

MICHAŁ M. SIKORSKI

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

IDENTYFIKACJA GENÓW ROŚLINNYCH I ICH EKSPRESJA W BAKTERYJNYM UKŁADZIE EKSPRESYJNYM

ROLA BIAŁEK W FUNKCJONOWANIU ORGANIZMÓW ŻYWYCH

Białka są podstawowymi składnikami każdej żywej komórki pełniąc szereg skomplikowanych funkcji biologicznych decydujących o prawidłowym rozwoju organizmu: (1) jako enzymy kierują wszystkimi procesami chemicznymi niezbędnymi dla utrzymania funkcji życiowych, (2) uczestniczą w aktywnym transporcie metabolitów przez błony komórkowe, (3) kontrolują wzrost i różnicowanie komórek, (4) są składnikami systemów obronnych, (5) kontrolują ekspresję genów, (6) są odpowiedzialne za koordynację ruchów, (7) uczestniczą w przekazywaniu impulsów nerwowych, (8) nadają sztywność strukturalną.

Poznanie struktury i funkcji biologicznej wielu białek stało się możliwe dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej i technologii rekombinacji DNA (wyodrębnienie pojedynczych genów lub ich fragmentów kodujących określone białka i ich ekspresji w heterologicznych układach komórkowych).

Zastosowanie białek różnych organizmów w przemyśle produktów spożywczych i farmakologii spowodowało rozwój technologii opierających się na metodach rekombinacji genów wykorzystywanych do szybkiego i stosunkowo łatwego uzyskiwania białek na dużą skalę. W ostatnim czasie obserwuje się duże zainteresowanie białkami, które mogą mieć zastosowanie w diagnostyce i zwalczaniu chorób. Znaczący postęp, jaki w ostatnich latach dokonał się w biologii molekularnej, doprowadził do opanowania produkcji specyficznych białek, takich jak: interferon, hormony, alergeny pyłkowe, składniki krwi, przeciwciała monoklonalne czy wreszcie enzymy hydrolityczne mające duże znaczenie handlowe.

ZALETY KOMÓRKOWYCH UKŁADÓW STOSOWANYCH DO PRODUKCJI REKOMBINOWANYCH BIAŁEK

UZYSKIWANIE BIAŁEK NA SKALĘ PREPARATYWNĄ

Uzyskanie jednorodnych preparatów białek z natywnej tkanki w ilościach wystarczających do podjęcia badań strukturalnych (oznaczenie struktury kry-

stalograficznej, analiza spektralna) i funkcjonalnych (aktywność biologiczna) jest często utrudnione ze względu na występowanie małych ilości tych białek w tkance. Należałoby wtedy przeprowadzić ekstrakcję z dużej ilości materiału wyjściowego. Pomocna w tej działalności badawczej okazała się technika pozyskiwania szczepów bakteryjnych, drożdży czy komórek zwierzęcych wykazujących nadprodukcję określonych białek po transformacji odpowiednimi wektorami plazmidowymi zawierającymi zintegrowany obcy gen danego białka. Następnie, w odpowiednio skonstruowanych układach komórkowych wywołuje się nadprodukcję obcego białka, które stosunkowo prostymi metodami chromatograficznymi oddziela się od pozostałych białek.

UKIERUNKOWANA MUTAGENEZA BIAŁEK

Technologia rekombinacji DNA stworzyła duże możliwości badania struktury i funkcji białek poprzez łatwe przeprowadzanie ukierunkowanej mutagenazy punktowej z zastosowaniem oligonukleotydów ze zmutowanym pojedynczym nukleotydem. Polega to na wytwarzaniu mutantów na poziomie sekwencji kodujących cDNA w reakcji PCR z użyciem zmutowanych oligonukleotydów i matrycy DNA, w której mutację należy wprowadzić (SIKORSKI i ROŻEK 1994).

PRODUKCJA BIAŁEK W PROCESACH BIOTECHNOLOGICZNYCH

Szczególną rolę w procesach biotechnologicznych pełnią enzymy. Technologia rekombinacji białek została wykorzystana nie tylko do produkcji dużych ilości enzymów, ale także do uzyskiwania enzymów o zwiększonej aktywności i trwałości. Ma to duże znaczenie dla wydajności procesów przemysłowych.

