mer es un precursor para la proteína madura, que se forma por la escisión de 25 residuos N-terminales (subrayado). La invención preferentemente usa una proteína madura.

Para la unión covalente de las marcas, una forma de PhoS de *E. coli* es de la siguiente manera, en la cual Asn 226 y Ser 299 han mutado a Cys (SEQ ID NO: 2):

**EASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQIIANTVDFGASDAPL
SDEKLAQEGLFQFPPTVIGGVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAK
LNPLGLKLPSONIAVRRADGSGTFSVFVTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWPIGLGGKGN
DIAAFVQRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFACAAGADWSKT
FAQDLTNQGKEDAWPITSTTFILIHKDQKKPEQGTEVLKFFDWAYKTGAKQANDLDYAS
LPDCVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY**

- 35 En forma adicional, para la unión covalente de las marcas, una forma de PhoS de *E. coli* es de la siguiente manera, en la cual Ala 17 y Ala 197 han mutado a Cys (SEQ ID NO: 3):

EASLTGAGATFPAPVYCKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQIIANTVDFGASDAPL
 SDEKLAQEGLFQFPTVIGGVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAK
 LNPGLKLPSONIAVVRADGSGTSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWPIGLGGKGN
 DGIAAFVQRLPGAIGYVEYCYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANAAGADWSKT
 FAQDLTNQKGEDAWPITSTTFILIHKDQKKPEQGTEVLKFFDWAYKTGAKQANDLDYAS
 LPDSVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY

En forma adicional, para la unión covalente de las marcas, una forma de PhoS de *E. coli* es de la siguiente manera, en la cual Lys-229 y Glu-302 han mutado a Cys (SEQ ID NO: 4):

EASLTGAGATFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQIIANTVDFGASDAPL
 SDEKLAQEGLFQFPTVIGGVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAK
 LNPGLKLPSONIAVVRADGSGTSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVKWPIGLGGKGN
 DGIAAFVQRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANAACGADWSKT
 FAQDLTNQKGEDAWPITSTTFILIHKDQKKPEQGTEVLKFFDWAYKTGAKQANDLDYAS
 LPDSVVCQVRAAWKTNIKDSSGKPLY

5 Marcas

Las PBP de la invención portan marcas. Las marcas preferidas son las que muestran apilamiento molecular π - π , que de este modo incluirá anillos aromáticos. Estos incluyen las marcas de rodamina.

El apilamiento del colorante es una interacción no covalente entre dos cromóforos que tienen anillos aromáticos planos, y esto ocurre cuando los anillos se separan por una distancia que suficientemente corta para permitirles interactuar por ejemplo para formar dímeros o trímeros. La señal detectable de las moléculas apiladas es diferente de la de las moléculas no apiladas (por ejemplo, el apilamiento puede causar la inactivación de las señales, y de este modo los cromóforos apilados normalmente mostrarán una intensidad de señal de fluorescencia disminuida con respecto a los cromóforos no apilados individuales), y esta diferencia se puede usar para detectar la presencia o ausencia de apilamiento. Los cromóforos apilados pueden tener espectros de absorción con (i) una disminución característica del pico de absorción principal a medida que aumenta la concentración del cromóforo y (ii) un pico con hombro característico ('división de la banda' [17]).

Por ejemplo, los cromóforos de rodamina pueden formar dímeros en concentraciones altas en solución [18,19]. El dímero ($\lambda_{\text{máx}} \sim 520$ nm) tiene un espectro de absorbancia diferente del monómero ($\lambda_{\text{máx}} \sim 550$ nm), y tiene poca o ninguna fluorescencia en comparación con el monómero [20,21]. Los inventores han hallado que se puede retener esta diferencia óptica entre el monómero libre y el dímero en solución cuando dos marcas interactúan cuando se fijan a una proteína. Dos cromóforos de rodamina fijados a posiciones adecuadas en la proteína pueden formar dímeros, cuya interacción se altera cuando el ligando se une a la proteína. La invención se puede detectar espectroscópicamente la diferencia las confirmaciones libres de Pi y unidas a Pi de la PBP. Los cambios espectrales típicos que usan un par de marcas de rodamina fijadas covalentemente en las posiciones 17 y 197 de una PBP mutante se muestran en la Figura 1 (absorción) y Figura 2 (emisión). Las referencias 21, 22 y 23 dan ejemplos adicionales de cambios de fluorescencia causados por la alteración del apilamiento molecular de las rodaminas fijadas a las biomoléculas. La interacción del apilamiento utilizada por la invención es diferente del fenómeno conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). En FRET, la emisión de un primer cromóforo (dador) se usa para excitar un segundo cromóforo (aceptor) en proximidad cercana a través del espacio, de este modo se produce un cambio en las propiedades que dependen de la distancia y orientación relativa entre los dos cromóforos. El apilamiento molecular tiene lugar a través de la interacción físicas de los estados estacionarios de los dos restos, mientras que la extinción de fluorescencia ocurre a través de un fenómeno llamado acoplamiento de excitón [24].

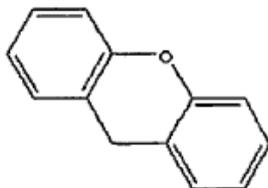
Las marcas que pueden experimentar apilamiento molecular son bien conocidas en la técnica. El apilamiento puede ocurrir entre cromóforos idénticos y también puede ocurrir entre cromóforos diferentes.

Las marcas usadas con la invención pueden dar varias señales, pero las marcas preferidas son las marcas luminiscentes. Las marcas luminiscentes incluyen las marcas fluorescentes y las marcas fosforescentes. Sin embargo, se prevé el uso de otras marcas. Por ejemplo, las marcas electroquímicas se pueden usar cuando la alteración del ambiente de las marcas dará origen a un cambio en el estado redox. Tal cambio se puede detectar por medio de un electrodo.

Se prefiere el uso de marcas fluorescentes, que se pueden excitar para fluorescer después de la exposición a ciertas

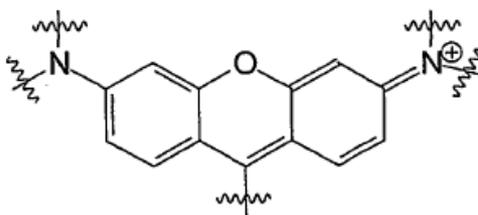
longitudes de onda. La marca fluorescente se puede seleccionar del grupo que consiste en rodaminas, cianinas, pirenos y sus derivados.

Las marcas fluorescentes preferidas se basan en un núcleo de xanteno, que puede experimentar fácilmente apilamiento π - π para formar dímeros:

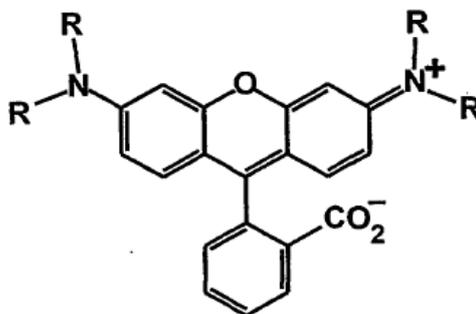


5

Tales marcas incluyen los fluoróforos de rodamina, que incluyen la siguiente estructura nuclear:



Además del xanteno y los dos grupos amino, el núcleo de rodamina generalmente incluye un anillo aromático adicional con una sustitución de ácido carboxílico, como se muestra a continuación:



10

Los ejemplos de fluoróforos de rodamina específicos que se pueden usar con la invención se muestran en la Figura 6. Las marcas de rodamina preferidas se funcionalizan para dar alta selectividad para la reacción con tioles, tales como las moléculas de haloacetamidotetrametilrodamina (XATR), aun más preferentemente moléculas de yodoacetamidotetrametilrodamina (IATR) y bromoacetamidotetrametilrodamina (BATR). Las marcas de máxima preferencia son 5-IATR y 6-IATR, que se muestran en la Figura 6.

15

Cuando las marcas tienen isómeros diferentes, se prefiere usar un solo isómero. En consecuencia, por ejemplo, cuando una marca de rodamina es capaz de existir como isómeros estructurales diferentes (por ejemplo, 5-IATR y 6-IATR), la invención preferentemente usa un isómero único de una PBP única.

20

Cuando dos marcas se unen a una PBP única, la magnitud del cambio detectable observado en la unión a Pi es preferentemente mayor que la magnitud del cambio detectable observado en la unión a Pi a una PBP con alguna de las dos marcas fijadas sin que la otra esté presente.

25

El uso de marcas apilables para detectar un cambio conformacional en una proteína no está restringido a las PBP. Por ejemplo, las marcas se pueden usar con cualquier proteína de unión periplásmica, que incluyen los que se unen a leucina, isoleucina, valina, L-arabinosa, glucosa, galactosa, D-ribosa, lactosa, purina, histidina, lisina, arginina, ornitina, glutamina, espermidina, putrescina, maltosa, D-maltodextrina o sulfato. En consecuencia, la invención proporciona más generalmente una proteína que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión de un ligando, en el que la proteína porta una primera marca y una segunda marca, y en el que la primera y segunda marcas se disponen de modo que exhiban apilamiento molecular que se altera por el cambio de la conformación. La proteína preferentemente tiene una cadena de polipéptido única y no está sujeta a escisión enzimática. También se puede usar una proteína multi-subunidad con la invención, con la condición de que las subunidades permanecen asociadas a través del cambio de la conformación.

30

La proteína es preferentemente una proteína de unión periplásmica, como se describió anteriormente.

El cambio conformacional

5 En la unión a fosfato, las PBP experimentan un cambio conformacional [5, 6, 25]. La hendidura que contiene la unión a Pi cierra el sitio, que causa un cambio en la distancia y/u orientación relativa de los dos dominios globulares de la proteína. Estas alteraciones de la estructura, desde una conformación inicial a una conformación final, aprovechan los procedimientos de la invención.

10 La invención preferentemente aprovecha el cambio conformacional por la fijación de las marcas de modo que su distancia de separación aumenta o disminuye, o de modo que ellos roten entre sí. Cuando se fijan dos marcas, se puede usar el movimiento para cambiar su capacidad para presentar apilamiento molecular, como se describió anteriormente. En consecuencia la orientación de la primera y segunda marcas cambia entre la conformación inicial y la conformación final, y preferentemente aumenta su separación.

15 Cuando el Pi se une a la PBP, el movimiento de las marcas puede producir el apilamiento, o puede alterar el apilamiento que está presente en la PBP libre de Pi. En una tercera opción, una interacción del apilamiento se reemplaza con una interacción diferente del apilamiento (por ejemplo, por medio de tres marcas, o por medio de dos marcas y una interacción del apilamiento con un aminoácido aromático en la PBP). La opción preferida es cuando el apilamiento se pierde en la unión del Pi, de modo que la extinción de la fluorescencia (por ejemplo, por dimerización) está disminuida respecto de la proteína libre de Pi. Por consiguiente, la unión de Pi a la PBP causará un aumento de la fluorescencia derivada de la marca.

Fijación de las marcas

20 Las PBP de la invención tienen marcas fijadas a ellas. La unión covalente de las marcas extrínsecas para las proteínas es bien conocida (por ejemplo, ver capítulo 8 de la referencia 26).

25 Diferentes residuos de cisteína muestran diferentes reactividades para los reactivos de marcación, que se pueden evaluar por medio de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) [25]). Para las PBP, también se puede afectar la reactividad por la presencia de Pi unido. En tales casos, se puede usar un limpiador de fosfato (ver a continuación) durante la marcación, para asegurar que la proteína esté en una conformación libre de Pi.

Las marcas se pueden unir por medio de residuos amina o carboxilo en la cadena lateral de los aminoácidos, pero se prefiere usar la unión covalente por medio de grupos tiol sobre un residuo de cisteína. Cuando más de una marca se fija a una proteína, estos se unen preferentemente para separar residuos de aminoácidos separados.

30 Si fuera apropiado, se puede usar un residuo de cisterna natural en la PBP para la unión de la marca. Como la proteína PhoS de *E. coli* no incluye ningún residuo de cisteína, estos se deben introducir artificialmente por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria. La introducción de una cisteína única en posiciones diferentes en la SEQ ID NO: 1 se ha descrito previamente, por ejemplo, en las referencias 7, 25 y 27-29.

35 Si se ha de introducir un residuo de cisteína, sea por inserción o sustitución, se deben considerar numerosos factores. Por ejemplo, la unión de Pi en la PhoS de *E. coli* involucra los aminoácidos 10, 11, 38, 56, 137, 139 y 140 (ver, Figura 3 de ref. 15). La mutagénesis debe evitar estos residuos críticos. También se debe evitar la introducción de las cadenas laterales que interferirá en el acceso a la hendidura de unión. También se debe evitar la introducción de una marca unida interferirá en la hendidura de unión. Al alejarse del sitio de unión al Pi, sin embargo, los residuos individuales específicos son menos críticos para la integridad y actividad de la PBP. Se han informado estructuras cristalinas de PBP y varias mutantes de la PBP (por ejemplo, ver la referencia 5, y las estructuras PDB 40 1A40, 1IXG, 1IXH, 1IXI, 1OIB, 1PBP, 1QUI, 1QUJ, 1QUK, 1QUL y 2ABH), que incluyen una estructura que incluye una marca fluorescente unida covalentemente [29], y estos se pueden usar para localizar residuos en lugares adecuados dentro de la estructura 3D de la proteína. Para una PBP donde no se dispone de la estructura cristalina, se pueden usar el modelado por homología y el alineamiento con las secuencias conocidas de la técnica previa para identificar residuos por mutagénesis. Los inventores han hallado que las mejores localizaciones para la mutación son 45 los de las regiones de rigidez de la estructura secundaria, tales como, regiones helicoidales, en particular para la PhoS de *E. coli*.

50 El alineamiento mostrado en 7 muestra que las PBP de diferentes organismos presentan aminoácidos conservados y no conservados. El alineamiento de la Figura 7, y otros alineamientos creados mediante PBP adicionales, se pueden usar para identificar residuos de aminoácidos candidatos para la mutagénesis. Los residuos que están menos conservados entre las proteínas son los que más probablemente toleran la mutación.

55 Cuando se introduce más de un residuo de cisteína, se aplica el mismo criterio. Si los cromóforos fijados están para interactuar, sin embargo, los residuos se deben seleccionar de modo que (a) ellos estén próximos entre sí, y (b) el cambio conformacional que ocurre en la unión a Pi afecta uno o ambos residuos para causar un cambio de la posición u orientación o ambiente electrónico de una marca fijada a este. Los aminoácidos que se separan en la unión a Pi son sitios potenciales para la fijación de la marca. Los residuos pueden estar cerca entre sí en la secuencia primaria de PBP, o pueden estar alejados, pero se pueden usar las estructuras 3D disponibles para

- 5 determinar la proximidad espacial de los cromóforos (que también tendrá estructuras conocidas) fijados a cualquier par particular de aminoácidos, tanto antes como después de la unión a Pi, lo que permite la evaluación del probable apilamiento molecular. Normalmente, los carbonos α de los dos residuos elegidos para la fijación de la marca estarán separados por entre 0,7-2,2 nm (por ejemplo 0,8-1,3 nm) en la proteína unida a Pi o libre de Pi, y por una distancia mayor en la otra forma.
- Preferentemente, los residuos elegidos para la fijación de la marca se localizan en la superficie. Tales residuos están más fácilmente accesibles para los propósitos de marcación y es menos probable alterar la estructura terciaria de la proteína cuando se marca.
- 10 Las PBP típicas tienen dos dominios globulares. Cuando se eligen dos residuos, estos pueden ser en el mismo dominio globular o pueden ser uno por dominio globular.
- 15 Por ejemplo, el análisis de la estructura cristalina de PhoS muestra que, como la hendidura entre los dominios cierra la unión de fosfato, los aminoácidos localizados en cualquier lado de la hendidura de unión a fosfato se acercan más en la estructura unida a Pi que a la estructura libre de Pi. Sin embargo, este movimiento también se transmite a los cambios estructurales en otras partes de la proteína. La bisagra consiste en dos piezas extendidas del polipéptido, localizadas en forma central en la proteína. En la unión a Pi, la hendidura se cierra sobre un lado de la bisagra para producir un movimiento oscilante de los dominios de la proteína entre sí, lo que expone una nueva 'hendidura' sobre el lado opuesto de la proteína.
- 20 En una realización de la invención, las marcas se fijan a los residuos de aminoácidos en una región de la proteína distante del sitio de unión. Preferentemente, tales residuos de aminoácidos no están involucrados en la unión a Pi (es decir, se coordinan directamente con Pi o indirectamente con otro aminoácido) o sobre la superficie de la hendidura de la unión. En forma adicional o alternativa, las marcas se fijan a los residuos de aminoácidos en los lados opuestos de la hendidura de unión.
- 25 Por medio del uso de PhoS de *E. coli*, ocho residuos de aminoácidos preferidos para la sustitución con cisteína son los numerados desde el extremo N-terminal de la PhoS PBP madura [3]: Ala-17, Ala-197, Glu-222, Asn-226, Lys-229, Glu-247, Ser-299, Glu-302. Cuando se introduce un par de residuos de cisteína, los cinco pares preferidos son: 17 & 197, 229 & 302; 247 & 299; 222 & 299; 226 & 299. Ala-17 y Ala-197 mutan a residuos de cisteína (por ejemplo SEQ ID NO: 2).
- Otros pares de unión posibles incluyen Glu-222 & Asp-298, Glu-62 & Lys-235, Asn-226 & Gly-230 y Lys-229 & Ser-299.
- 30 Los residuos de aminoácidos correspondientes en otras PBP se pueden identificar sobre la base de la homología de secuencia por ejemplo, por medio del alineamiento de la Figura 7.
- 35 Los fluoróforos raramente se unirán a un aminoácido en forma directa, sino que en cambio se unirán por medio de un ligador. La elección del ligador también pueden tener un efecto de acuerdo con la forma en que actúa la PBP marcada, ya que el tamaño, forma y flexibilidad del ligador puede cambiar la capacidad de un ligador para entrar en proximidad con otros grupos. Se ha hallado que los ligadores de haloacetamida son útiles.
- 40 Las marcas preferentemente se fijan a la PBP de una manera que no introduzca un nuevo centro quiral. En consecuencia el aducto de marca-proteína no existe en forma diastereomérica. Esto se puede lograr por el uso de ligadores tales como las haloacetamidas (preferentemente yodoacetamidas). Cuando una maleimida, previamente usada para fijarse a los fluoróforos de cumarina [7], reacciona con una cisteína, la succinimida sustituida con tio resultante puede existir como diastereoisómeros que tienen respuestas diferentes a la unión a Pi [25]. El uso de un ligador no introduce un nuevo centro quiral de este modo permite obtener una PBP marcada sustancialmente homogénea.
- 45 Después de la fijación de la marca, la proteína marcada usualmente se purificará para separarla de la marca libre y de cualquier proteína mal marcada. La proteína mal marcada puede ser proteína no marcada, porque la marca no reaccionó o proteína donde la marca se ha unido en la posición incorrecta (sea en lugar o además de la marca deseada). Durante la purificación de la proteína marcada, se puede incluir el tratamiento con un reactivo tiol, tal como β -mercaptoetanol, ditioneitol o 2-mercaptoetansulfonato de sodio ya que esto puede mejorar la respuesta de fluorescencia de la proteína.
- 50 Cuando se puede fijar más de una marca, se prefiere usar la proteína en una forma homogénea. Una forma homogénea, por ejemplo especies con marca doble puras, se puede purificar (por ejemplo, por intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba) para obtener especies con marca doble homogéneas. Las PBP marcas simples y dobles se pueden distinguir por procedimientos tales como espectrometría de masa por electroaspersión.
- Procedimientos de ensayo**
- 55 Las PBP marcadas de la invención se puede usar en ensayos para detectar fosfato inorgánico en una muestra. Estos ensayos pueden ser cualitativos o cuantitativos. La invención es particularmente útil para seguir la cinética de

5 las reacciones, debido al tiempo de reacción rápido de las PBP. Preferentemente, la PBP se usa para las mediciones de cinética en la solución a granel, tal como en las aplicaciones de flujo detenido. Los ensayos pueden ser para uso bioquímico general, o para uso diagnóstico por ejemplo para el diagnóstico de enfermedad. Por ejemplo, las mediciones de fosfato inorgánico se pueden usar en el diagnóstico de hipervitaminosis D, hipoparatiroidismo, insuficiencia renal, raquitismo y síndrome de Fanconi, así como para controlar las causas y el tratamiento de estas enfermedades.