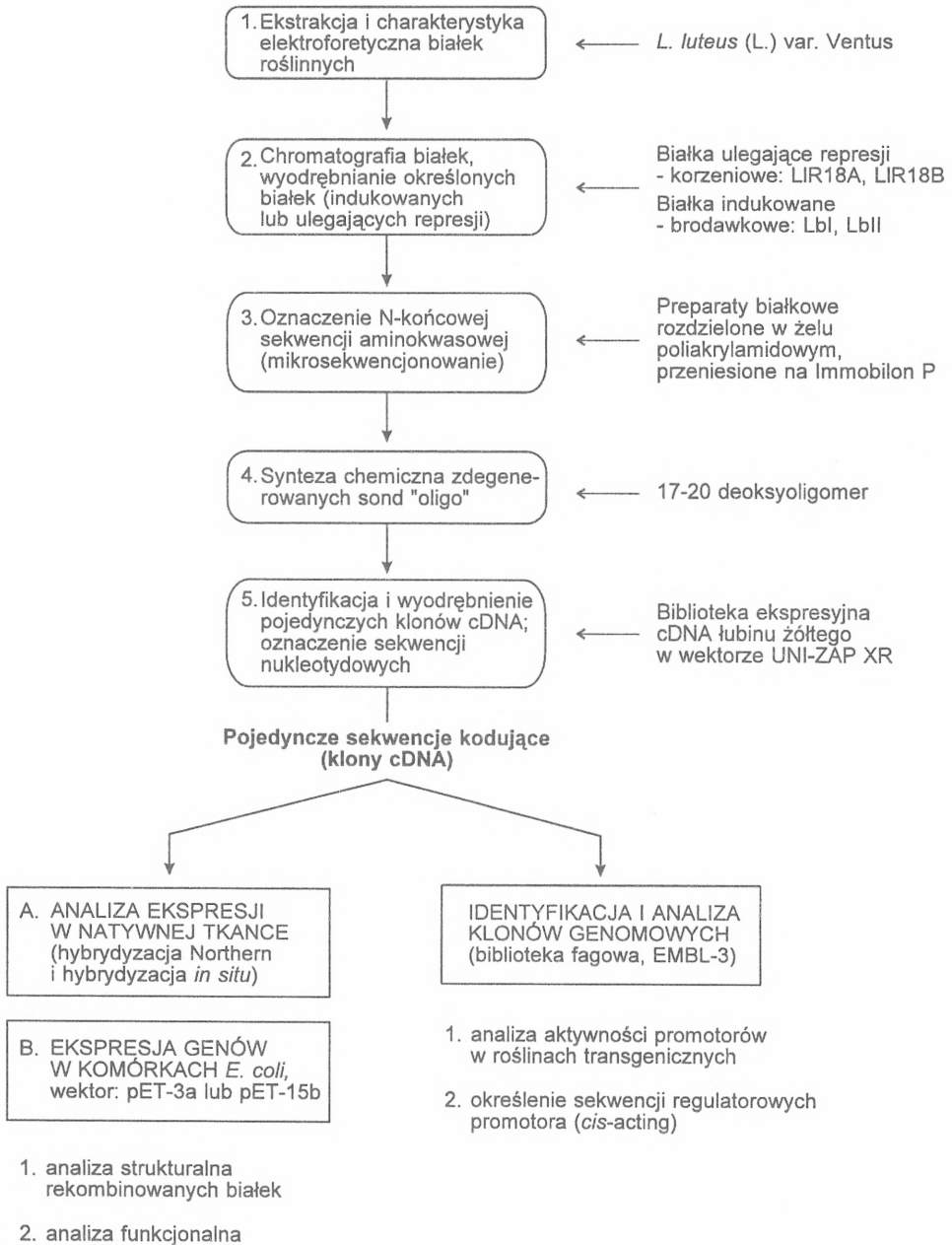
KIEROWANIE METABOLIZMEM KOMÓREK

Przykładem mogą być szczepy bakterii posiadające zdolność zwiększonej produkcji antybiotyku lub szczepy drożdżowe produkujące ze zwiększoną wydajnością etanol. W medycynie spotyka się wiele przypadków patologicznych, wymagających poprawienia metabolizmu pacjentów. Podobnie w przypadku roślin uprawnych czy zwierząt hodowlanych istnieje wielkie zainteresowanie w uzyskiwaniu odmian i gatunków o ulepszonych cechach (np. produkcja warzyw i owoców odpornych na mróz). Wymienione wyżej przykłady wymagają zastosowania technik rekombinacji DNA do produkcji białek o nowych, ulepszonych właściwościach. W tym przypadku rekombinowane białko jest produkowane *in situ* i wykorzystywane bezpośrednio przez odpowiedni organizm.