10 Las PBP marcadas de la invención también pueden ser útiles para la identificación y el desarrollo de los fármacos contra las enfermedades asociadas con fosfato, tales como aquellas en que pueden ser útiles los inhibidores de fosfatasa. Por ejemplo, la sobre expresión de la proteína humana tipo receptor tirosina 'fosfatasa a' (PTPa) produce la activación de pp60C SRC persistente con la transformación de células concomitantes y tumorigénesis. La PTPa puede funcionar como un oncogén. Los tumores tales como carcinoma de colon humano exhiben un nivel elevado de actividad quinasa de pp60C-SRC. Los inhibidores de PTPa en consecuencia son de uso en los tratamientos de tumor. Se puede usar una prueba de alto rendimiento para analizar Pi para la identificación de compuestos guía adecuados.

15 La muestra puede ser de cualquier fuente, que incluye suero, orina, saliva, sudor, cultivo de tejido, extractos celulares, líneas celulares, alimentos, bebidas, agentes farmacéuticos y ambientales (por ejemplo, agua). Si las concentraciones de Pi en la muestra son altas, las muestras se pueden utilizar si es necesario para obtener la cuantificación precisa de los niveles de Pi.

Estos procedimientos se pueden realizar in vitro o in vivo, pero normalmente serán ensayos in vitro.

20 En consecuencia la invención proporciona un procedimiento para detectar fosfato inorgánico en una muestra, que comprende las etapas de: (i) mezclar la muestra con una PBP de la invención, y (ii) detectar un cambio en la mezcla proveniente de la interacción entre el fosfato inorgánico y la PBP. El cambio detectado en la etapa (ii) se puede referir a la concentración de fosfato inorgánico en la muestra.

La invención también proporciona una PBP de la invención, para usar en un ensayo de fosfato inorgánico.

25 Un ejemplo de ensayo puede ser medir la liberación de Pi de actomiosina en fibras musculares desmembradas o de helicasas durante la translocación a lo largo del ADN.

Un "limpiador de fosfato" [30] se puede usar para reducir los niveles umbrales de fosfato. Preferentemente, el limpiador de fosfato es un sistema enzimático para eliminar el fosfato por reacción química. Se prefiere un sistema de 7-metil guanosina (MEG) y purina nucleósido fosforilasa (PNPasa).

30 La invención también proporciona un kit que comprende una proteína de la invención y un limpiador de fosfato.

Generalidades

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional por ejemplo X + Y.

35 La palabra "sustancialmente" no excluye "por completo" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" se puede omitir de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, x 10%.

Cuando dos marcas "exhiben apilamiento molecular", esto significa que sus espectros de emisión y/o excitación son sustancialmente idénticos a los de un dímero apilado.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los espectros de absorbancia de una proteína marcada preferida de la invención (mutante Ala17Cys/Ala197Cys), y la Figura 2 muestra su espectro de fluorescencia.

La Figura 3 muestra la titulación del Pi con la misma proteína preferida.

La Figura 4 muestra la cinética de la asociación de Pi con y disociación de la misma proteína preferida.

45 La Figura 5 muestra que la Rodamina-PBP puede controlar con éxito el Pi en tiempo real.

La Figura 6 muestra las estructuras de varias rodaminas que incluyen 5-IATR y 6-IATR que son adecuadas para usar en la invención.

La Figura 7 muestra un alineamiento de secuencia de las PBP de varios organismos. Las secuencias de proteínas mostradas son las siguientes:

Myco.pstA-1; de *Mycobacterium tuberculosis* y su componente unido a membrana del transporte del fosfato.

Myco.pstA-2; de *Mycobacterium tuberculosis* también un componente de la captación del fosfato.

Myco.pstC-1; transportador de ABC de fosfato de *Mycobacterium bovis*.

Myco.pstC-2; transportador de fosfato de *Mycobacterium tuberculosis*.

5 faeobacteroides; de *Chlorobium faeobacteroides* BSI.

limicola; el nombre completo es *Chlorobium limicola* DSM 245

thermocellum; el nombre completo es *Clostridium thermocelum* ATCC 27405

Erwinia; el nombre completo es *Erwinia amilovor*

Chromohalobacter; el nombre completo es *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043

10 Burkholderia; el nombre completo es *Burkholderia cenocepacia*

Azotobacter; el nombre completo es *Azotobacter vinelandi* AvOP

Xanthomonas; el nombre completo es *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004

Salmonella; el nombre completo es *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* str. SC-B67

Bradyrhizobium; el nombre completo es *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110

15 Xilella; el nombre completo es *Xilella fastidiosa*

Bacteroides; el nombre completo es *Bacteroides fragilis*

Pseumonas; el nombre completo es *Pseudomonas aeruginosa*

Pasteurella; el nombre completo es *Pasteurela multocida*

Modos para llevar a cabo la invención

20 **Preparación de PBP mutantes**

A fin de implementar la estrategia de marcación, se decidió introducir dos tioles en la PBP de *E. coli* que se podrían marcar fácilmente con las rodaminas. Esto se obtuvo más probablemente con las cisteínas que se exponen en la superficie. Además, las cisteínas pueden estar suficientemente cerca de modo que las rodaminas puedan interactuar entre sí. La distancia entre ellas debe cambiar entre las estructuras unidas con fosfato y libres de fosfato para permitir que exista una posibilidad de un cambio en el grado de interacción.

25 La PBP tipo salvaje de *E. coli* no tiene residuos de cisteína para la unión covalente de las marcas, por eso dos tioles se introdujeron para la marcación con rodamina. Para seleccionar un par de residuos adecuado, se usaron dos estructuras cristalinas de PBP: (a) PBP marcada con MDCC con Pi unido [29]; y (b) una mutante de PBP con afinidad reducida para Pi, que permitió obtener una estructura de alta resolución de PBP libre de Pi [6]. El examen de estas estructuras permitió la elección de varios pares de aminoácidos en la superficie, no aparentemente involucrado en las interacciones de la cadena lateral y con sus carbonos α separados ~ 1 nm. Además la distancia entre estos pares fue diferente en las estructuras apo y unidas a Pi.

35 Se examinaron dos regiones diferentes de la proteína. En primer lugar, como la hendidura de unión a Pi entre los dominios globulares de PBP se cierra sobre la unión de Pi, las dos regiones superficiales, localizadas en una parte de esta hendidura, se acercan más en la estructura unida a Pi que en la forma libre de Pi. Sin embargo, el movimiento de la superficie es complejo ya que el cierre de la hendidura se produce no solo por la flexión de la bisagra sino también por una torsión de los dominios entre sí. Este movimiento también se transmite a cambios estructurales en otras partes de la proteína. La bisagra se forma por dos piezas extendidas del polipéptido, ubicadas en forma un tanto central en la proteína. Cuando la hendidura de unión a Pi se cierra sobre un lado de la bisagra, existe en esencia un movimiento oscilante de los dominios entre sí y se forma una nueva "hendidura" pequeña en el lado opuesto de la proteína. Este movimiento también proporciona aminoácidos adecuados para la fijación de la marca.

45 Se identificaron varios pares de sitios de mutación, principalmente distantes de la hendidura de unión, que no están aparentemente involucrados en las interacciones de la cadena lateral estaban separados aproximadamente 1 nm. Además, la separación de carbonos α de los residuos cambió entre las estructuras cristalinas unidas a Pi y libres de Pi y estas distancias se dan para cada par:

(a) Lys-229 y Glu-302 (1,2 y 1,7 nm).

(b) Glu-247 y Ser-299 (1,6 y 2,2 nm).

(c) Asn-226 y Ser-299 (1,1 y 1,6 nm).

(d) Glu-222 y Ser-299 (1,5 y 1,8 nm).

5 Además, se identificó Ala-17 y Ala-197 (1,6 y 1,3 nm) mutantes como adecuados para estudiar. Estas mutaciones pueden controlar el movimiento en la hendidura de unión, ya que las dos mutaciones están en los lados opuestos de la hendidura de unión.

10 Las mutaciones de cisteína se prepararon en el plásmido PSN5182 por medio del uso del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene), y posteriormente se amplificó por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los productos de PCR se transformaron en la cepa DH5a de *E. coli* (eficiencia de biblioteca, Invitrogen). El plásmido se purificó por medio del uso del kit Qiaprep (Qiagen) y se analizó por electroforesis en gel de agarosa 1%. Las secuencias del ADN del plásmido que contiene los cambios deseados se confirmaron por secuenciación de ADN (MWG-Biotech). El ADN se transformó en la cepa ANCC75 de *E. coli* para la expresión de la proteína.

15 Los genes se expresaron en *E. coli* y las proteínas se purificaron esencialmente como se describió en las referencias 25 y 31. En algunos casos se añadió 1 mM de ditiotreitól a todos los buffer desde el momento del shock osmótico mediante el buffer de almacenamiento patrón. La proteína se almacenó a -80°C en alícuotas en ~1 mM de concentración.

Marcación de PBP mutantes.

20 El tiempo exacto y las condiciones para la marcación de las mutantes de cisteína dependieron de la reactividad de la marca y de cuán expuesto estaba el tiol. Las condiciones dadas a continuación son para la marcación de la mutante A17C-A197C. Antes de la marcación, se añadió ditiotreitól fresco (a 10 mM) a la proteína (a ~1 mM) que se desalinizó posteriormente por filtración en gel en una columna PD10 (Amersham) en 10 mM de Tris-HCl desgasificado pH 7,6, 1 mM de MgCl₂.

25 La proteína se marcó en una escala de 20 mg. La siguiente solución se incubó durante 15 minutos a 20°C bajo nitrógeno en 50 mM de Tris-HCl pH 8,1 para eliminar Pi: 100 μM de PBP mutante, 200 μM de 7-metilguanósina, 0,2 unidades/ml⁻¹ de PNPasa. La proteína posteriormente se marcó por la adición de 800 μM de 6-IATR [32] (a partir de una solución patrón de ~20 mM en dimetilformamida). La solución se mezcló de un extremo al otro con protección de la luz a 22°C durante 2 horas. Se obtuvo una solución 1,6 mM en 2- mercaptoetansulfonato de sodio y se incubó durante 20 minutos. Posteriormente se filtró a través de una membrana de polisulfona de 0,2 μm. La rodamina que no estaba unida a la proteína se extrajo por filtración en gel en 100 ml de la columna P4 (Bio Rad), equilibrada en 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 a temperatura ambiente. La proteína marcada posteriormente se purificó por cromatografía de intercambio iónico a 4°C en columna de Q Sefarosa FF de 20 ml, equilibrada en 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 a 4°C, por medio del uso un gradiente de 400 ml de 0 a 200 mM de NaCl en 10 mM de Tris-HCl pH 8,0.

30 Después de la concentración por ultrafiltración a través de una membrana YM10 (Amicon), la proteína marcada se purificó también a temperatura ambiente en una columna MonoQ HR 10/10 (Amersham), equilibrada en 10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 15 mM de KCl. La proteína se eluyó a 2,5 ml min⁻¹ con un gradiente de 150 ml en 10 mM de Tris-HCl pH 8,5 de NaCl 15 mM a NaCl 30 mM. El pico correspondiente a la proteína marcada doble se concentró como antes, se diluyó con varios volúmenes de 10 mM de Tris.HCl pH 8,0, se reconcentró y posteriormente se almacenó a -80°C en alícuotas de ~1 mM.

35 Fue evidente que el coeficiente de extinción publicado para un aducto tiol de molécula pequeña de 6-IATR (52000 M⁻¹ cm⁻¹ en su punto isobéptico de 528 nm) [32] no es aplicable a Rodamina-PBP por dos razones. En primer lugar, cuando este coeficiente de extinción se usó para calcular la concentración de proteína, la capacidad de unión aparente de las titulaciones de Pi (ver más adelante) fue mayor que 100%. En segundo lugar, el punto isobéptico en el espectro de absorbancia de Rodamina-PBP se determinó por medio del uso de concentraciones diferentes de Pi y es 526 nm. En consecuencia se calculó un coeficiente de extinción de 108 mM⁻¹ cm⁻¹ a 526 nm para la proteína marcada doble, se asume 100% de capacidad de unión para Pi en tales titulaciones. El valor se basa en un promedio de 6 titulaciones. Las concentraciones de otras muestras de Rodamina-PBP se calcularon posteriormente a partir de este coeficiente de extinción.

40 La masa molecular de la proteína no marcada y marcada se determinó por espectrometría de masa por electroaspersión como se describió previamente [25]. La reactividad de los tioles de la proteína no marcada se determinó por la reacción con DTNB como se describió previamente [10].

45 Se usaron tres rodaminas selectivas para tiol en las pruebas de marcación: dos yodoacetamidas, 6-IATR y 5-IATR, y una maleimida, Rodamina Red™ MC2 (RRC2M, de Invitrogen). Fue evidente que la respuesta de la señal depende no solo de la posición de las rodaminas, sino también del grado de pureza del producto marcado doble final. Este último depende de la facilidad de la marcación, como proteína marcada en forma simple o triple tiene una rodamina no apareada y fluorescencia demasiado alta (ver más adelante), y también en la resolución obtenida durante la purificación.

Las cinco PBP con mutación doble se analizaron con 6-IATR. Los dos mutantes mejores fueron K229C-E302C (8,5 veces de aumento de fluorescencia con Pi) y A17C-A197C (18 veces de aumento) y estos se eligieron para el estudio adicional. Los otros dos fluoróforos se analizaron con la mejor mutante, A17C-A197C. La RRC2M no se marcó bien y dio un producto con poco cambio de fluorescencia. La 5-IATR marcó las dos cisteínas de esta mutante, pero el producto dio ~2,5 veces de aumento.

Los datos de espectrometría de masa sugirieron que es posible marcar una amina con 6-IATR, aunque lentamente, además de marcador tioles. La marcación incompleta también es posible. Cualquiera de estos patrones de marcación no deseados puede dar origen a la rodamina unida a proteína que es poco probable que tenga una segunda rodamina con la que aparearse, y que por ende tendrá alta fluorescencia a pesar de la unión de Pi. Tales marcas pueden contribuir a la intensidad de fluorescencia umbral significativa. La cromatografía reveló la presencia de especies marcadas simples, dobles y triples y de este modo, para evitar estos problemas, la molécula marcada doble se preparó en forma pura por (a) optimización de las condiciones de marcación para evitar las formas marcadas simples y triples, y (b) por medio del uso de cromatografía de intercambio iónico para eliminar las especies no deseadas. La espectrometría de masa por electroaspersión mostró que estos procedimientos proporcionaron una mutante pura 17/197 marcada con 6-IATR.

Mediciones de absorbancia y fluorescencia

Los espectros de absorbancia se obtuvieron por medio del uso de un espectrofotómetro Beckman DU640. Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un Perkin Elmer LS50B o fluorímetro Cary Eclipse con lámpara de xenón. Se realizaron experimentos de flujo detenido en el aparato HiTech SF61MX, con una lámpara de mercurio-xenón y programa de computación HiTech IS-2, un monocromador y ranuras de 4 mm en la luz de excitación (550 nm para rodamina) y un filtro de corte de 570 nm en la emisión. Las concentraciones indicadas son las de la cámara de mezclado, a menos que se indique lo contrario.

Los espectros de absorbancia se obtuvieron en 10 mM de buffer PIPES pH 7,0 con 3,8 μM de proteína y 125 μM Pi (+Pi) o un limpiador de fosfato (2,5 unidad/ml de PNPasa, 200 μM de MEG) (-Pi). Estos espectros permitieron calcular la concentración de la proteína sobre la base de un coeficiente de extinción para la proteína marcada doble de 108 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 526 nm (punto isobéptico) – ver anteriormente.

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en las mismas condiciones. La excitación fue a 555 nm. Las señales de fluorescencia se normalizaron a 100%, lo que representa la intensidad máxima en presencia de Pi.

En términos de cambios detectables entre las formas libres de Pi y unidas a Pi, los mejores resultados se obtuvieron con la mutante 17/197. Con esta mutante, RRC2M mostró poco cambio de fluorescencia. 5-IATR dio un cambio de siete veces menos que con 6-IATR, aun cuando las dos mutantes se marcaron en la misma medida. Los espectros de absorbancia y emisión para la mutante 17/197 marcada con 6-IATR se muestran en las Figuras 1 y 2. Los mejores resultados con las marcas ligadas a yodo se pueden explicar por la masa extra de la maleimida respecto de la yodoacetamida y posiblemente por la presencia de diastereoisómeros provenientes de la marcación con maleimida.

La mutante 17/197 marcada con 6-IATR se estudió con más detalle y se denomina a continuación simplemente como 'rodamina-PBP'. La fluorescencia de esta Rodamina-PBP es mucho más baja que la esperada para dos monómeros independientes, presumiblemente debido a que las dos rodaminas pueden interactuar por medio del apilamiento. Como se muestra en la Figura 1, el espectro de absorbancia de esta Rodamina-PBP purificada muestra un cambio en la unión a Pi, con el pico a $\lambda_{\text{máx}}$ 554 nm que aumenta ~2,5 veces en la saturación con Pi. Existe una disminución concomitante en el pico a 515 nm. El espectro de fluorescencia también muestra un gran cambio en la unión a Pi (Figura 2), con emisión a 578 nm ($\lambda_{\text{máx}}$) que aumenta hasta ~30 veces. La amplitud del aumento depende de la resolución de diferentes especies marcadas por la columna de intercambio iónico final y es normalmente ~18 veces. Los cambios de fluorescencia a pH 6,5 y 8,0 son similares a los a pH 7,0. El espectro de excitación tiene un máximo que coincide con el pico de absorbancia a 554 nm. Existe mucha menos excitación de fluorescencia en la posición del segundo pico de absorbancia a 515 nm. Los espectros de absorbancia sugieren que existe formación de dímero de rodamina casi completa en ausencia de Pi, lo que asegura que la fluorescencia es muy baja. En presencia de Pi, el cambio de conformación se traduce en un cambio del apilamiento de la rodamina, con concomitante incremento de la fluorescencia.

La proteína purificada se tituló con Pi a 20°C, como se muestra en la Figura 3. Se añadieron alícuotas de Pi a 6 μM de rodamina-PBP y se midió la fluorescencia a 575 nm, con excitación a 555 nm (círculos). Los datos se normalizan a 100% por la fluorescencia a [Pi] alta. El triángulo representa la fluorescencia después de que una solución de rodamina-PBP se trató con un limpiador de fosfato (2,5 unidades/ml¹ de PNPasa, 200 μM de MEG) durante 15 minutos. Esta fluorescencia representa el valor cuando está aproximadamente libre de Pi. Las líneas mostradas en la Figura 3 son un mejor ajuste para los datos de 0 a 4 μM añadidos de Pi, y una línea horizontal. La intersección de estas dos líneas es una medida de la capacidad de la rodamina-PBP por Pi [31].

La Figura 3 muestra que la fluorescencia aumenta linealmente con Pi durante la mayor parte de su intervalo y esencialmente todos los sitios de la rodamina-PBP se pueden unir de modo similar con Pi. La capacidad de unión es

~100%, después de tomar en cuenta la pequeña cantidad de Pi presente por contaminación. Esta estequiometría es mayor que la que se observa con MDCC-PBP [25], donde una titulación similar normalmente muestra 75% de capacidad. La probable explicación para esta diferencia es la presencia de diastereoisómeros de MDCC-PBP, ya que la unión es por medio de un centro quiral de una succinimida [29]. Los diastereoisómeros tienen respuestas diferentes para la unión a Pi [25], lo que origina una actividad aparentemente reducida. El uso de un ligador de yodoacetamida no proporciona un centro quiral, de este modo se evita este problema.

La proteína K229C-E302C marcada doble muestra un conjunto similar de resultados de absorbancia y fluorescencia aunque con un aumento de fluorescencia menor. La titulación de la fluorescencia con Pi muestra que la proteína es ~100% activa. Estos cambios distintos en el espectro de absorbancia sugieren que la base del principal cambio de fluorescencia para esta mutante es también el cambio en el apilamiento de la rodamina.

Se usó un aparato de flujo detenido para determinar la cinética de asociación y disociación del Pi de la rodamina-PBP. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Para una medición de la cinética de asociación, 0,1 μM de rodamina-PBP se mezcló rápidamente con varias concentraciones de Pi a 10°C en 10 mM de PIPES, pH 7,0. Un conjunto representativo de trazas de fluorescencia se muestra en la Figura 4A, todas normalizadas a 100% para la intensidad inicial, pero compensada por 15% entre sí. Las concentraciones micromolares de Pi se muestran en la Figura 4A para cada traza. A medida que la concentración de Pi y la velocidad aumentan, una proporción significativa de la traza de fluorescencia se pierde en el tiempo muerto del instrumento de flujo detenido, lo que causa una evidente reducción de la intensidad. Los datos se pueden ajustar a una hipérbola, como se muestra en la Figura 4B.

Es evidente que la velocidad alcanza un valor limitante alto. Esto se puede interpretar en términos de un mecanismo de dos etapas, unión en sí misma (etapa 1), posteriormente un cambio de conformación (etapa 2):



El cambio de fluorescencia ocurre en la etapa 2 y es probable que sea concomitante con el cierre de la hendidura de unión. Este es un proceso que limita la velocidad total a concentración de Pi alta. Los datos de la Figura 4B ajustados a una hipérbola dan $1/K_1 = 2,2 \mu\text{M}$ y $k_{+2} + k_{-2} = 267 \text{ s}^{-1}$ (a 10°C).

Las cinéticas de disociación se midieron de modo similar, por la mezcla de un complejo preformado de Pi con la rodamina-PBP (0,25 μM de rodamina-PBP que contiene 0,06 μM de Pi unido) con un gran exceso (10 μM) de PBP tipo salvaje, mediante las mismas condiciones que antes. Estaban presentes 2,5 μM de BSA con la Rodamina-PBP para minimizar cualquier adsorción en las superficies. Estaban presentes 0,25 unidades/ml⁻¹ de PNPasa y 100 μM de 7-metilguanosina con la PBP tipo salvaje para asegurar que estaba libre de Pi antes del mezclado. Los resultados se muestran en la Figura 4C. La cinética del cambio de fluorescencia está limitada por la velocidad de disociación de Pi, como se muestra por la variación de la concentración de la PBP tipo salvaje. Un mejor ajuste exponencial dio una velocidad de 6,6 s⁻¹, ya que la unión a PBP tipo salvaje es rápida.

Los datos cinéticos muestran que la cinética de asociación de la rodamina-PBP (a 10°C) es más lenta que la hallada con MDCC-PBP a 5°C. Esto puede ser porque el dímero de rodamina debe estar alterado, lo que proporciona una pequeña barrera adicional para que ocurra el cierre de la hendidura. La constante de disociación total se da por $k_{-2}/k_{+2}K_1$, que es 0,06 μM. La estrechez de la unión es similar a la de MDCC-PBP.

Comparación con los kits de ensayo de fosfato disponibles en el comercio

A continuación se da una comparación del ensayo rodamina-PBP con los kits de ensayo de fosfato existentes

Ensayo	Concentración de detección de fosfato	Cinética	Absorbancia
Quantichrom (Chemical)	0,3 mM – 50 mM	lenta	620 nm
Enzchek (Enzymatic)	2 μM – 150 μM	media	360 nm
rodamina-PBP	10 nM – 1 mM	muy rápida	575 nm
MDCC-PBP	10 nM – 1 mM	muy rápida	465 nm

Discusión

En consecuencia la marcación específica de una mutante PBP de cisteína doble con una rodamina puede producir una especie cuya fluorescencia responde a la unión a Pi. El tamaño del cambio de fluorescencia en respuesta a la

unión a Pi depende de varios factores. El primero es la distancia y accesibilidad entre las rodaminas unidas a tiol y el movimiento durante el cambio de conformación asociado con Pi. El examen de las estructuras cristalinas proporcionó una evaluación inicial de esto, al tomar en cuenta la estructura covalente de las marcas para determinar las distancias adecuadas que podrían permitir la interacción rodamina-rodamina. Los efectos secundarios, tales como posible flexibilidad de la proteína o interacción con cadenas laterales de aminoácidos, también pueden ser importantes.

Los factores tales como buenas condiciones de marcación y la capacidad de separar otras especies marcadas que probablemente tengan alta fluorescencia son importantes. El protocolo descrito normalmente da un producto con ~18 veces de cambio de fluorescencia. El mejor lote de producto dio 30 veces, presumiblemente debido a una casi completa eliminación de impurezas de fluorescencia alta.

Quando los sitios de marcación están del lado de la molécula opuesta de la hendidura de unión, el sitio de Pi no se modifica. Como se describió anteriormente, estas caras posteriores de los dos dominios se separan cuando Pi se une a su sitio, así los carbonos α de las dos cisteínas marcadas se separan adicionalmente. Esta parte de la proteína está relativamente abierta, de modo que se podría esperar que este cambio de distancia sea el principal factor para determinar un cambio en el apilamiento de la rodamina. Con una mutante tal marcada (K229C-E302C), se produce 8,5 veces de aumento de la fluorescencia de rodamina en la unión a Pi, cuando los carbonos α se separan 1,2 a 1,7 nm. En este caso ambos sitios marcación están bien alejados del sitio de unión y así no pueden ser afectados por o afectar la unión del Pi.

La proteína mutante A17C-A197C marcada con 6-IATR, dio hasta 30 veces de aumento de fluorescencia. Los carbonos α de estos dos aminoácidos están separados 1,6 y 1,3 nm en las conformaciones libres de Pi y unida a Pi de PBP respectivamente. Esto se debe al cierre de la hendidura de unión con cada mutación en los lados opuestos de la hendidura. Los espectros de absorbancia del producto purificado, Rodamina-PBP (Figura 1) sugieren que hay formación casi completa de dímero en ausencia de Pi y esto asegura que la fluorescencia es muy baja. El gran aumento de la fluorescencia sugiere que hay un cambio significativo en la interacción rodamina-rodamina en la unión a Pi. Si bien los carbonos α están más cerca en la unión a Pi, la posición 197 está parcialmente oculta, lo que presumiblemente restringe su rodamina fijada de modo que esta no pueda ya interactuar bien con la rodamina A17C.

Se entenderá que la invención se ha descrito solo a modo de ejemplo y se pueden realizar modificaciones mientras que permanezcan dentro del ámbito y espíritu de la invención.

REFERENCIAS (cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia)

[1] EP-A-0159513.

[2] Webb et al. (1992) PNAS 89:4884-7.

[3] Magota et al. (1984) J. Bacteriol. 157:909-17.

[4] Surin et al. (1984) J. Bacteriol. 157:772-8.

[5] Luecke & Quiocho (1990) Nature 347, 402-406

[6] Ledvina et al. (1996) PNAS 93:6786-91.

[7] EP-A-0715721.

[8] Morales et. al. (2006) Structure 14:601 - 609

[9] Tam & Saier (1993) Microbiol. Rev. 57:320-46.

[10] Quiocho & Ledvina (1996) Mol Microbiol. 20:17-25

[11] Vyas et. al. (2003) Structure 11, 765-774

[12] Fukami-Kobayashi et al (1999) J. Mol. Biol., 286, 279-290

[13] Yao et al. (1996) Biochemistry 35:2079-85.

[14] Wang et al. (1997) Nat Struct Biol 4:519.

[15] Wang et al. (1994) J Biol Chem 269:25091-4.

[16] Ledvina et al. (1998) Protein Sci 7:2550-9.

[17] Rohatgi & Singhal (1966) J. Phys. Chem. 70:1695-701.

- [18] Förster & König (1957) Z. Elektrochem. 61:344-8.
 [19] Selwyn & Steinfeld (1972) J. Phys. Chem. 76:762-74.
 [20] Chambers et al. (1974) J. Phys. Chem. 78:380-387.
 [21] Blackman et al. (2002) Biochemistry 41:12244-52
 5 [22] Dietrich et al. (2002) Rev. Mol. Biotechnol. 82:211-31
 [23] Hamman et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:7568-73
 [24] Kasha (1963) Radiat. Res, 20, 55-71
 [25] Brune et al. (1998) Biochemistry 37:10370-80.
 [26] Bioconjugate Techniques. Hermanson (1996). ISBN 0-12-342336-8.
 10 [27] Brune et al. (1994) Biochemistry 33:8262-71.
 [28] Salins et al. (2004) Sensors and Actuators B 97:81-9.
 [29] Hirshberg et al. (1998) Biochemistry 37:10381-5
 [30] Nixon et al. (1995) Biochemistry 34:15592-8.
 [31] Webb (2003) A fluorescent sensor to assay inorganic phosphate in Kinetic analysis: a practical approach (ed.
 15 Johnson) pp 131-152, Oxford University Press, Oxford, UK.
 [32] Corrie & Craik (1994) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I: 2967-74.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> MEDICAL RESEARCH COUNCIL
 <120> Ensayos de fosfato inorgánico mejorados
 <130> P041861WO
 <141> 2006-09-01
 <150> 0517855,3
 25 <151> 2005-09-01
 <150> 0608839,7
 <151> 2006-05-04
 <160> 23
 <170> SeqWin99, versión 1,02
 30 <210> 1
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> *E. coli*
 <400> 1
 35

ES 2 361 121 T3

Met Lys Val Met Arg Thr Thr Val Ala Thr Val Val Ala Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Met Ser Ala Phe Ser Val Phe Ala Glu Ala Ser Leu Thr Gly Ala
 20 25 30
 Gly Ala Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr Ala Lys Trp Ala Asp Thr Tyr
 35 40 45
 Gln Lys Glu Thr Gly Asn Lys Val Asn Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Gly Val Lys Gln Ile Ile Ala Asn Thr Val Asp Phe Gly Ala Ser
 65 70 75 80
 Asp Ala Pro Leu Ser Asp Glu Lys Leu Ala Gln Glu Gly Leu Phe Gln
 85 90 95
 Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Glu Leu Val Leu Asp Gly Lys Thr Leu Gly Asp Ile
 115 120 125
 Tyr Leu Gly Lys Ile Lys Lys Trp Asp Asp Glu Ala Ile Ala Lys Leu
 130 135 140
 Asn Pro Gly Leu Lys Leu Pro Ser Gln Asn Ile Ala Val Val Arg Arg
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val Phe Thr Ser Tyr Leu Ala Lys
 165 170 175
 Val Asn Glu Glu Trp Lys Asn Asn Val Gly Thr Gly Ser Thr Val Lys
 180 185 190
 Trp Pro Ile Gly Leu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Gly Ile Ala Ala Phe
 195 200 205
 Val Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ile Gly Tyr Val Glu Tyr Ala Tyr Ala
 210 215 220
 Lys Gln Asn Asn Leu Ala Tyr Thr Lys Leu Ile Ser Ala Asp Gly Lys
 225 230 235 240
 Pro Val Ser Pro Thr Glu Glu Asn Phe Ala Asn Ala Ala Lys Gly Ala
 245 250 255
 Asp Trp Ser Lys Thr Phe Ala Gln Asp Leu Thr Asn Gln Lys Gly Glu
 260 265 270
 Asp Ala Trp Pro Ile Thr Ser Thr Thr Phe Ile Leu Ile His Lys Asp
 275 280 285
 Gln Lys Lys Pro Glu Gln Gly Thr Glu Val Leu Lys Phe Phe Asp Trp
 290 295 300
 Ala Tyr Lys Thr Gly Ala Lys Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Pro Asp Ser Val Val Glu Gln Val Arg Ala Ala Trp Lys Thr Asn
 325 330 335
 Ile Lys Asp Ser Ser Gly Lys Pro Leu Tyr
 340 345

<210> 2
 <211> 321
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 2

```

Glu Ala Ser Leu Thr Gly Ala Gly Ala Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr
1      5      10
Ala Lys Trp Ala Asp Thr Tyr Gln Lys Glu Thr Gly Asn Lys Val Asn
20     25     30
Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Lys Gln Ile Ile Ala Asn
35     40     45
Thr Val Asp Phe Gly Ala Ser Asp Ala Pro Leu Ser Asp Glu Lys Leu
50     55     60
Ala Gln Glu Gly Leu Phe Gln Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val
65     70     75     80
Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Gly Glu Leu Val Leu Asp
85     90     95
Gly Lys Thr Leu Gly Asp Ile Tyr Leu Gly Lys Ile Lys Lys Trp Asp
100    105    110
Asp Glu Ala Ile Ala Lys Leu Asn Pro Gly Leu Lys Leu Pro Ser Gln
115    120    125
Asn Ile Ala Val Val Arg Arg Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val
130    135    140
Phe Thr Ser Tyr Leu Ala Lys Val Asn Glu Glu Trp Lys Asn Asn Val
145    150    155    160
Gly Thr Gly Ser Thr Val Lys Trp Pro Ile Gly Leu Gly Gly Lys Gly
165    170    175
Asn Asp Gly Ile Ala Ala Phe Val Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ile Gly
180    185    190
Tyr Val Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Gln Asn Asn Leu Ala Tyr Thr Lys
195    200    205    210
Leu Ile Ser Ala Asp Gly Lys Pro Val Ser Pro Thr Glu Gln Asn Phe
210    215    220

Ala Cys Ala Ala Lys Gly Ala Asp Trp Ser Lys Thr Phe Ala Gln Asp
225    230    235    240
Leu Thr Asn Gln Lys Gly Glu Asp Ala Trp Pro Ile Thr Ser Thr Thr
245    250    255
Phe Ile Leu Ile His Lys Asp Gln Lys Lys Pro Glu Gln Gly Thr Glu
260    265    270
Val Leu Lys Phe Phe Asp Trp Ala Tyr Lys Thr Gly Ala Lys Gln Ala
275    280    285
Asn Asp Leu Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Asp Cys Val Val Glu Gln Val
290    295    300
Arg Ala Ala Trp Lys Thr Asn Ile Lys Asp Ser Ser Gly Lys Pro Leu
305    310    315    320
Tyr