STRATEGIA POZYSKIWANIA SEKWENCJI KODUJĄCYCH BIAŁKA ROŚLINNE

Produkcja białek roślinnych w układach heterologicznych polega na transformacji komórek bakteryjnych, drożdżowych lub zwierzęcych odpowiednimi wektorami ekspresyjnymi z wprowadzoną do nich sekwencją kodującą obcy gen pod kontrolą określonego promotora. Indukcję transkrypcji obcego genu wywołuje się w odpowiedniej fazie wzrostu komórek. Produkcja białek w układach heterologicznych wymaga jednak posiadania klonów cDNA i znajomości ich

sekwencji nukleotydowej obejmującej pełną sekwencję kodującą dane białko. Przykładowa strategia izolacji pojedynczych sekwencji cDNA z roślin wyższych jest przedstawiona na rycinie 1. Procedura ta jest oparta na przeszukiwaniu bibliotek ekspresyjnych cDNA przygotowanych na bazie poli A⁺RNA wyodrębnio-



Ryc. 1. Ogólny schemat wyodrębniania i analizy sekwencji kodujących białka łubinu żółtego.

nego z tkanek na określonym etapie rozwoju rośliny za pomocą homologicznych sond molekularnych. Sondy projektuje się na podstawie oznaczonej N-końcowej sekwencji aminokwasowej oczyszczonych białek roślinnych. Mikrosekwencjonowanie około 30 N-końcowych reszt aminokwasowych wykonuje się automatycznie wykorzystując preparat białkowy w ilości około 0,5 pmola przeniesiony elektroforetycznie na odpowiednio modyfikowaną membranę (MATSUDAIRA 1993). Na podstawie znajomości sekwencji aminokwasowej białka projektuje się 17–20 deoksyoligonukleotydową sondę molekularną, którą następnie stosuje się do przeszukiwania biblioteki i izolacji pojedynczych klonów. Alternatywną metodą uzyskiwania homologicznych sond molekularnych jest różnicowa hybrydyzacja sekwencji cDNA z frakcjami mRNA z tkanek roślinnych i selekcja tą drogą sekwencji specyficznych dla określonego etapu rozwoju rośliny (np. z korzeni rośliny motylkowatej nieinfekowanej i infekowanej bakteriami symbiotycznymi rodzaju *Rhizobium*).

EKSPRESJA REKOMBINOWANYCH BIAŁEK — WYBÓR UKŁADU EKSPRESYJNEGO

Wydajność ekspresji białek w różnych układach ekspresyjnych jest bardzo zróżnicowana. Należy więc wybrać odpowiedni układ komórkowy drogą eksperymentalną. Najbardziej rozpowszechnionymi układami są: komórki bakteryjne (*Escherichia coli*), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz komórki zwierzęce. Wybór układu ekspresyjnego jest podyktowany rodzajem białka poddanego ekspresji. Ogólna charakterystyka wymienionych wyżej układów ekspresyjnych podana jest w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka komórkowych układów ekspresyjnych

Bakterie	wygodne do hodowli w fermentorach, duża wydajność ekspresji (0,1–5g/l), stosowane przede wszystkim do białek bakteryjnych, białka posiadają N-końcową metioninę, nie zachodzą posttranslacyjne modyfikacje (np. glikozylacja), białka eukariotyczne tworzą zwykłe ciała inkluzyjne, łatwe do oczyszczania, trudne do renaturacji, najlepiej stosować bakteryjne sygnały sekrecyjne nie wycinają intronów.
Drożdże	wygodne do hodowli w fermentorach, dobra wydajność ekspresji (0,1–1g/l), najlepiej stosować do białek drożdżowych, ale także do innych białek eukariotów, zachodzą posttranslacyjne reakcje modyfikacji, nie wycinają intronów organizmów wyższych, z powodzeniem używają sygnałów sekrecyjnych innych organizmów, proteoliza może stanowić istotny problem.