```

<210> 3
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 3

```

Glu Ala Ser Leu Thr Gly Ala Gly Ala Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr
1          5          10          15
Cys Lys Trp Ala Asp Thr Tyr Gln Lys Glu Thr Gly Asn Lys Val Asn
          20          25          30
Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Lys Gln Ile Ile Ala Asn
          35          40          45
Thr Val Asp Phe Gly Ala Ser Asp Ala Pro Leu Ser Asp Glu Lys Leu
          50          55          60
Ala Gln Glu Gly Leu Phe Gln Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val
          65          70          75          80
Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Gly Glu Leu Val Leu Asp
          85          90          95
Gly Lys Thr Leu Gly Asp Ile Tyr Leu Gly Lys Ile Lys Lys Trp Asp
          100          105          110
Asp Glu Ala Ile Ala Lys Leu Asn Pro Gly Leu Lys Leu Pro Ser Gln
          115          120          125
Asn Ile Ala Val Val Arg Arg Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val
          130          135          140
Phe Thr Ser Tyr Leu Ala Lys Val Asn Glu Glu Trp Lys Asn Asn Val
          145          150          155          160
Gly Thr Gly Ser Thr Val Lys Trp Pro Ile Gly Leu Gly Gly Lys Gly
          165          170          175
Asn Asp Gly Ile Ala Ala Phe Val Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ile Gly
          180          185          190
Tyr Val Glu Tyr Cys Tyr Ala Lys Gln Asn Asn Leu Ala Tyr Thr Lys
          195          200          205
Leu Ile Ser Ala Asp Gly Lys Pro Val Ser Pro Thr Glu Glu Asn Phe

```

210	215	220																	
Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Trp	Ser	Lys	Thr	Phe	Ala	Gln	Asp	225	230	235	240
Leu	Thr	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Asp	Ala	Trp	Pro	Ile	Thr	Ser	Thr	Thr	245	250	255	
Phe	Ile	Leu	Ile	His	Lys	Asp	Gln	Lys	Lys	Pro	Glu	Gln	Gly	Thr	Glu	260	265	270	
Val	Leu	Lys	Phe	Phe	Asp	Trp	Ala	Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Lys	Gln	Ala	275	280	285	
Asn	Asp	Leu	Asp	Tyr	Ala	Ser	Leu	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Glu	Gln	Val	290	295	300	
Arg	Ala	Ala	Trp	Lys	Thr	Asn	Ile	Lys	Asp	Ser	Ser	Gly	Lys	Pro	Leu	305	310	315	320
Tyr																			

- <210> 4
- <211> 321
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Secuencia Artificial

- <400> 4

Glu Ala Ser Leu Thr Gly Ala Gly Ala Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr
 1 5 10 15
 Ala Lys Trp Ala Asp Thr Tyr Gln Lys Glu Thr Gly Asn Lys Val Asn
 20 25 30
 Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Lys Gln Ile Ala Asn
 35 40 45
 Thr Val Asp Phe Gly Ala Ser Asp Ala Pro Leu Ser Asp Glu Lys Leu
 50 55 60
 Ala Gln Glu Gly Leu Phe Gln Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Gly Glu Leu Val Leu Asp
 85 90 95
 Gly Lys Thr Leu Gly Asp Ile Tyr Leu Gly Lys Ile Lys Lys Trp Asp
 100 105 110
 Asp Glu Ala Ile Ala Lys Leu Asn Pro Gly Leu Lys Leu Pro Ser Gln
 115 120 125
 Asn Ile Ala Val Val Arg Arg Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val
 130 135 140
 Phe Thr Ser Tyr Leu Ala Lys Val Asn Glu Glu Trp Lys Asn Asn Val
 145 150 155 160
 Gly Thr Gly Ser Thr Val Lys Trp Pro Ile Gly Leu Gly Gly Lys Gly
 165 170 175
 Asn Asp Gly Ile Ala Ala Phe Val Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ile Gly
 180 185 190
 Tyr Val Glu Tyr Ala Tyr Ala Lys Gln Asn Asn Leu Ala Tyr Thr Lys
 195 200 205

 Leu Ile Ser Ala Asp Gly Lys Pro Val Ser Pro Thr Glu Glu Asn Phe
 210 215 220
 Ala Asn Ala Ala Cys Gly Ala Asp Trp Ser Lys Thr Phe Ala Gln Asp
 225 230 235 240
 Leu Thr Asn Gln Lys Gly Glu Asp Ala Trp Pro Ile Thr Ser Thr Thr
 245 250 255
 Phe Ile Leu Ile His Lys Asp Gln Lys Lys Pro Glu Gln Gly Thr Glu
 260 265 270
 Val Leu Lys Phe Phe Asp Trp Ala Tyr Lys Thr Gly Ala Lys Gln Ala
 275 280 285
 Asn Asp Leu Asp Tyr Ala Ser Leu Pro Asp Ser Val Val Cys Gln Val
 290 295 300
 Arg Ala Ala Trp Lys Thr Asn Ile Lys Asp Ser Ser Gly Lys Pro Leu
 305 310 315 320
 Tyr

<210> 5
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Burkholderia

 <400> 5

Met Ser Glu Pro Ile Met Asn Phe Pro Gly Pro Asp Gly Ala Ala Leu
1 5 10 15

Asp Ala Met Arg Asn Arg Leu Gln Arg Lys Arg Lys Ala Val Asn Ala
20 25 30

Ile Ala Leu Thr Ala Ser Leu Gly Ala Met Ala Phe Gly Leu Leu Trp
35 40 45

Leu Val Trp Ile Leu Tyr Thr Thr Val His Leu Gly Val Gly Gly Leu
50 55 60

Ser Leu Gln Leu Phe Thr Glu Ser Thr Pro Ala Pro Asn Thr Glu Gly
65 70 75 80

Gly Gly Leu Ala Asn Ala Ile Val Gly Ser Leu Leu Leu Cys Gly Phe
85 90 95

Gly Thr Leu Val Gly Thr Pro Ile Gly Ile Leu Ala Gly Val Tyr Leu
100 105 110

Ala Glu Tyr Gly Gln Lys Asn Leu Leu Ala Ser Thr Ile Arg Phe Ile
115 120 125

Asn Asp Ile Leu Leu Ser Ala Pro Ser Ile Val Ile Gly Leu Phe Val
130 135 140

Tyr Ala Ile Val Val Ala Lys Ser Gly Arg Phe Ser Gly Trp Ala Gly
145 150 155 160

Val Ile Ala Leu Ala Leu Leu Gln Ile Pro Ile Val Ile Arg Thr Thr
165 170 175

Glu Asn Met Leu Lys Leu Val Pro Asn Ala Leu Arg Glu Ala Ala Val
180 185 190

Ala Leu Gly Thr Pro Lys Trp Arg Met Val Leu Lys Ile Thr Leu Arg
195 200 205

Ala Ser Val Gly Gly Ile Val Thr Gly Val Leu Leu Ala Val Ala Arg
210 215 220

Ile Ala Gly Glu Thr Ala Pro Leu Leu Phe Thr Ala Leu Ser Asn Gln
225 230 235 240

Phe Phe Ser Trp Asp Met Ser Gln Pro Met Ala Asn Leu Pro Val Thr
245 250 255

Ile Tyr Lys Phe Ala Met Ser Pro Phe Ala Glu Trp Gln Ser Leu Ala
260 265 270

Trp Ala Gly Val Phe Leu Ile Thr Leu Gly Val Leu Gly Leu Asn Val
275 280 285

Leu Ala Arg Ser Ile Phe Ser Lys Lys
290 295

<210> 6
<211> 281
<212> PRT
<213> Bradyrhizobium

<400> 6

ES 2 361 121 T3

Met Asn Pro Ile Tyr Ser Arg Arg Arg Arg Lys Asp Ile Val Val Arg
 1 5 10 15
 Gly Leu Cys Ile Ala Ala Ala Ala Phe Gly Val Thr Trp Leu Ala Leu
 20 25 30
 Ile Leu Ile Thr Leu Leu Tyr Asn Gly Ile Ala Gly Leu Asn Leu Glu
 35 40 45
 Ile Phe Val Ala Asp Thr Pro Pro Pro Gly Ser Thr Glu Gly Gly Leu
 50 55 60
 Arg Asn Ala Ile Val Gly Ser Ile Ile Met Thr Val Leu Gly Val Gly
 65 70 75 80
 Ile Gly Ala Pro Leu Gly Leu Phe Ala Gly Thr Tyr Leu Ala Glu Tyr
 85 90 95
 Gly Arg Asn Asp Arg Leu Thr Ser Val Ile Arg Phe Ile Asn Asp Ile
 100 105 110
 Leu Leu Ser Ala Pro Ser Ile Ile Ile Gly Leu Phe Ile Tyr Gly Ala
 115 120 125
 Val Val Val Pro Met Arg Gly Phe Ser Ala Ile Ala Gly Ser Leu Ala
 130 135 140
 Leu Ala Val Ile Val Ile Pro Val Val Leu Arg Thr Thr Glu Asp Met
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Val Pro Asn Ala Leu Arg Glu Ala Ala Ser Ala Leu Gly
 165 170 175
 Leu Pro Arg Ser Leu Val Ile Lys Arg Ile Ala Tyr Arg Ala Ala Arg
 180 185 190
 Ser Gly Leu Ile Thr Gly Val Leu Leu Ala Thr Ala Arg Val Ala Gly
 195 200 205
 Glu Thr Ala Pro Leu Leu Phe Thr Ala Leu Ser Asn Gln Phe Phe Ser
 210 215 220
 Leu Gly Leu Asn Lys Thr Met Ala Asn Leu Pro Val Thr Ile Asn Asn
 225 230 235 240
 Phe Val Gln Ser Pro Tyr Ala Tyr Trp Lys Gln Leu Ala Trp Ser Gly
 245 250 255
 Ala Leu Leu Ile Thr Ile Thr Val Leu Ala Leu Asn Ile Gly Ala Arg

260 265 270

Ile Leu Gly Ala Glu Arg Thr Ala Lys
 275 280

- <210> 7
- <211> 287
- <212> PRT
- <213> Xylella

- <400> 7

Met Ser Thr Ala Ser Gln His Leu Tyr Lys Arg Arg Arg Leu Ile Asn
1 5 10 15
Ala Thr Ala Ile Thr Ile Ser Cys Ile Ala Ala Leu Phe Gly Leu Phe
20 25 30
Phe Leu Ile Trp Ile Leu Trp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Leu Pro Gly
35 40 45
Ile Gly Leu Asp Leu Phe Thr Lys Ile Thr Pro Pro Pro Met Gln Lys
50 55 60
Gly Gly Leu Ala Asn Ala Phe Phe Gly Ser Ala Ile Met Cys Leu Leu
65 70 75 80
Ala Ile Val Ile Gly Thr Pro Leu Gly Ile Ala Ala Gly Thr Trp Leu
85 90 95
Ala Glu Tyr Gly Asn Thr Ser Lys Thr Ser Ala Val Val Arg Phe Val
100 105 110
Asn Asp Ile Leu Leu Ser Ala Pro Ser Ile Val Leu Gly Leu Phe Val
115 120 125
Tyr Thr Leu Tyr Val Met His Thr Gly Gly His Phe Ser Ala Phe Ser
130 135 140
Gly Ala Leu Ala Leu Val Phe Ile Val Leu Pro Ile Val Val Arg Thr
145 150 155 160
Thr Asp Glu Met Leu Arg Leu Val Pro Gly Gln Met Arg Glu Ala Ala
165 170 175
Leu Ser Leu Gly Ile Pro Gln Trp Lys Met Ile Ile Gln Val Leu Tyr
180 185 190
Arg Ser Ala Ser Ala Gly Ile Leu Thr Gly Ile Leu Leu Ala Leu Ala
195 200 205
Arg Ile Ser Gly Glu Thr Ala Pro Leu Leu Phe Thr Ala Phe Gly Asn
210 215 220
Gln Tyr Trp Ser Ser Asn Ile Phe Gln Pro Ile Ala Ser Leu Pro Leu
225 230 235 240
Val Met Asn Gln Phe Ala Ser Ser Pro Tyr Lys Ser Trp Gln Leu Leu
245 250 255
Ala Trp Ser Gly Ala Leu Val Leu Thr Val Phe Val Leu Leu Val Ser
260 265 270
Leu Gly Ala Arg Thr Leu Leu Leu Arg Asn Lys Ile Pro Asn Glu
275 280 285

<210>
<211> 304
<212> PRT
<213> Myco.pstA-1
<400> 8

Met Ser Pro Ser Thr Ser Ile Glu Ala Leu Asp Gln Pro Val Lys Pro
 1 5 10 15
 Val Val Phe Arg Pro Leu Thr Leu Arg Arg Arg Ile Lys Asn Ser Val
 20 25 30
 Ala Thr Thr Phe Phe Phe Thr Ser Phe Val Val Ala Leu Ile Pro Leu
 35 40 45
 Val Trp Leu Leu Trp Val Val Ile Ala Arg Gly Trp Phe Ala Val Thr
 50 55 60
 Arg Ser Gly Trp Trp Thr His Ser Leu Arg Gly Val Leu Pro Glu Gln
 65 70 75 80
 Phe Ala Gly Gly Val Tyr His Ala Leu Tyr Gly Thr Leu Val Gln Ala
 85 90 95
 Gly Val Ala Ala Val Leu Ala Val Pro Leu Gly Leu Met Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Leu Val Glu Tyr Gly Thr Gly Arg Met Ser Arg Val Thr Thr Phe
 115 120 125
 Thr Val Asp Val Leu Ala Gly Val Pro Ser Ile Val Ala Ala Leu Phe
 130 135 140
 Val Phe Ser Leu Trp Ile Ala Thr Leu Gly Phe Gln Gln Ser Ala Phe
 145 150 155 160
 Ala Val Ala Leu Ala Leu Val Leu Leu Met Leu Pro Val Val Val Arg
 165 170 175
 Ala Gly Glu Glu Met Leu Arg Leu Val Pro Asp Glu Leu Arg Glu Ala
 180 185 190
 Ser Tyr Ala Leu Gly Val Pro Lys Trp Lys Thr Ile Val Arg Ile Val
 195 200 205
 Ala Pro Ile Ala Met Pro Gly Ile Val Ser Gly Ile Leu Leu Ser Ile
 210 215 220
 Ala Arg Val Val Gly Glu Thr Ala Pro Val Leu Val Leu Val Gly Tyr
 225 230 235 240
 Ser His Ser Ile Asn Leu Asp Val Phe His Gly Asn Met Ala Ser Leu
 245 250 255
 Pro Leu Leu Ile Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Pro Glu His Ala Gly Phe
 260 265 270
 Leu Arg Val Trp Gly Ala Ala Leu Thr Leu Ile Ile Val Val Ala Thr
 275 280 285
 Ile Asn Leu Ala Ala Ala Met Ile Arg Phe Val Ala Thr Arg Arg Arg
 290 295 300

<210> 9
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Azotobacter

<400> 9

Gly Asn Tyr Pro Tyr Leu His Leu Asp Gln Lys Ile Met His Leu Gly
 420 425 430

Phe His Ile Tyr Asp Val Gly Phe Gln Ser Pro Asn Val Glu Ala Ala
 435 440 445

Arg Pro Leu Val Tyr Ala Thr Ala Leu Leu Leu Val Leu Val Ile Ala
 450 455 460

Leu Leu Asn Leu Ser Ala Val Tyr Ile Arg Asn Arg Leu Arg Glu Lys
 465 470 475 480

Tyr Lys Ala Leu Asp His
 485

- <210> 10
- <211> 291
- <212> PRT
- <213> Bacteroides
- <400> 10

ES 2 361 121 T3

Met Glu Ile Leu Asn Asn Thr Lys Ala Lys Arg Arg Ser Gln Gly Ile
 1 5 10 15
 Ala Phe Gly Ile Phe Arg Leu Leu Ser Leu Cys Ile Val Leu Ile Leu
 20 25 30
 Phe Ala Ile Leu Gly Phe Ile Ile Tyr Lys Gly Ile Gly Val Ile Ser
 35 40 45
 Trp Asp Phe Leu Thr Thr Ala Pro Thr Asp Gly Met Thr Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ile Trp Pro Ala Ile Val Gly Thr Phe Tyr Leu Met Val Gly Ser Ala
 65 70 75 80
 Leu Phe Ala Phe Pro Val Gly Val Met Ser Gly Ile Tyr Met Asn Glu
 85 90 95
 Tyr Ala Pro Lys Gly Lys Leu Val Arg Phe Ile Arg Val Met Thr Asn
 100 105 110
 Asn Leu Ser Gly Ile Pro Ser Ile Val Phe Gly Leu Phe Gly Met Ala
 115 120 125
 Leu Phe Val Asn Tyr Met Asp Phe Gly Asp Ser Ile Leu Ala Gly Ser
 130 135 140
 Leu Thr Leu Gly Leu Leu Cys Val Pro Leu Val Ile Arg Thr Thr Glu
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Asp Ser Met Arg Glu Gly Ser Arg Ala
 165 170 175
 Leu Gly Ala Thr Lys Leu Gln Thr Ile Trp His Val Ile Leu Pro Met
 180 185 190
 Gly Met Pro Asn Ile Ile Thr Gly Leu Ile Leu Ala Leu Gly Arg Val
 195 200 205
 Ser Gly Glu Thr Ala Pro Ile Leu Phe Thr Cys Ala Ala Tyr Phe Leu
 210 215 220
 Pro Gln Leu Pro Thr Ser Ile Leu Asp Gln Cys Met Ala Leu Pro Tyr
 225 230 235 240
 His Leu Tyr Val Ile Ser Thr Ser Gly Thr Asp Met Glu Ala Gln Leu
 245 250 255
 Pro Leu Ala Tyr Gly Thr Ala Leu Val Leu Ile Val Ile Ile Leu Leu
 260 265 270
 Val Asn Leu Leu Ala Asn Ala Leu Arg Lys Tyr Phe Glu Lys Lys Val
 275 280 285
 Lys Met Asn
 290