Komórki	trudne i kosztowne w prowadzeniu hodowli zwierzęcej na dużą skalę, stosunkowo mała wydajność (0,001-0,1g/l), mogą być głównie stosowane dla białek zwierzęcych, prawidłowo zachodzą procesy modyfikacji, prawidłowo wycinane introny, zwierzęce sygnały sekrecyjne są rozpoznawane prawidłowo.
---------	--

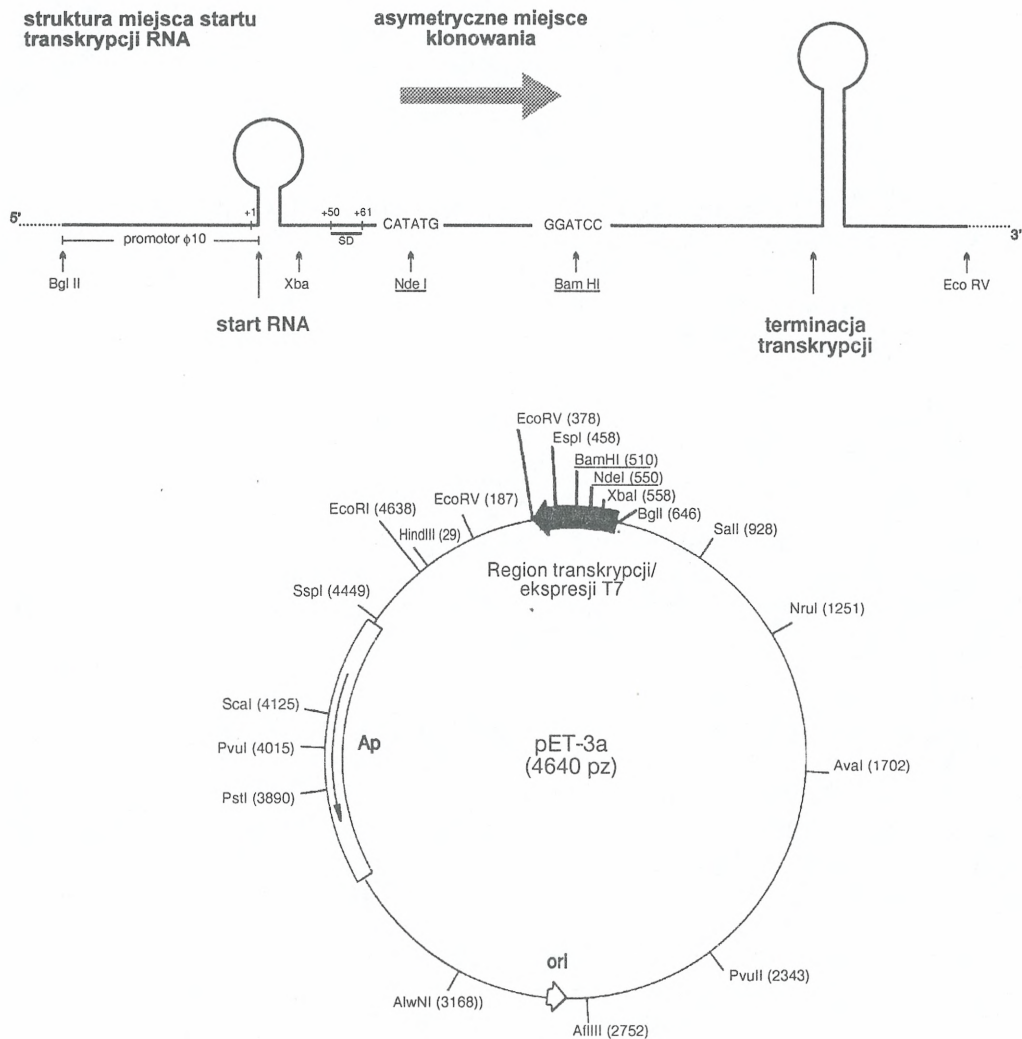
Białka uzyskane metodami inżynierii genetycznej wykorzystuje się do przeprowadzenia następujących zadań badawczych: (1) ustalania struktury i funkcji białek, (2) projektowania przemysłowo ważnych białek, (3) wprowadzania grup reporterowych (spektroskopia, krystalografia), (4) projektowania nowych nośników leków oraz (5) projektowania i produkcji białek o zastosowaniu klinicznym.

ZASTOSOWANIE BAKTERYJNEGO UKŁADU EKSPRESYJNEGO — T7 RNA POLIMERAZA/T7 PROMOTOR — DO EKSPRESJI SEKWENCJI KODUJĄCYCH GENÓW BIAŁEK ROŚLINNYCH

Bakteryjny układ ekspresyjny T7 RNA polimeraza/T7 promotor służy do przeprowadzania ekspresji obcych sekwencji kodujących w komórkach *E. coli*. Transformację bakterii przeprowadza się za pomocą wektora ekspresyjnego (pET-3a, pET-15b) zawierającego wklonowany fragment kodujący genu. Omawiane wektory serii pET, opracowane i opisane po raz pierwszy przez STUDIERA i współpracowników (1990) zawierają promotor fagowy $\phi 10$ oraz asymetryczne miejsce klonowania (*NdeI/BamHI*), co pozwala na wprowadzenie sekwencji kodującej genu w odpowiednią ramkę odczytu (ryc. 2). Gen T7 RNA polimerazy, zintegrowany z chromosomem bakterii lizogenicznych DE3, znajduje się pod kontrolą promotora lacUV5 i jego ekspresja zachodzi po dodaniu induktora IPTG do kultury rosnących komórek bakteryjnych (po osiągnięciu logarytmicznej fazy wzrostu). Indukowana i syntetyzowana T7 RNA polimeraza rozpoznaje promotor $\phi 10$ i przeprowadza z dużą wydajnością transkrypcję sekwencji kodującej wprowadzonej do wektora ekspresyjnego pod jego kontrolę. Końcowym produktem ekspresji jest rekombinowane białko, syntetyzowane przez aparat translacyjny bakterii, które izoluje się bezpośrednio z lizatu komórek bakteryjnych. Schemat procedury przygotowania plazmidu zawierającego fragment kodujący genu i ekspresji rekombinowanego białka w komórkach *E. coli* przedstawiono na rycinach 3 i 4. Może się zdarzyć, że obce białko, syntetyzowane w komórkach *E. coli*, tworzy nierozpuszczalne „ciała inkluzyjne”. Należy wtedy do buforu lizującego dodać czynnik denaturujący (np. 6M mocznik, chlorowodorek guanidyny lub zastosować sonikowanie).

Bakteryjny układ ekspresji rekombinowanych białek posiada szereg istotnych zalet: (1) łatwość w przygotowaniu wektora ekspresyjnego zawierającego część kodującą genu, (2) niski koszt pożywek stosowanych do hodowli bakterii, (3) krótki czas hodowli (około 7 godz.).

Wektor ekspresyjny pET-3a przedstawiony schematycznie na rycinie 2 posiada następujące właściwości: (1) zawiera marker selekcyjny (gen oporności na