<210> 11
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> Salmonella

<400> 11

ES 2 361 121 T3

Met Ala Ala Thr Lys Pro Ala Phe Asn Pro Pro Gly Lys Lys Gly Asp
 1 5 10 15
 Met Ile Phe Ser Ala Leu Val Lys Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Leu
 20 25 30
 Met Leu Gly Gly Ile Ile Val Ser Leu Ile Ile Ser Ser Trp Pro Ser
 35 40 45
 Ile Gln Lys Phe Gly Phe Ser Phe Leu Trp Thr Lys Glu Trp Asp Ala
 50 55 60
 Pro Asn Asp Ile Tyr Gly Ala Leu Val Pro Ile Tyr Gly Thr Leu Val
 65 70 75 80
 Thr Ser Phe Ile Ala Leu Leu Ile Ala Val Pro Val Ser Phe Gly Ile
 85 90 95
 Ala Leu Phe Leu Thr Glu Leu Ala Pro Gly Trp Leu Lys Arg Pro Leu
 100 105 110
 Gly Ile Ala Ile Glu Leu Leu Ala Ala Ile Pro Ser Ile Val Tyr Gly
 115 120 125
 Met Trp Gly Leu Phe Ile Phe Ala Pro Leu Phe Ala Thr Tyr Phe Gln
 130 135 140
 Glu Pro Val Gly Asn Ile Leu Ser Asn Ile Pro Phe Val Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Phe Ser Gly Pro Ala Phe Gly Ile Gly Ile Leu Ala Ala Gly Val Ile
 165 170 175
 Leu Ala Ile Met Ile Ile Pro Tyr Ile Ala Ala Val Met Arg Asp Val
 180 185 190
 Phe Glu Gln Thr Pro Val Met Met Lys Glu Ser Ala Tyr Gly Ile Gly
 195 200 205
 Cys Thr Thr Trp Glu Val Ile Trp Arg Ile Val Leu Pro Phe Thr Lys
 210 215 220
 Asn Gly Val Ile Gly Gly Ile Met Leu Gly Leu Gly Arg Ala Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Thr Met Ala Val Thr Phe Ile Ile Gly Asn Thr Tyr Gln Leu Asp
 245 250 255
 Ser Ala Ser Leu Tyr Met Pro Gly Asn Ser Ile Thr Ser Ala Leu Ala
 260 265 270
 Asn Glu Phe Ala Glu Ala Glu Ser Gly Leu His Val Ala Ala Leu Met
 275 280 285
 Glu Leu Gly Leu Ile Leu Phe Val Ile Thr Phe Ile Val Leu Ala Ala
 290 295 300
 Ser Lys Phe Met Ile Met Arg Leu Ala Lys Asn Glu Gly Ala Arg

305

310

315

<210> 12
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Pasteurella
 <400> 12

Met Leu Arg Arg Lys Thr Gln Ala Glu Thr Asn Arg Leu Asn His His
 1 5 10 15
 Ile Ile Glu Leu Leu Phe Arg Gln Thr Thr Arg Phe Phe Ala Ile Phe
 20 25 30
 Val Phe Leu Leu Leu Ala Ala Val Met Thr Ser Leu Val Phe Gly Ser
 35 40 45
 Trp Asp Ser Phe Ser Thr Phe Gly Phe Ser Phe Leu Trp His Asn Asp
 50 55 60
 Trp Asn Pro Val Gln Glu Ser Tyr Gly Ala Ile Ile Pro Ile Val Gly
 65 70 75 80
 Thr Leu Ile Thr Ser Phe Leu Ala Leu Ile Ile Ala Val Pro Ile Ser
 85 90 95
 Phe Gly Ile Ala Ile Phe Leu Thr Glu Leu Ala Pro Glu Trp Leu Arg
 100 105 110
 Arg Pro Val Gly Thr Ala Ile Glu Met Leu Ala Ala Ile Pro Ser Ile
 115 120 125
 Ile Tyr Gly Met Trp Gly Leu Phe Ile Phe Val Pro Leu Phe Gln Glu
 130 135 140
 His Ile Gln Pro Ser Leu Ile Glu Trp Phe Gly Asp Leu Pro Val Phe
 145 150 155 160
 Ser Tyr Leu Phe Ser Gly Ala Pro Phe Gly Ile Gly Leu Phe Thr Ala
 165 170 175
 Gly Leu Val Leu Ala Ile Met Ile Ile Pro Phe Ile Ala Ala Val Met
 180 185 190
 Arg Asp Val Phe Thr Ile Val Pro Ala Ile Leu Lys Glu Ser Ala Tyr
 195 200 205
 Gly Leu Gly Ser Thr Thr Trp Glu Val Met Trp Lys Val Val Leu Pro
 210 215 220
 Tyr Thr Lys Thr Gly Val Val Gly Gly Ile Met Leu Gly Leu Gly Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Gly Glu Thr Met Ala Val Thr Phe Val Ile Gly Asn Ala Phe
 245 250 255
 His Leu Pro Glu Ser Leu Phe Ser Pro Ser Thr Ser Ile Ala Ser Ala
 260 265 270
 Ile Ala Asn Glu Phe Asn Glu Ala Ser Gly Leu Gln Lys Ser Ala Leu
 275 280 285
 Met Glu Leu Gly Leu Ile Leu Phe Leu Ile Thr Thr Val Val Leu Ser
 290 295 300
 Ile Ser Arg Leu Leu Ile Met Arg Ile Glu Lys Lys Glu Gly Arg Lys
 305 310 315 320

<210> 13
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Myco.pstC-1

<400> 13

ES 2 361 121 T3

Met Leu Ala Arg Ala Gly Glu Val Gly Arg Ala Gly Pro Ala Ile Arg
 1 5 10 15
 Trp Leu Gly Gly Ile Gly Ala Val Ile Pro Leu Leu Ala Leu Val Leu
 20 25 30
 Val Leu Val Val Leu Val Ile Glu Ala Met Gly Ala Ile Arg Leu Asn
 35 40 45
 Gly Leu His Phe Phe Thr Ala Thr Glu Trp Asn Pro Gly Asn Thr Tyr
 50 55 60
 Gly Glu Thr Val Val Thr Asp Gly Val Ala His Pro Val Gly Ala Tyr
 65 70 75 80
 Tyr Gly Ala Leu Pro Leu Ile Val Gly Thr Leu Ala Thr Ser Ala Ile
 85 90 95
 Ala Leu Ile Ile Ala Val Pro Val Ser Val Gly Ala Ala Leu Val Ile
 100 105 110
 Val Glu Arg Leu Pro Lys Arg Leu Ala Glu Ala Val Gly Ile Val Leu
 115 120 125
 Glu Leu Leu Ala Gly Ile Pro Ser Val Val Val Gly Leu Trp Gly Ala
 130 135 140
 Met Thr Phe Gly Pro Phe Ile Ala His His Ile Ala Pro Val Ile Ala
 145 150 155 160
 His Asn Ala Pro Asp Val Pro Val Leu Asn Tyr Leu Arg Gly Asp Pro
 165 170 175
 Gly Asn Gly Glu Gly Met Leu Val Ser Gly Leu Val Leu Ala Val Met
 180 185 190
 Val Val Pro Ile Ile Ala Thr Thr His Asp Leu Phe Arg Gln Val
 195 200 205
 Pro Val Leu Pro Arg Glu Gly Ala Ile Ala Leu Gly Met Ser Asn Trp
 210 215 220
 Glu Cys Val Arg Arg Val Thr Leu Pro Trp Val Ser Ser Gly Ile Val
 225 230 235 240
 Gly Ala Val Val Leu Gly Leu Gly Arg Ala Leu Gly Glu Thr Met Ala
 245 250 255
 Val Ala Met Val Ser Gly Ala Val Leu Gly Ala Met Pro Ala Asn Ile
 260 265 270
 Tyr Ala Thr Met Thr Thr Ile Ala Ala Thr Ile Val Ser Gln Leu Asp
 275 280 285
 Ser Ala Met Thr Asp Ser Thr Asn Phe Ala Val Lys Thr Leu Ala Glu
 290 295 300
 Val Gly Leu Val Leu Met Val Ile Thr Leu Leu Thr Asn Val Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg Gly Met Val Arg Arg Val Ser Arg Thr Ala Leu Pro Val Gly Arg
 325 330 335
 Gly Ile

<210> 14
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Myco.pstC-2
 <400> 14

ES 2 361 121 T3

Met Val Thr Glu Pro Leu Thr Lys Pro Ala Leu Val Ala Val Asp Met
1 5 10 15
Arg Pro Ala Arg Arg Gly Glu Arg Leu Phe Lys Leu Ala Ala Ser Ala
20 25 30
Ala Gly Ser Thr Ile Val Ile Ala Ile Leu Leu Ile Ala Ile Phe Leu
35 40 45
Leu Val Arg Ala Val Pro Ser Leu Arg Ala Asn His Ala Asn Phe Phe
50 55 60
Thr Ser Thr Gln Phe Asp Thr Ser Asp Asp Glu Gln Leu Ala Phe Gly
65 70 75 80
Val Arg Asp Leu Phe Met Val Thr Ala Leu Ser Ser Ile Thr Ala Leu
85 90 95
Val Leu Ala Val Pro Val Ala Val Gly Ile Ala Val Phe Leu Thr His
100 105 110
Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Ser Arg Pro Phe Gly Ala Met Val Asp Leu
115 120 125
Leu Ala Ala Val Pro Ser Ile Ile Phe Gly Leu Trp Gly Ile Phe Val
130 135 140
Leu Ala Pro Lys Leu Glu Pro Ile Ala Arg Phe Leu Asn Arg Asn Leu
145 150 155 160
Gly Trp Leu Phe Leu Phe Lys Gln Gly Asn Val Ser Leu Ala Gly Gly
165 170 175
Gly Thr Ile Phe Thr Ala Gly Ile Val Leu Ser Val Met Ile Leu Pro
180 185 190
Ile Val Thr Ser Ile Ser Arg Glu Val Phe Arg Gln Thr Pro Leu Ile
195 200 205
Gln Ile Glu Ala Ala Leu Ala Leu Gly Ala Thr Lys Trp Glu Val Val
210 215 220
Arg Met Thr Val Leu Pro Tyr Gly Arg Ser Gly Val Val Ala Ala Ser
225 230 235 240
Met Leu Gly Leu Gly Arg Ala Leu Gly Glu Thr Val Ala Val Leu Val
245 250 255
Ile Leu Arg Ser Ala Ala Arg Pro Gly Thr Trp Ser Leu Phe Asp Gly
260 265 270
Gly Tyr Thr Phe Ala Ser Lys Ile Ala Ser Ala Ala Ser Glu Phe Ser
275 280 285
Glu Pro Leu Pro Thr Gly Ala Tyr Ile Ser Ala Gly Phe Ala Leu Phe
290 295 300
Val Leu Thr Phe Leu Val Asn Ala Ala Ala Arg Ala Ile Ala Gly Gly
305 310 315 320
Lys Val Asn Gly

<210> 15
<211> 346
<212> PRT
<213> E.coli

<400> 15

ES 2 361 121 T3

Met Lys Val Met Arg Thr Thr Val Ala Thr Val Val Ala Ala Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Met Ser Ala Phe Ser Val Phe Ala Glu Ala Ser Leu Thr Gly Ala
 20 25 30
 Gly Ala Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr Ala Lys Trp Ala Asp Thr Tyr
 35 40 45
 Gln Lys Glu Thr Gly Asn Lys Val Asn Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Gly Val Lys Gln Ile Ile Ala Asn Thr Val Asp Phe Gly Ala Ser
 65 70 75 80
 Asp Ala Pro Leu Ser Asp Glu Lys Leu Ala Gln Glu Gly Leu Phe Gln
 85 90 95
 Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Glu Leu Val Leu Asp Gly Lys Thr Leu Gly Asp Ile
 115 120 125
 Tyr Leu Gly Lys Ile Lys Lys Trp Asp Asp Glu Ala Ile Ala Lys Leu
 130 135 140
 Asn Pro Gly Leu Lys Leu Pro Ser Gln Asn Ile Ala Val Val Arg Arg
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val Phe Thr Ser Tyr Leu Ala Lys
 165 170 175
 Val Asn Glu Glu Trp Lys Asn Asn Val Gly Thr Gly Ser Thr Val Lys
 180 185 190
 Trp Pro Ile Gly Leu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Gly Ile Ala Ala Phe
 195 200 205
 Val Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ile Gly Tyr Val Glu Tyr Ala Tyr Ala
 210 215 220
 Lys Gln Asn Asn Leu Ala Tyr Thr Lys Leu Ile Ser Ala Asp Gly Lys
 225 230 235 240
 Pro Val Ser Pro Thr Glu Glu Asn Phe Ala Cys Ala Ala Lys Gly Ala
 245 250 255
 Asp Trp Ser Lys Thr Phe Ala Gln Asp Leu Thr Asn Gln Lys Gly Glu
 260 265 270
 Asp Ala Trp Pro Ile Thr Ser Thr Thr Phe Ile Leu Ile His Lys Asp
 275 280 285
 Gln Lys Lys Pro Glu Gln Gly Thr Glu Val Leu Lys Phe Phe Asp Trp
 290 295 300
 Ala Tyr Lys Thr Gly Ala Lys Gln Ala Asn Asp Leu Asp Tyr Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Pro Asp Cys Val Val Glu Gln Val Arg Ala Ala Trp Lys Thr Asn
 325 330 335
 Ile Lys Asp Ser Ser Gly Lys Pro Leu Tyr
 340 345

<210> 16
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Erwinia

<400> 16

Met Thr Ser Met His Lys Thr Leu Ala Gln Cys Val Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ala Val Ser Ala Leu Ala Ala Thr Asn Leu Thr Gly Ala
 20 25 30
 Gly Gly Thr Phe Pro Ala Pro Val Tyr Asn Lys Trp Ala Ala Glu Tyr
 35 40 45
 His Thr Ala Thr Gly Ser Gln Val Asn Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Gly Val Lys Gln Ile Ile Ala Lys Thr Ala Asp Phe Gly Ala Ser
 65 70 75 80
 Asp Ala Pro Met Lys Asp Glu Asp Leu Ala Lys Asn Gly Leu Phe Gln
 85 90 95
 Phe Pro Thr Val Ile Gly Gly Val Val Leu Ala Val Asn Ile Pro Gly
 100 105 110
 Ile Lys Ser Gly Glu Leu Thr Leu Asp Gly Lys Thr Val Gly Asp Ile
 115 120 125
 Tyr Leu Gly Thr Val Lys Lys Trp Asn Asp Pro Ala Ile Thr Lys Leu
 130 135 140
 Asn Pro Gly Val Lys Leu Pro Asp Ala Asn Ile Asn Val Val Arg Arg
 145 150 155 160
 Ala Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Val Phe Thr Ser Tyr Leu Ser Lys
 165 170 175
 Val Asn Lys Asp Trp Ser Ser Lys Val Gly Lys Gly Ser Thr Val Asn
 180 185 190
 Trp Pro Val Gly Leu Gly Gly Lys Gly Asn Asp Gly Val Ala Ala Phe
 195 200 205
 Val Gln Arg Leu Pro Gly Ser Val Gly Tyr Val Glu Tyr Ala Tyr Ala
 210 215 220
 Lys Gln Asn Ser Leu Ala Tyr Thr Lys Leu Val Asp Ala Asp Gly Lys
 225 230 235 240
 Ala Ile Ala Pro Ser Glu Lys Ser Phe Ser Asp Ala Ala Lys Gly Ala
 245 250 255
 Asp Trp Ser Thr Ser Phe Ala Gln Asp Leu Thr Phe Gln Lys Gly Asp
 260 265 270
 Asn Ala Trp Pro Ile Thr Ser Thr Thr Phe Ile Leu Val His Lys Glu
 275 280 285
 Gln Ala Asn Thr Ala Lys Gly Ala Ala Val Leu Gln Phe Phe Asp Trp
 290 295 300
 Ala Tyr Lys Asn Gly Gly Lys Thr Thr Ser Ala Leu Asp Tyr Ala Ser
 305 310 315 320
 Leu Pro Ala Pro Val Val Glu Gln Ile Arg Ala Ala Trp Lys Ser Asn
 325 330 335
 Val Lys Asp Ser Ser Gly Lys Ala Leu Tyr
 340 345

<210> 17
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Xanthomonas

<400> 17

Met Arg Arg Thr Pro Leu Pro Cys Asn Gly Val Leu Arg Asp Val Ile
1 5 10 15

Pro Ile Ala Thr Arg Ser Cys Ser Val Ile Ser Ser Ile Lys Ser Arg
20 25 30

Leu Ala Val Gly Val Leu Ala Ala Ala Leu Ala Met Gly Ala Gln Ala
35 40 45

Ala Asp Val Thr Gly Ala Gly Ala Ser Phe Ile Tyr Pro Val Met Ser
50 55 60

Lys Trp Ser Ala Asp Tyr Asn Thr Ala Thr Lys Lys Gln Val Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Ser Ile Gly Ser Gly Gly Gly Ile Ala Gln Ile Lys Ala Ala Ser
85 90 95

Val Asp Phe Gly Ser Ser Asp Ala Pro Leu Lys Pro Glu Glu Leu Ala
100 105 110

Ala Ala Gly Leu Ala Gln Phe Pro Ser Val Ile Gly Gly Val Val Pro
115 120 125

Val Ile Asn Val Pro Gly Ile Ala Ala Gly Ala Val Lys Leu Asp Gly
130 135 140

Lys Thr Leu Gly Asp Ile Phe Leu Gly Lys Val Thr Thr Trp Asn Asp
145 150 155 160

Ala Ala Ile Val Ala Leu Asn Pro Gly Val Lys Leu Pro Asp Ser Lys
165 170 175

Ile Thr Val Val His Arg Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Phe Asn Phe
180 185 190

Thr Asn Tyr Leu Ser Lys Val Asn Pro Asp Trp Lys Ser Lys Val Gly
195 200 205

Glu Gly Thr Ala Val Gln Trp Pro Thr Gly Ile Gly Gly Lys Gly Asn
210 215 220

Glu Gly Val Ala Ala Tyr Val Lys Gln Ile Lys Gly Gly Ile Gly Tyr
225 230 235 240

Val Glu Leu Ser Tyr Ala Leu Gln Asn Lys Met Ala Tyr Thr Ala Met
245 250 255

Lys Asn Ala Ala Gly Lys Phe Val Gln Pro Ser Asp Glu Thr Phe Ala
260 265 270

Ala Ala Ala Asn Ser Ala Asp Trp Gly Ser Ser Lys Asp Phe Tyr Leu
275 280 285

Val Met Thr Asn Ala Ala Gly Asp Asn Ala Trp Pro Ile Thr Ala Thr
290 295 300

Asn Phe Ile Leu Val Gln Lys Lys Pro Lys Asn Pro Ala Gly Leu Lys
305 310 315 320

Asn Thr Leu Glu Phe Phe Arg Trp Val Tyr Ser Lys Gly Asp Ala Gln
325 330 335

Ala Lys Ala Leu Asp Tyr Val Pro Leu Pro Asp Thr Leu Val Ser Gln
340 345 350

Ile Glu Ala Tyr Trp Ala Lys Thr Leu Pro Arg
355 360

<211> 361
 <212> PRT
 <213> limicola

<400> 18

```

Met Arg Cys Gln Leu Ile Met Ile Phe Met Phe His Thr Phe Asn Arg
1          5          10          15

Tyr Pro Ile Met Met Ile Lys Arg Phe Trp Lys Thr Ala Phe Met Ala
20          25          30

Cys Ala Phe Ala Gly Leu Ala Thr Gly Ser Ala Glu Ala Arg Glu Gln
35          40          45

Ile Arg Ile Val Gly Ser Ser Thr Val Phe Pro Phe Ala Ser Tyr Val
50          55          60

Ala Glu Glu Phe Gly Lys Thr Thr Lys Phe Ala Thr Pro Val Ile Glu
65          70          75          80

Ser Thr Gly Ser Gly Gly Gly His Lys Leu Phe Gly Glu Gly Asp Gly
85          90          95

Leu Ala Thr Pro Asp Ile Thr Asn Ser Ser Arg Arg Met Lys Lys Ser
100         105         110

Glu Phe Glu Arg Ala Gln Gln Asn Gly Val Lys Thr Ile His Glu Ala
115         120         125

Val Ile Gly Tyr Asp Gly Ile Val Val Ala Asn Ala Lys Ala Ala Pro
130         135         140

Ala Leu Lys Leu Ser Arg Lys Asp Ile Phe Met Ala Leu Ala Glu Glu
145         150         155         160

Val Pro Val Lys Gly Gln Leu Val Lys Asn Pro Tyr Lys Met Trp Asn
165         170         175

Gln Ile Asn Pro Ala Leu Pro Lys Gln Lys Ile Leu Val Tyr Gly Pro
180         185         190

Pro Thr Ser Ser Gly Thr Arg Asp Ala Phe Asp Glu Met Val Met Glu
195         200         205

Ala Ala Ser Lys Lys Met Thr Glu Tyr Gly Thr Ala Ala Gly Lys Tyr
210         215         220

Lys Lys Ile Arg Gln Asp Gly Val Tyr Val Pro Ser Gly Glu Asn Asp
225         230         235         240

Asn Leu Ile Val Gln Arg Ile Val Lys Asp Arg Asn Ala Val Gly Val
245         250         255

Phe Gly Tyr Ser Phe Leu Glu Glu Asn Ala Asp Arg Ile Lys Gly Ala
260         265         270

Thr Val Asp Gly Val Ala Pro Leu Pro Ala Asn Ile Thr Thr Gly Lys
275         280         285

Tyr Pro Val Ser Arg Asp Leu Phe Phe Tyr Val Lys Gly Ser His Leu
290         295         300

Ala Gln Val Lys Gly Leu Lys Glu Tyr Val Asp Leu Phe Leu Gly Glu
305         310         315         320

Lys Met Ile Gly Asp Tyr Gly Tyr Leu Lys Lys Ile Gly Leu Ile Pro
325         330         335

```

Leu Pro Lys Ala Lys Arg Asp Ala Val Arg Ala Ser Trp Thr Ala Lys
340 345 350
Lys Val Leu Ser Ala Ala Ser Leu Asp
355 360

<210> 19
<211> 341
<212> PRT
<213> Chromohalobacter

<400> 19

```

Met Asn Arg Ile Leu Lys Thr Thr Ala Leu Ala Ala Ala Val Met Ser
1      5      10      15
Val Ala Gly Val Ala Gln Ala Gln Asp Glu Thr Arg Glu Gln Leu Arg
20      25      30
Ile Val Gly Ser Ser Thr Val Tyr Pro Phe Ala Ser Tyr Val Val Glu
35      40      45
Glu Phe Gly Ala Thr Thr Asp Tyr Pro Thr Pro Val Ile Glu Ser Thr
50      55      60
Gly Ser Gly Gly Gly Leu Arg Leu Phe Cys Asn Gly Val Gly Leu Asp
65      70      75      80
Thr Pro Asp Ile Thr Asn Ala Ser Arg Arg Met Lys Pro Ser Glu Phe
85      90      95
Glu Arg Cys Gln Glu Asn Gly Val Thr Asp Ile Thr Glu Ala Lys Ile
100     105     110
Gly Tyr Asp Gly Ile Ala Phe Ala Glu Ser Asn Thr Asn Glu Pro Val
115     120     125
Asn Phe Thr Arg Glu Gln Leu Phe Leu Ala Leu Ala Ala Lys Val Pro
130     135     140
Gln Asp Gly Glu Leu Val Asp Asn Pro Tyr Thr Lys Trp Ser Asp Ile
145     150     155     160
Asp Ser Ser Leu Pro Asp Arg Glu Ile Met Val Tyr Gly Pro Pro Thr
165     170     175
Thr Ser Gly Thr Arg Asp Ala Phe Glu Glu Leu Val Met Glu Ala Ala
180     185     190
Ser Glu Glu Met Asp Ala Tyr Gly Gly Glu Gly Tyr Thr Asp Ile Arg
195     200     205
Gln Asp Gly Pro Tyr Val Asp Ala Gly Glu Asn Asp Asn Leu Ile Val
210     215     220
Gln Arg Leu Gln Glu Asn Thr Thr Ala Phe Gly Ile Phe Gly Tyr Ser
225     230     235     240
Phe Leu Glu Glu Asn Ala Asp Ser Leu Thr Ala Ala Ser Ile Asp Gly
245     250     255
Val Glu Pro Glu Pro Glu Ala Ile Ser Ser Gly Glu Tyr Pro Val Ser
260     265     270
Arg Ser Leu Phe Phe Tyr Val Lys Asn Gln His Ala Asp Ser Val Pro
275     280     285
Ala Met Tyr Pro Tyr Val Asp Leu Phe Met Ser Glu Gln Met Ile Ser
290     295     300
Pro Met Gly Tyr Leu Lys Gly Leu Gly Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asp
305      310      315      320
Ala Arg Glu Gln Ala Arg Ser Asp Val Glu Asn Arg Glu Ser Leu Glu
325      330      335
Leu Ser Asp Leu Lys
340

```

<210> 20
 <211> 377
 <212> PRT

<213> phaeobacteroides

<400> 20

Met Thr Lys Thr Tyr Ser Met Thr Ala Leu Leu Leu Met Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Phe Leu Ser Val Val Gly Cys Gly Pro Lys Ala Asp Gln Ala Ala Lys
 20 25 30
 Asp Gly Gln Ala Ala Ser Glu Thr Glu Gln Thr Gly Glu Ala Ile Glu
 35 40 45
 Ser Ala Arg Asp Tyr Ile Ser Val Val Gly Ser Ser Thr Val Tyr Pro
 50 55 60
 Phe Ala Thr Val Val Ala Glu Gln Phe Gly Lys Thr Ser Asp Phe Lys
 65 70 75 80
 Thr Pro Lys Ile Glu Ser Thr Gly Ser Gly Gly Gly Phe Lys Leu Phe
 85 90 95
 Ala Ala Gly Val Gly Val Glu His Pro Asp Ile Thr Asn Ala Ser Arg
 100 105 110
 Arg Ile Lys Lys Ser Glu Cys Glu Met Cys Ala Glu Asn Gly Val Ser
 115 120 125
 Glu Val Val Glu Leu Lys Ile Gly Tyr Asp Gly Ile Val Met Ala Asn
 130 135 140
 Ser Lys Lys Ala Glu Pro Phe Lys Val Ser Arg Lys Asp Ile Phe Leu
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Lys Glu Val Pro Asp Pro Asn Gly Glu Asp Gly Thr Leu
 165 170 175
 Val Ala Asn Pro Tyr Thr Thr Trp Lys Glu Val Asn Pro Glu Leu Pro
 180 185 190
 Glu Val Lys Ile Glu Val Leu Gly Pro Pro Pro Thr Ser Gly Thr Arg
 195 200 205
 Asp Ala Phe Val Glu Leu Ala Met Glu Ala Gly Ala Lys Glu Phe Ala
 210 215 220
 Trp Ile Lys Ala Leu Lys Lys Glu Asp Lys Asp Lys Phe Lys Gln Ile
 225 230 235 240
 Ser His Thr Val Arg Glu Asp Gly Ala Tyr Val Glu Ala Gly Glu Asn
 245 250 255
 Asp Asn Leu Ile Val Gln Lys Leu Asp Ala Asn Pro Asp Ala Leu Gly
 260 265 270
 Val Phe Gly Phe Ser Phe Leu Asp Gln Asn Lys Asp Lys Val Gln Gly
 275 280 285
 Ser Phe Val Asp Gly Val Glu Pro Ala Phe Ser Ala Ile Ala Asp Gly
 290 295 300

```

Ser Tyr Pro Leu Ser Arg Pro Leu Tyr Phe Tyr Val Lys Lys Ala His
305                               310                               315                               320

Val Gly Thr Ile Pro Gly Met Gln Glu Tyr Leu Thr Glu Phe Thr Ser
                               325                               330                               335

Glu Lys Ala Trp Gly Asp Glu Gly Tyr Leu Thr Glu Lys Gly Leu Ile
                               340                               345                               350

Pro Met Pro Lys Glu Glu Arg Glu Lys Tyr Ala Asn Val Ala Met Glu
                               355                               360                               365

Leu Ile Ala Val Ser Cys Asp Glu Leu
                               370                               375
    
```

<210> 21
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Myco.pstA-2

 <400> 21

Met Gly Glu Ser Ala Glu Ser Gly Ser Arg Gln Leu Pro Ala Met Ser
1 5 10 15

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

Trp Trp Ala Ala Cys Val Cys Cys Leu Ala Val Val Ile Thr Pro Thr
35 40 45

Leu Trp Met Leu Ile Gly Val Val Ser Arg Ala Val Pro Val Phe His
50 55 60

Trp Ser Val Leu Val Gln Asp Ser Gln Gly Asn Gly Gly Gly Leu Arg
65 70 75 80

Asn Ala Ile Ile Gly Thr Ala Val Leu Ala Ile Gly Val Ile Leu Val
85 90 95

Gly Gly Thr Val Ser Val Leu Thr Gly Ile Tyr Leu Ser Glu Phe Ala
100 105 110

Thr Gly Lys Thr Arg Ser Ile Leu Arg Gly Ala Tyr Glu Val Leu Ser
115 120 125

Gly Ile Pro Ser Ile Val Leu Gly Tyr Val Gly Tyr Leu Ala Leu Val
130 135 140

Val Tyr Phe Asp Trp Gly Phe Ser Leu Ala Ala Gly Val Leu Val Leu
145 150 155 160

Ser Val Met Ser Ile Pro Tyr Ile Ala Lys Ala Thr Glu Ser Ala Leu
165 170 175

Ala Gln Val Pro Thr Ser Tyr Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Leu
180 185 190

Pro Ala Gly Trp Ala Leu Arg Lys Ile Val Leu Lys Thr Ala Met Pro
195 200 205

Gly Ile Val Thr Gly Met Leu Val Ala Leu Ala Leu Ala Ile Gly Glu
210 215 220

Thr Ala Pro Leu Leu Tyr Thr Ala Gly Trp Ser Asn Ser Pro Pro Thr
225 230 235 240

Gly Gln Leu Thr Asp Ser Pro Val Gly Tyr Leu Thr Tyr Pro Ile Trp
245 250 255

Thr Phe Tyr Asn Gln Pro Ser Lys Ser Ala Gln Asp Leu Ser Tyr Asp
260 265 270

Ala Ala Leu Leu Leu Ile Val Phe Leu Leu Leu Leu Ile Phe Ile Gly
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Trp Leu Ser Arg Arg Arg Trp Asp Val
290 295 300

<210> 22
<211> 252
<212> PRT
<213> Pseudomonas

<400> 22

Met Ser Asn Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Ala Val Thr Ala
 1 5 10 15
 Ser Phe Ala Trp Leu Glu Ile Asp Phe Gly Ala Leu Phe Gly Ala Asp
 20 25 30
 Ser Leu Arg Gln Met Gly Asp Tyr Ala Ser Gly Phe Leu Ser Pro Asp
 35 40 45
 Phe Ser Pro Ala His Leu Leu Ala Ile Gly Arg Gly Ala Leu Glu Thr
 50 55 60
 Leu Ala Met Ser Ala Ile Gly Thr Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Leu Leu Ala Leu Pro Ala Ser Gly Arg Cys Gly Leu Pro Ala Asn Ala
 85 90 95
 Ala Ala Arg Leu Leu Leu Asn Ala Leu Arg Ala Ile Pro Glu Leu Val
 100 105 110
 Trp Ala Ala Leu Met Val Leu Ala Ala Gly Leu Gly Pro Asn Ala Gly
 115 120 125
 Thr Leu Ala Leu Ala Leu His Thr Ala Gly Val Leu Gly Arg Leu Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ala Leu Glu Asn Ile Pro Gly Glu Pro Ala Glu Ala Val Arg
 145 150 155 160
 Leu Ala Gly Gly Gly Arg Val Ala Ala Phe Cys Tyr Gly Thr Leu Pro
 165 170 175
 Gly Val Trp Pro Gln Leu Leu Ala Tyr Thr Leu Tyr Arg Trp Glu Asn
 180 185 190
 Asn Ile Arg Met Ala Ser Val Leu Gly Phe Val Gly Ala Gly Gly Leu
 195 200 205
 Gly Gln Met Leu Tyr Leu Ser Leu Ser Leu Phe Gln Glu Ala Gln Ala
 210 215 220
 Ala Thr Val Ile Leu Ala Met Leu Ser Leu Val Leu Gly Val Asp Ala
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Trp Gly Arg His Arg Trp Val Trp Asn
 245 250

<210> 23
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> Thermocellum

<400> 23

Met Lys Lys Met Lys Arg Ile Val Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Phe Ile Thr Gly Cys Ala Thr Glu Asn Asn Asn Glu Ile Val Val Val

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de unión a fosfato que experimenta un cambio conformacional desde una conformación inicial a una conformación final después de la unión al fosfato, en la que la proteína porta una primera marca y una segunda marca que pueden exhibir apilamiento molecular y en la que el apilamiento molecular se altera al cambiar de una conformación a la otra.
2. La proteína de la reivindicación 1, en la que la primera y segunda marcas pueden exhibir apilamiento molecular (a) en la conformación inicial pero no en la conformación final, o (b) en la conformación final pero no en la conformación inicial.
- 10 3. La proteína de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la proteína de unión a fosfato es una proteína PhoS de *E. coli*.
4. La proteína de la reivindicación 3, en la que la proteína PhoS incluye dos sustituciones de cisteína, para la unión de la primera y la segunda marcas.
5. La proteína de la reivindicación 4 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.
- 15 6. La proteína de cualquier reivindicación precedente, en la que la primera y segunda marcas incluyen fluoróforos.
7. La proteína de la reivindicación 6, en la que la primera y segunda marcas incluyen un grupo xanteno.
8. La proteína de la reivindicación 7, en la que la primera y segunda marcas incluye una rodamina.
9. La proteína de cualquier reivindicación precedente, en la que la primera y segunda marcas incluyen fluoróforos unidos a la proteína por medio de ligadores de haloacetamida.
- 20 10. La proteína de la reivindicación 9, en la que la rodamina es 6 IATR.
11. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la primera y segunda marcas pueden apilarse en la conformación inicial.
12. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la primera y segunda marcas pueden apilarse en la conformación final.
- 25 13. Un procedimiento para detectar fosfato inorgánico en una muestra, que comprende las etapas de: (i) mezclar la muestra con la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y (ii) detectar un cambio en la mezcla que surge de la interacción entre el fosfato inorgánico y la PBP. El cambio detectado en la etapa (ii) se puede relacionar con la concentración del fosfato inorgánico en la muestra.
14. Un kit que comprende una proteína de cualquier reivindicación precedente, y un limpiador de fosfato.