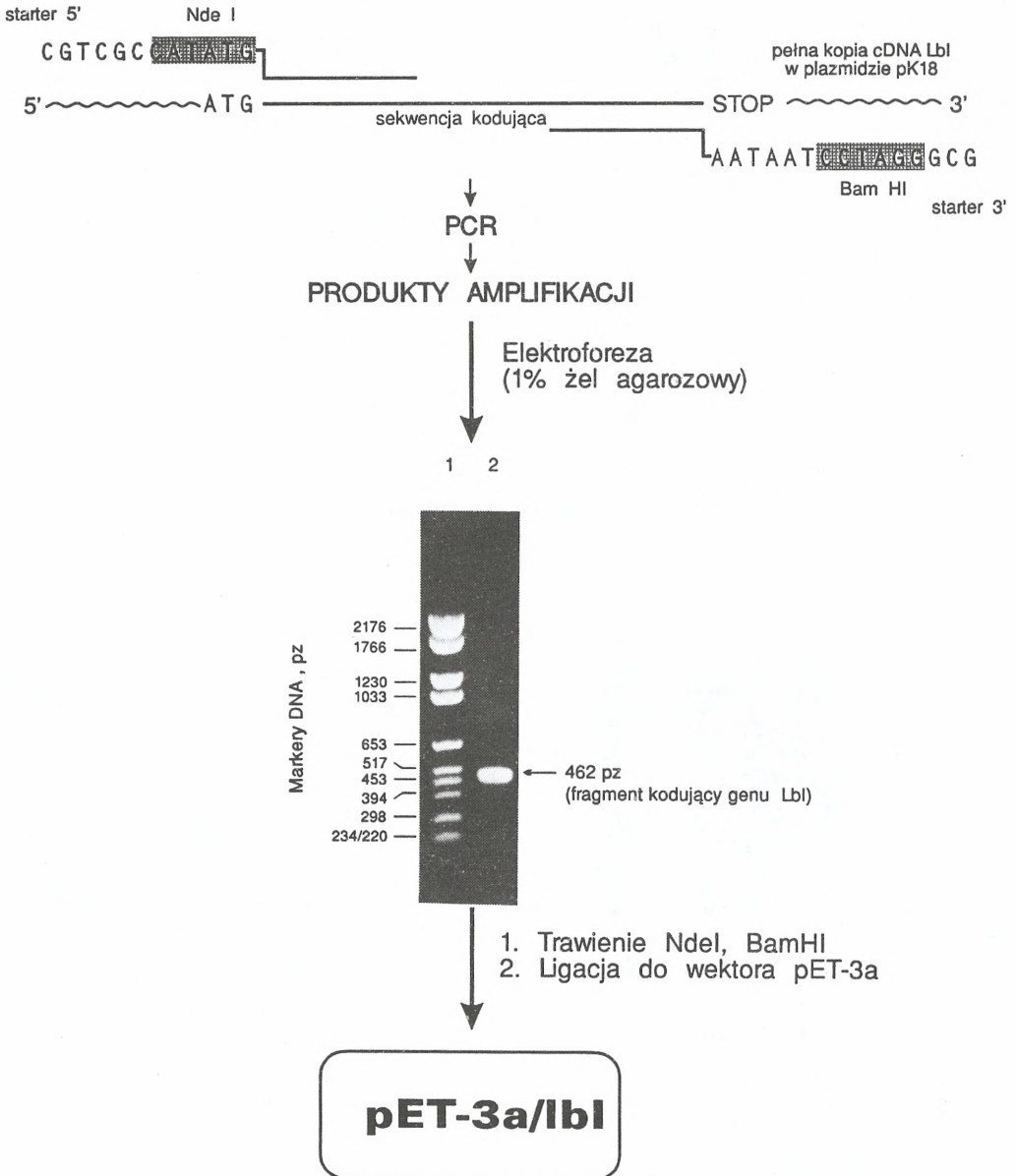


Ryc. 2. Struktura wektora ekspresyjnego pET-3a.

ampiciline), (2) sekwencje odpowiedzialne za kontrolę translacji, (3) asymetryczne miejsce klonowania, (4) promotor $\phi 10$ rozpoznawany przez T7 RNA polimerazę.