FIG. 1

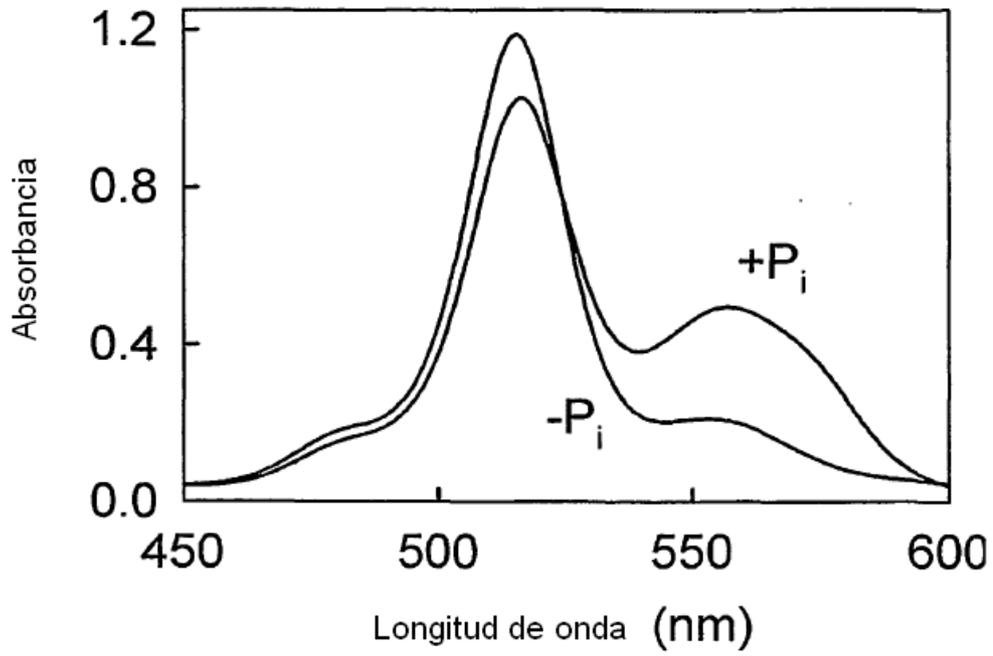


FIG. 2

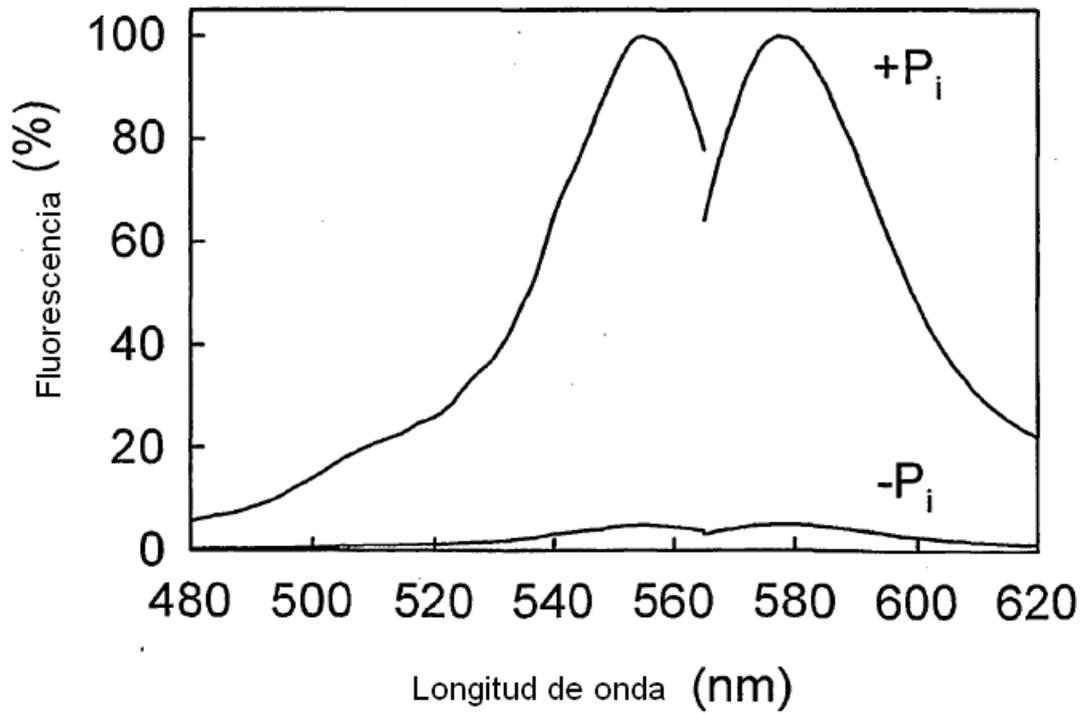


FIG. 3

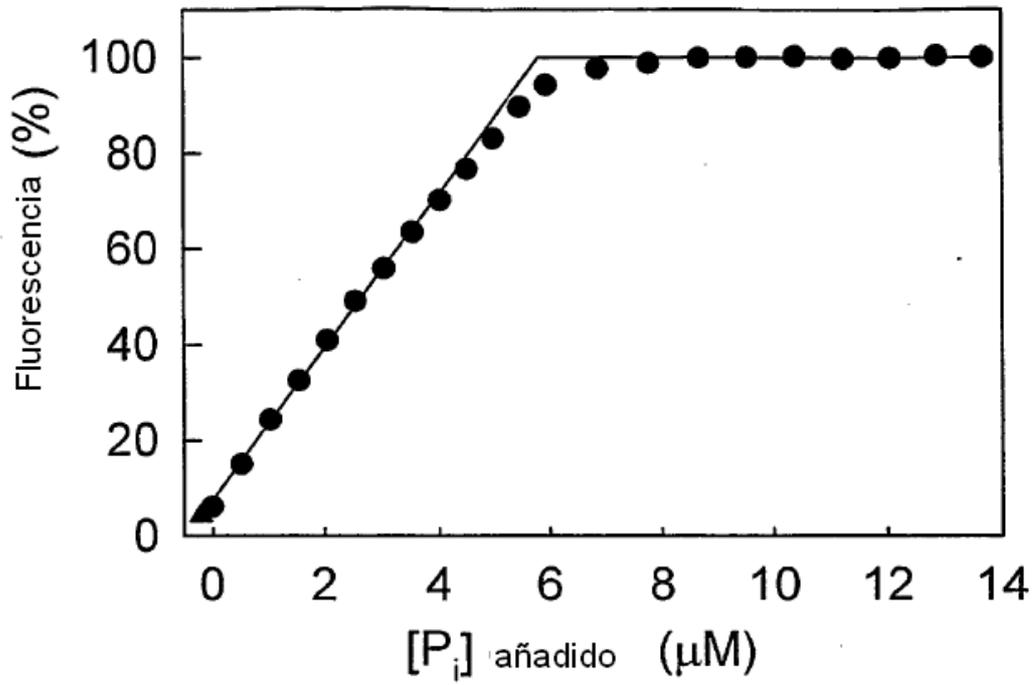


FIG. 5

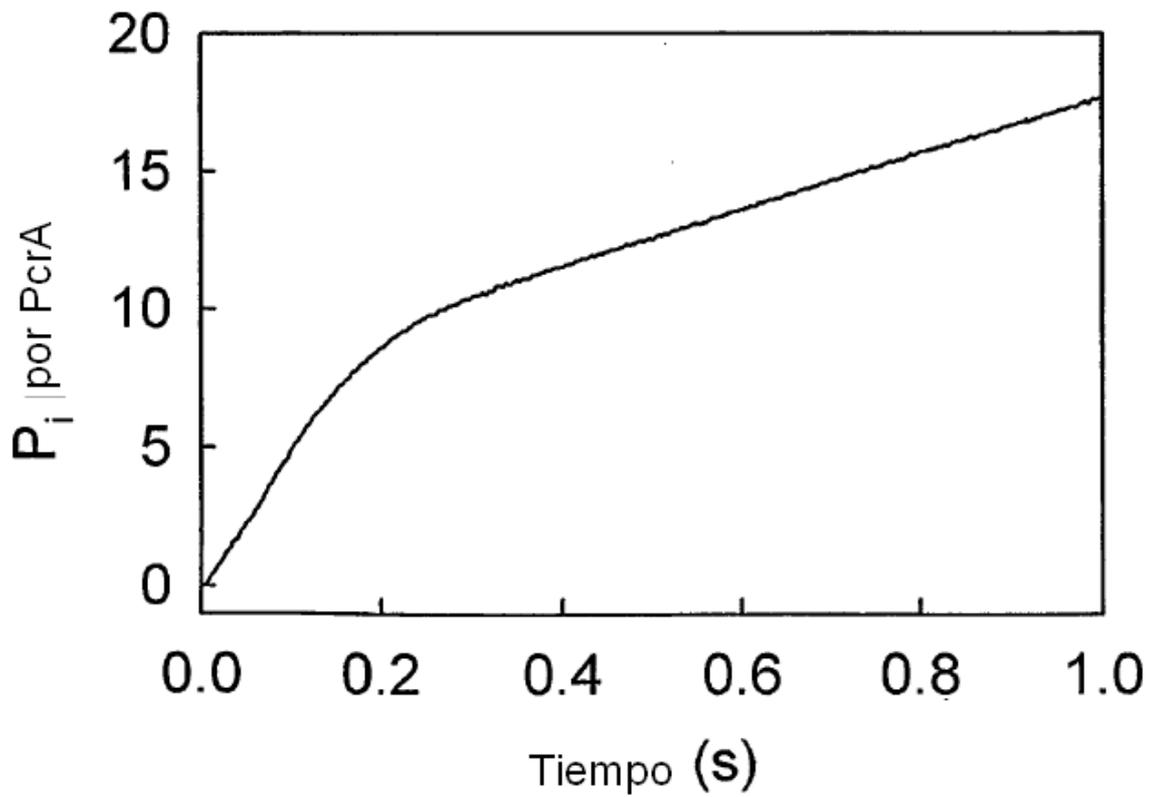


FIG. 4

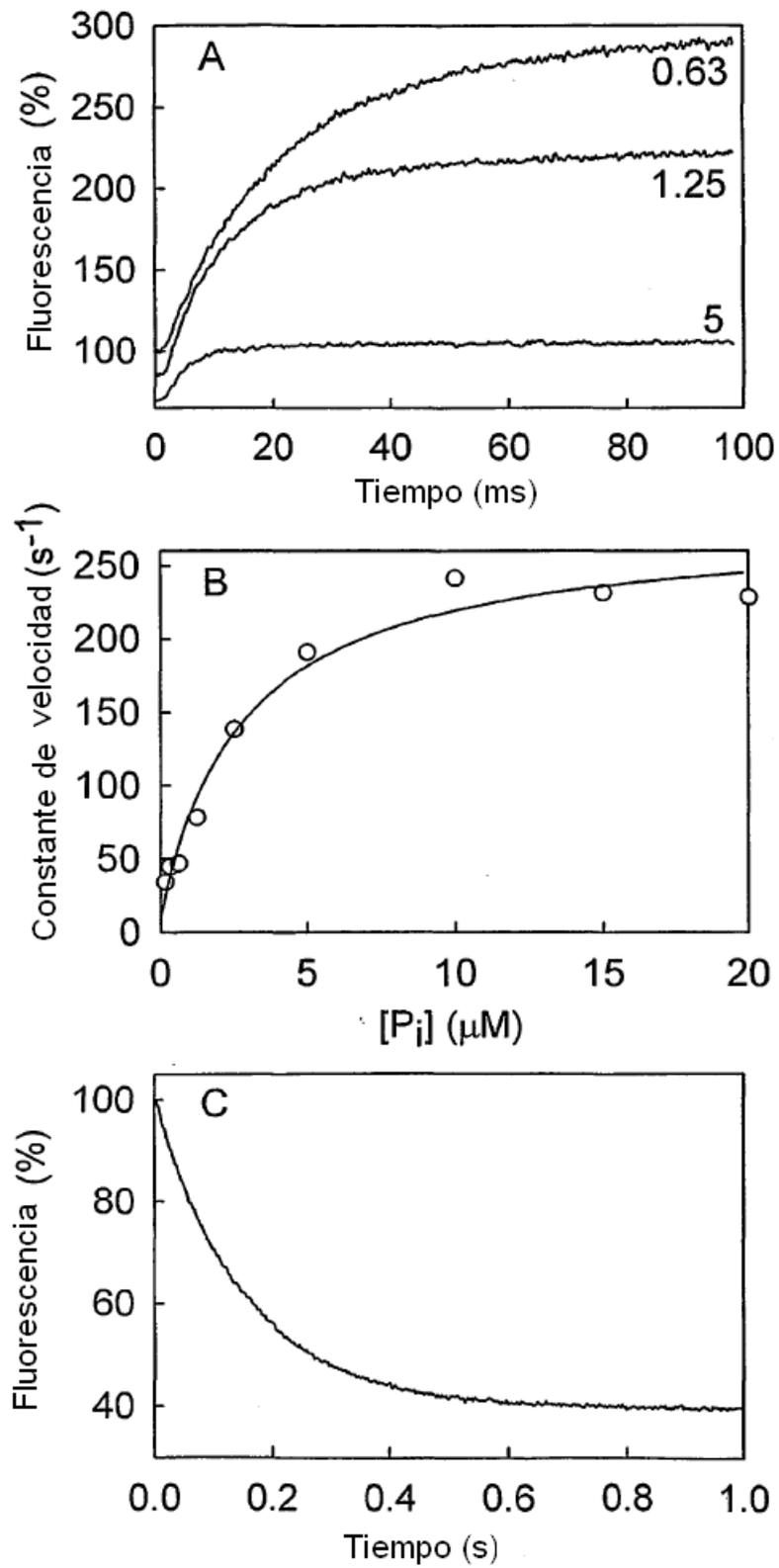
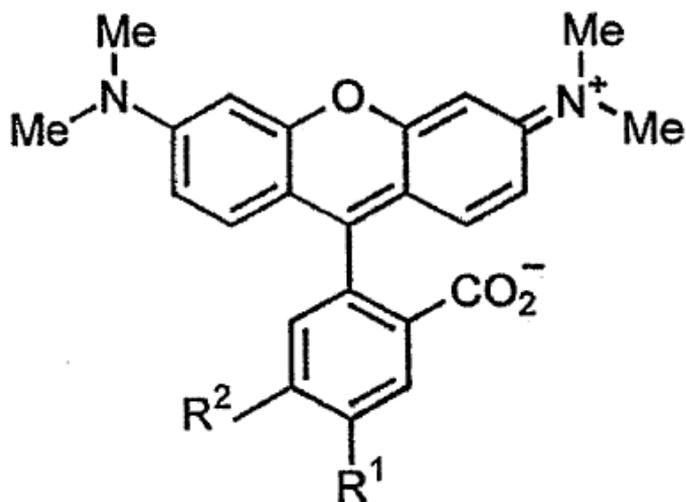


FIG. 6



5-IATR

$R^1 = \text{ICH}_2\text{CONH}$, $R^2 = \text{H}$

6-IATR

$R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{ICH}_2\text{CONH}$

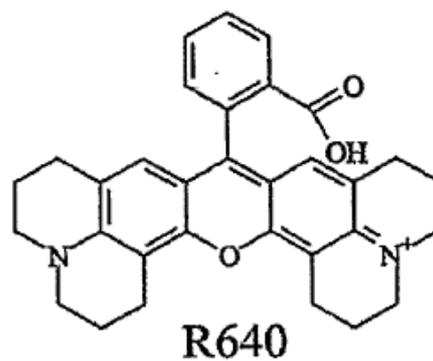
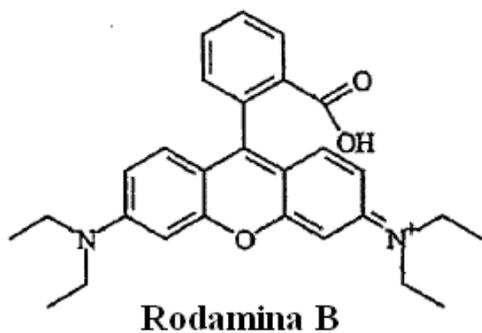
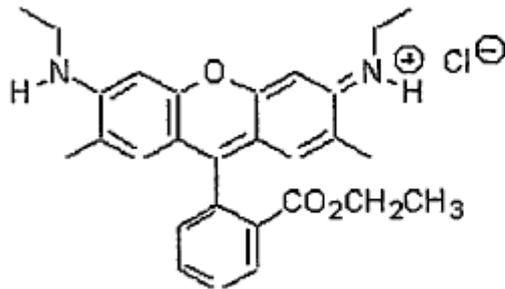


FIG. 6 (cont.)