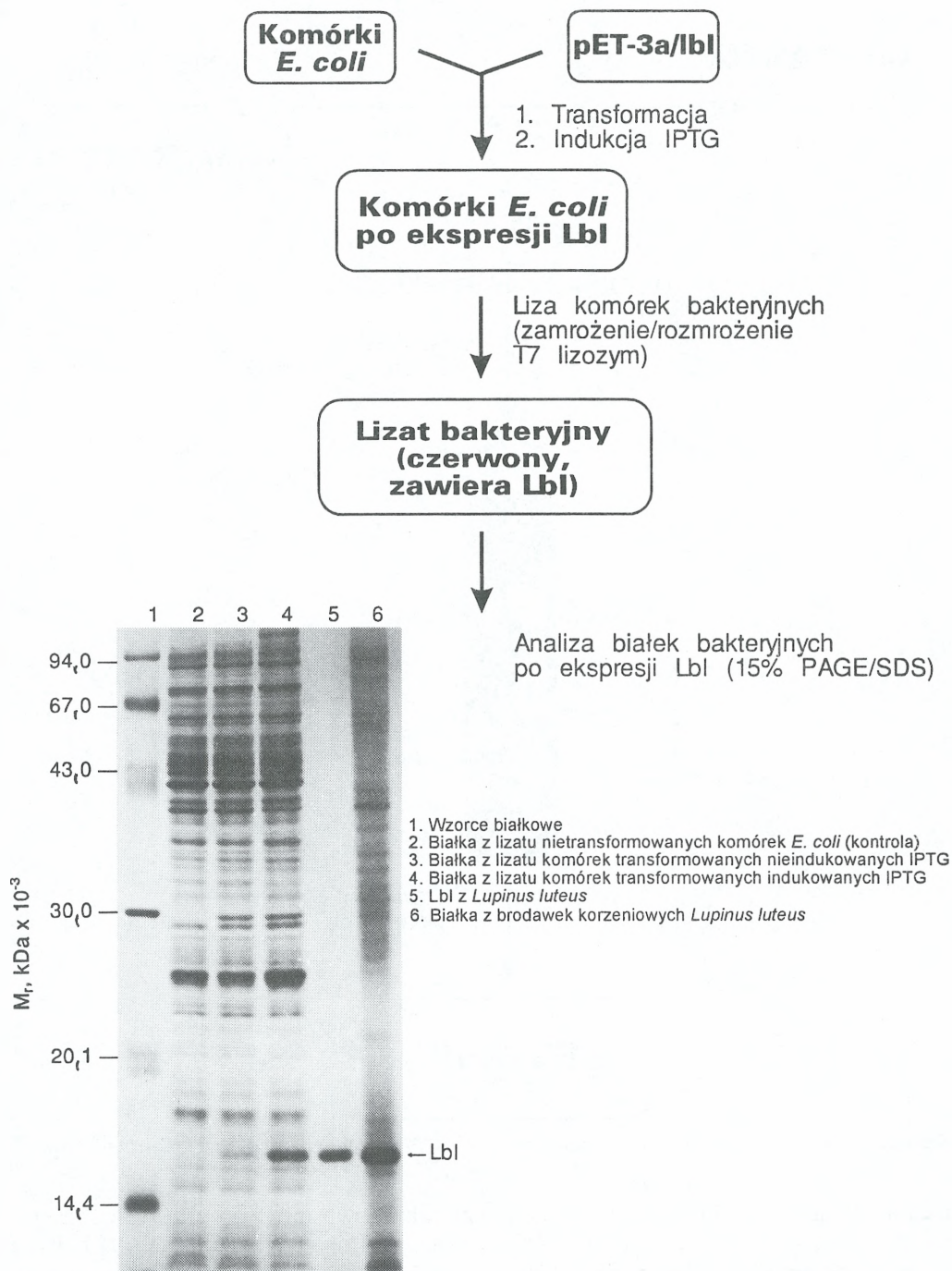
T7 RNA polimeraza odpowiedzialna za transkrypcję obcych genów będących pod kontrolą promotora fagowego wprowadzonego do wektora ekspresyjnego posiada szereg zalet: (1) enzym jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 90 kDa, (2) posiada 5-krotnie wyższą aktywność niż polimeraza bakteryjna, (3) charakteryzuje się dużą wiernością transkrypcji.

Firma biotechnologiczna Novagen opracowała nowe wersje wektora ekspresyjnego pET charakteryzujące się większą uniwersalnością, łatwiejsze w praktyce laboratoryjnej, pozwalające oczyszczać rekombinowane białka w jednym