Rodamina 6G

FIG. 7

Burkholderia	-----MS E P I M N F P G P D G A A L D A M R N R L Q R-----	25
Bradyrhizobium	-----M N P I Y S R R R R-----	10
Xylella	-----M S T A S Q H L Y K-----	10
Myco.pstA-1	-----M S P S T S I E A L D Q P V K P V V F R P L T L-----	24
Azotobacter	VEAEEVPRARLAASGLPVDADGGEFMTRELLKVG NRELFGADFNWVVGWLANPRKPESL	60
Bacteroides	-----M E I L N N T K A K-----	10
Salmonella	-----M A A T K P A F N P P G-----	12
Pasteurella	-----M L R R K T Q A E T N R-----	12
Myco.pstC-1.	-----M L A R A G E V G R A G P-----	13
Myco.pstC-2	-----M V T E P L T K P A L V A V D M-----	16
E.coli	-----M K V M R T T V A T V V A A T L S M S A F S V F A E A-----	27
Erwinia	-----M T S M H K T L A Q C V A L T L S L S A V S A L A A T-----	27
Xanthomonas	-----M R R T P L P C N G V L R D V I P I A T R S C S V I S I K S R L A V G V L A A A L-----	42
limicola	-----M R C Q L I M I F M F H T F N R Y P I M M I K R F W K T A F M A C A F A G L A T G S A E A R-----	46
Chromohalobacter	-----M N R-----I L K T T A L A A A V M S V A G V A Q A Q D E T R-----	28
phaeobacteroides	-----M T K T Y S M T A L L M L A G F L S V V G C G-----P K A D Q A A K D G Q A A S E T E Q T G E A I E S A R-----	51
Myco.pstA-2.	-----M G E S A E S G S R Q L P A M S P P R R S V A Y-----	24
Pseudomonas	-----M S N A L L L L G-----	9
Thermocellum	-----M K K M K R I V L T V T I L A L F I T G-----	20

Fig 7 (cont)

Burkholderia	----KRKAVNAIALTAS-----	-----LGAMAFGLLVLVWILYT----	TVHLG 60
Bradyrhizobium	----KDIVVRGLCIAA-----	-----AAFGVTWLALILIT----	LLYNG 41
Xylella	----RRRLINATAITIS-----	-----CIAALFGLFFLIWILWT----	LISKG 45
MycopstA-1	----RRRIKNSVATTF-----	-----FTSFVVALIPLVWLLWV----	VIARG 59
Azotobacter	VVFERREWGNFYGYLLGVKESGRLVAEGEGAWKELLSRIERVAGLHEQLAQ---	-----LERAD	116
Bacteroides	----RRSQGIAFGIFR-----	-----LLS-LCIVLILFAILGF----	IYKG 43
Salmonella	----KKG---DMIFSALV-----	-----KLAALIVLLMLGGIIVS----	LISS 45
Pasteurella	----LNHHIELELFRQPT-----	-----RFFAIFVFLLLAAVMTS----	LVFGS 48
MycopstC-1.	AIRWLGIGAVIPLLALV-----	-----LVLVVIVIEAMGAIRLNGLHFFTATE	57
MycopstC-2	RPARRGERLFKLAASAAG-----	-----STIVIAILLIAIFLLVR----	AVPS 55
E.coli	-----SLTGAGATFPAP-----	-----VYAKWADTYQKETGNKVN--	YQIGS 63
Erwinia	-----NLTGAGGTFPAP-----	-----VYNKWAAEYHTATGSQVN--	YQIGS 63
Xanthomonas	AMGAQAADVTGAGASFIYP-----	-----VMSKWSADYNTATKKQVN--	YQIGS 85
limicola	-----EQIRIVGSSTVFP-----	-----FASYVAEEFGKTKFATP--	VIESTG 83
Chromohalobacter	-----EQLRIVGSSTVYP-----	-----FASYVVEEFGATTDYPTP--	VIESTG 65
phaeobacteroides	-----DYISVVGSSSTVYP-----	-----FATVVAEQFGKTSDFKTP--	KIESTG 88
MycopstA-2.	----RRKIVDALWAAACVC-----	-----CLAVVITPTLWMLIG----	VVSRA 59
Pseudomonas	-----LAAVTASFANLEIDFG-----	-----ALFG	30
thermocellum	-----CA TENNNEIVVVSRE---	-----EGSGT	40

Burkholderia	VGGLS-----	65
Bradyrhizobium	IAGLN-----	46
Xylella	LPGIG-----	50
MycopstA-1	WFAVTRS-----	66
Azotobacter	IGRVNHALERLRLKERGLELGGDLADADAQADLAAERAQWGVRYRELESQLVVLQQEFNRD	176
Bacteroides	IGVIS-----	48
Salmonella	WPSIQKFG-----	53
Pasteurella	WDSFSTFG-----	56
MycopstC-1.	WNPNTYG-----	65
MycopstC-2	LRANHANF-----	63
E.coli	SGGVKQIIA-----	72
Erwinia	SGGVKQIIA-----	72
Xanthomonas	GGGIAQIKA-----	94
limicola	SGGGHKLFG-----	92
Chromohalobacter	SGGGLRLFC-----	74
phaeobacteroides	SGGGFKLFA-----	97
MycopstA-2.	VPVFH-----	64
Pseudomonas	ADSLRQMG-----	38
thermocellum	RGAFIELFG-----	49

Fig 7 (cont)

Burkholderia	-----LQ LFTESTPAPNTEGGGLAN	85
Bradyrhizobium	-----LE I FVADTPPPGSTEGLRN	66
Xylella	-----LD LFTKITPPP-MQKGGLAN	69
Myco.pstA-1	-----GW WTHSLRGVLPSEQFAGGVYH	87
Azotobacter	SVLVRTADGREEEITLGKVVRAYQPNAMGLGEKFGFYFAKLWEFVSDEPREANTEGGIFP	236
Bacteroides	-----WD FLTTAPTDMGTGGGIWP	67
Salmonella	-----FS FLWTKWDAPNDIYGALV	73
Pasteurella	-----FS FLWHNDWNPVQESYGAI	76
Myco.pstC-1.	-----ET VVTDGVAHPVGAYYGALP	85
Myco.pstC-2	-----FT STQFDTSDEQLAFGVRD	83
E.coli	-----NT VDFGASDAPLSDEKLAQEG	93
Erwinia	-----KT ADFGASDAPMKDEDLAKNG	93
Xanthomonas	-----AS VDFGSSDAPLKPPELAAAG	115
limicola	-----EG DGLATPDITNSSRRMKKSE	113
Chromohalobacter	-----NG VGLDTPDITNASRRMKPSE	95
phaeobacteroides	-----AG VGVEHPDITNASRRMKKSE	118
Myco.pstA-2.	-----WS VLVQDSQNGGGGLRN	81
Pseudomonas	-----DYASGFLSPDFSPAHLA	56
thermocellum	-----IE EKDSNGNKVDKTTDEAT	68
Burkholderia	AIVGSLLLCGFGLVGTPIGILAGVYLAEYQKNLLASTIRFINDILLSAPS-----	137
Bradyrhizobium	AIVGSIIMTVLGVGIGAPLGLFAGTYLAEYGRNDRLTSVIRFINDILLSAPS-----	118
Xylella	AFFGSAIMCLLAIIVIGTPLGIAAGTWLAEYGNSTKTSAVVRFVNDILLSAPS-----	121
Myco.pstA-1	ALYGTLVQAGVAALVAVPLGLMVAVYLVEYG-TGRMSRVTTFTVDVLAGVPS-----	138
Azotobacter	AIFGTVMMTLIMAVLVTPFGVLAAILREYAKQGPLTRVIRIIVNNLAGVPA-----	288
Bacteroides	AIVGTFYLMVGSALFAPVGMVSGIYMNEYAPKGLVRFIRVMTNNSGIPS-----	119
Salmonella	PIYGLTVTSFIALLIIVPVSFGIALFLTELA-PGWLKRPLGIAIELLAAIPS-----	124
Pasteurella	PIVGLTITSFLALIIVPVSFGIAIFLTELA-PEWLRRPVGTAIEMLAAIPS-----	127
Myco.pstC-1.	LIVGTLATSIALIIVPVSFGAALVIVERL-PKRLAEAVGIVLELLAGIPS-----	136
Myco.pstC-2	LFMVTALSSITALVAVPVAVGIAVFLTHYA-PRRLSRPFGAMVDLLAAVPS-----	134
E.coli	LFQFPTVIGGVVAVLNIPGLKSGELVLDGKTLGDIYLGKIKKWDDEAIAKLN-----PG	147
Erwinia	LFQFPTVIGGVVAVLNIPGIKSGELTLDGKTVGDIYLGTVKKWNDPAITKLN-----PG	147
Xanthomonas	LAQFPSVIGGVVAVLNIPGIAAGAVKLDGKTLGDIYLGKVTWNDAIIVALN-----PG	169
limicola	FERAQ--QNGVKTIHEAVIGYDGIIVANAKAAPALKLSRKDI FMALAEVPEV-----VKGQL	167
Chromohalobacter	FERCQ--ENGVTDITEAKIGYDGIIFAESNTNEPVNFTREQLFLALAAKVP-----QDGEL	149
phaeobacteroides	CEMCA--ENGVSEVVELKIGYDGIIVMANSKKAEPFKVSRKDI FLALAKEVDPNGEDGTL	176
Myco.pstA-2.	AIIGTAVLAIGVILVGGTVSVLTGIYLSFEA-TGKTRSILRGAYEVLGIPS-----	132
Pseudomonas	IGRGALETLAMSAGTLLAALLG--LLLALPASGRCLPANAAARLLLNALR-----	106
thermocellum	VVNSTSVVMTTVAGNKNSIGYISLGLSNDTVKAVKVDGVEPTVENIKNNTYK-----	120

Fig 7 (cont)

Burkholderia	IVIGLFVYAIIVVAKSG-----RF SGWAGVIALALLQIPI	171
Bradyrhizobium	IIIGLFIYGAVVPMR-----GF SAIAGSLALAVIVIPV	152
Xylella	IVLGLFVYTYLVMTGG-----HF SAFSGALALVFIVLPI	156
Myco.pstA-1	IVAALFVFSLWIATLGF-----QQ SAFAVALALVLLMLPV	173
Azotobacter	IVYGVFGLGFFVYVVGSSIDRLLFAEA-----LPAPTFGTPGLLWASLTLAILAVPV	340
Bacteroides	IVFGLFGMALFVNYMD-----FG DS-ILAGSLTLGLLVCVPL	154
Salmonella	IVYGMWGLPI FAPLFATYFQEPVGNILSNIPFVGALFSGPAFGIGILAAGVILAIMIIPY	184
Pasteurella	IIYGMWGLPI FVPLFQEHIQPSLIEWFGDLPVFSYLFSGAPFGIGLFTAGLVLAIMIIPF	187
Myco.pstC-1.	VVGLWGAMTFGPFIAHHPVIAHNAPDVPVNLNLRGDPGNEGMLVSLVLAVMVVI	196
Myco.pstC-2	IIFGLWGI FVLAPKLEP-IARFLNRNLGWLFLFKQGNVSLAGGGTIFTAGIVLSVMILPI	193
E. coli	LKLPSQNI AVVRRADGSGTSFVFTSYLAKVNEEWKNNVGTGSTVVKWPIGLGGKNGDIAA	207
Erwinia	VKLPDANIN VVRRADGSGTSFVFTSYLSKVNDWSSKVKGSTVNWPVGLGGKNGDVAA	207
Xanthomonas	VKLPDSKITV VHRSDGSGTSFNFNTNLSKVNPDKWSKVGEGTAVQWPTGIGGKNEGVA	229
limicola	VKNPYKMWNQINPALPKQKILVYGPP TSSGTRDAFDEMVEAASKMTEYGTAAAGK----	223
Chromohalobacter	VDNPTYKWSDI DSSLPDREIMVYGPPTTSGTRDAFEELVMEASEEMDAYGEGE-----	203
phaeobacteroides	VANPYTTWKEVNP ELPEVKIEVLGPPPTSGTRDAFVELAMEAGAKEFAWIKALKKEDKDK	236
Myco.pstA-2.	IVLGYVGYLALVVYFD-----WG FSLAAGVVLVSVMSIPY	167
Pseudomonas	AIPELVWAALMVLAAG-----LGP NAGTLALALHTAGV	139
thermocellum	VFRPFIIATKENPGE LT-----QD FISFILSSDQKVV	153
Burkholderia	VIRTTENMLKLVPNALREAAVALGTPKWRMVLKITLRASVGGIVTGVLLAVARIAGETAP	231
Bradyrhizobium	VLRTTEDMLLLVPNALREAAVALGTPKWRMVLKITLRASVGGIVTGVLLAVARIAGETAP	212
Xylella	VVRTTDEMLRLVPGQMREAAALS LGIPQWKMI IQVLYRSASAGILT GILLALARISGETAP	216
Myco.pstA-1	VVRAGEEMLRLV PDELREASYALGVPKWKTIVRIVAPIAMP GIVSGILLSIARVVGETAP	233
Azotobacter	VIVATEEGLARI PRALREGSLALGATKAETLWKVVLPMAS PAMMTGLILAVARAAGEVAP	400
Bacteroides	VIRTTTEALKAI PDSMREGSRALGATKLQTIWHVILPMGMPNIITGLILALGRVSGETAP	214
Salmonella	IAAVMRDVFEQT PVMKESAYGIGCTTWEVIWRIVLPFTKNGVIGGIMLGLGRALGETMA	244
Pasteurella	IAAVMRDVFTIV PAILKESAYGLGTTWEVMWKVVL PYTKTVGGIMLGLGRALGETMA	247
Myco.pstC-1.	IATTHDLFRQVPVLPREGAIALGMSNWEVRRVTLPWSSGIVGAVVLGLGRALGETMA	256
Myco.pstC-2	VTSISREVFRTPLIQIEAALALGATKWEVVRMTVLPYGRSGVVAASMLGLGRALGETVA	253
E. coli	FVQRLPGAIGYVEYAYAKQNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFACAAKADWSTK--FAQD	265
Erwinia	FVQRLPGSVGYVEYAYAKQNSLAYTKLVDADGKAIAPSEKSFSDAAKADWSTK--FAQD	265
Xanthomonas	YVKQIKGGIGYVELSYALQNKMAYTAMKNAAGK FVQPSDETFAAAANSADWGSSKDFYLV	289
limicola	----YKKIRQDGVYVPSGENDNLIVQRIVKDRNAVGVFGYSFLEENADRIKATVDGVAP	279
Chromohalobacter	----YTDIRQDGPYVDAGENDNLIVQRLQENTTAFGIFGYSFLEENADSLTAASIDGVEP	259
phaeobacteroides	FKQISHTVREDGAYVEAGENDNLIVQKLDANPDALGVFGFSFLDQNKDKVQGSFVDGVEP	296
Myco.pstA-2.	IAKATESALA QVPTSYREAAEALGLPAGWALRKIVLKTAMP GIVTGMVALALAIGETAP	227
Pseudomonas	LGRLFAEALENI PGEPAEAVRLAGGGRVAAF CYGTLPGVWPQLLAYTLRWENNIRMASV	199
thermocellum	EENSYIAASEKGPYSSTKPSGKIVIAGSSSVT PLMEKLKEAYLKVNTNAEIEIQASDSTT	213

Fig 7 (cont)

Burkholderia	LLFTALSNQFFSWDMSQP-----MANLPVTIYKFAMSP--FAEWQSLAWAGVFLIT	280
Bradyrhizobium	LLFTALSNQFFSLGLNKT-----MANLPVTINNFVQSP--YAYWKQLAWSGALLIT	261
Xylella	LLFTAFGNQYWSSNIFQP-----IASLPLVMNQFASSP--YKSWQLLAWSGALVLT	265
Myco.pstA-1	VLVLVGYSHSINLDVFHGN-----MASLPLLIYTELTNP--EHAGFLRVWGAALTLI	283
Azotobacter	LMLVGVVKLAPSLPVDGNYPYLHLDQKIMHLGFHIYDVGFQSPNVEAARPLVYATALLV	460
Bacteroides	ILFTCAAYFLPQLPTS-----ILDQCMALPYHLYVISTSGTDMEAQLPLAYGTALVLI	267
Salmonella	VTFIIGNTYQLDSASLYMP-----GNSITSALANEFAEAES---GLHVAALMELGLLIF	295
Pasteurella	VTFVIGNAFHLP-ESLFS-----STSIASAIANEFNEAS---GLQKSALMELGLLIF	296
Myco.pstC-1.	VAMVSGAVLGAMPANIYAT-----MTTIAATIVSQLDSAMTDSTNFAVKTLAEVGLVLM	310
Myco.pstC-2	VLVILRSAARPGTWSLFDG-----GYTFASKIASAASEFSEP---LPTGAYISAGFALF	304
E. coli	LTNQKGEDAWPITSTTFILIH--KDQKKPE-QGTEVLKFFDWAYKTGA-KQANDLDYASL	321
Erwinia	LTFOKGDNAWPITSTTFILVH--KEQANTA-KGAAVLQFFDWAYKNGG-KTTSALDYASL	321
Xanthomonas	MTNAAGDNAWPITATNFILVQ--KKPKNPA-GLKNTLEFFRWVYSKGD-AQAKALDYVPL	345
limicola	LPANITTKGYPVSRDLFFYVK--GSHLAQVKGLKEYVDLFLGKMGIDYGKLGKIGLIPL	337
Chromohalobacter	EPEAISSGEYPVSRSLFFYVK--NQHADSVPAMYYPVDLFMSEQMISPMGYLKGGLIPL	317
phaeobacteroides	AFSAIADGSYPLSRPLYFYVK--KAHVGTIPGMQEYLTEFTSEKAWGDEGYLFEKGLIPL	354
Myco.pstA-2.	LLYTAGWSNSPPTGQLTDS-----PVGYLTYPIWTFYNQP--SKSAQDLSYDAALLLI	278
Pseudomonas	LGFVGAGGLGQMLYLSL-----LFQEAQAATVILAML	232
thermoceilum	GMKLAMEGTCDIGMASRELKE-----SELKKLKPTVIAMDGLVIVNKENPV	260

Burkholderia	LGVLGLNVLARSIFSCK-----	297	<SEQ ID NO: 5>
Bradyrhizobium	ITVLALNIGARILGAERTAK-----	281	<SEQ ID NO: 6>
Xylella	VFVLLVSLGARTLLLRNKIPNE-----	287	<SEQ ID NO: 7>
Myco.pstA-1	IVVATINLAAAMIRFVATRRR-----	304	<SEQ ID NO: 8>
Azotobacter	LVIALLNLSAVYIRNRLREKYKALDH--	486	<SEQ ID NO: 9>
Bacteroides	VIIILLVLLANALRKYFEKKVKMN----	291	<SEQ ID NO: 10>
Salmonella	VITFIVLAASKFMIMRLAKNEGAR----	319	<SEQ ID NO: 11>
Pasteurella	LITTVVLSISRLLIMRIEKKEGRK----	320	<SEQ ID NO: 12>
Myco.pstC-1.	VITLLTNVAARGMVRVRSRTALPVGRGI	338	<SEQ ID NO: 13>
Myco.pstC-2	VLTFLVNAAARAIAGGKVNG-----	324	<SEQ ID NO: 14>
E. coli	PDCVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY---	346	<SEQ ID NO: 15>
Erwinia	PAPVVEQIRAAWKSNVKDSSGKALY---	346	<SEQ ID NO: 16>
Xanthomonas	PDTLVSQIEAYWAKTLPR-----	363	<SEQ ID NO: 17>
limicola	PKAKRDAVRASWTAKKVLASAASLD----	361	<SEQ ID NO: 18>
Chromohalobacter	PEDAREQARSVDENRESLELSDLK----	341	<SEQ ID NO: 19>
phaeobacteroides	PKEEREKYANVAMELIAVSCDEL-----	377	<SEQ ID NO: 20>
Myco.pstA-2.	VFLLLLIFIGRLINWLSRRRWDV-----	301	<SEQ ID NO: 21>
Pseudomonas	SLVLGVDALSGWRHRVWVN-----	252	<SEQ ID NO: 22>
thermoceilum	SNLTSQIKGIFKGETSWNEVAK----	284	<SEQ ID NO: 23>