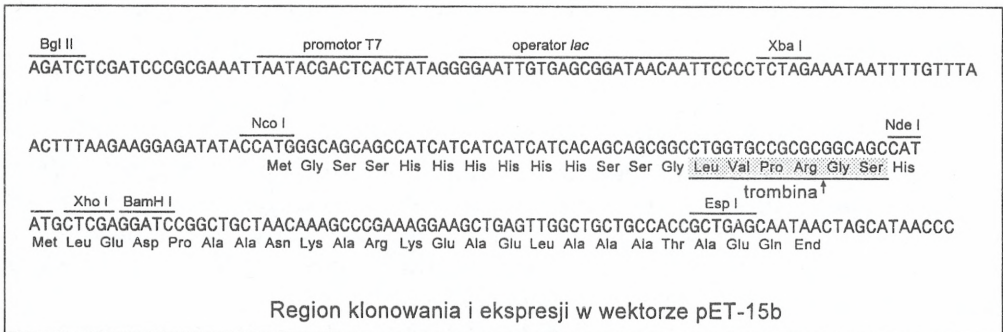
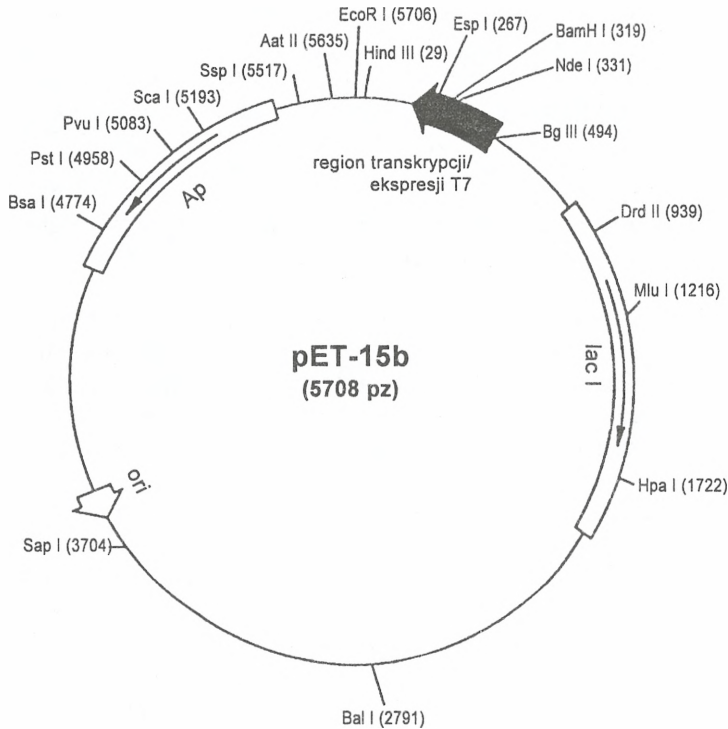
Ryc. 3. Przygotowanie wektora ekspresyjnego pET-3a zawierającego sekwencję kodującą genu Lbl.

etapie chromatograficznym. Przykładem zmodyfikowanego i ulepszanego wektora jest wektor ekspresyjny pET-15b, którego strukturę przedstawiono schematycznie na rycinie 5. Wektor pET-15b zawiera sekwencję operatora *lac* po stronie 3' promotora T7 (tzw. T7lac promotor) oraz dodatkowo naturalny promotor i sekwencję kodującą represora *lac* (*lacI*) zorientowaną tak, że promotory T7lac i *lacI* są skierowane w przeciwnych kierunkach. Jeżeli ten wektor jest użyty do ekspresji obcego genu w lizogenicznych komórkach BL21(DE3), wtedy represor



Ryc. 4. Transformacja komórek bakteryjnych i ekspresja białka Lbl.

lac blokuje promotor *lacUV5* (nie zachodzi transkrypcja genu T7 RNA polimerazy) oraz promotor *T7lac* (nie zachodzi transkrypcja obcego genu wprowadzonego do wektora pET-15b będącego pod jego kontrolą). W ten sposób stabilizuje się



Ryc. 5. Struktura wektora ekspresyjnego pET-15b.

obcy gen w komórkach DE3. Drugim sposobem stabilizacji obcego genu jest jego ekspresja w komórkach lizogenicznych, zawierających kompatybilny plazmid pLysS, który dostarcza małej ilości lizozymu T7.

Lizozym T7 posiada dwie funkcje. Jako naturalny inhibitor T7 RNA polimerazy stabilizuje plazmid z obcym genem przez obniżenie podstawowego poziomu T7 RNA polimerazy, ale nie zapobiega indukcji i wysokiemu poziomowi ekspresji obcego białka. Drugą funkcją lizozymu T7 jest liza ścian komórek bakterii (przez zamrożenie i rozmrożenie).

Połączenie dwóch modyfikacji w bakteryjnym układzie ekspresyjnym: wprowadzenia promotora T7lac do plazmidu pET-15b i plazmidu zawierającego gen lizozymu T7 pLysS do komórek *E. coli*, pozwala na utrzymanie i ekspresję w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)pLysS białek o większej toksyczności dla bakterii.

OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK PRZY ZASTOSOWANIU WEKTORA pET-15b

Wektor pET-15b zawiera sekwencję 6 lub 10 reszt histydynowych, które mogą ulegać ekspresji na C- lub N-końcu rekombinowanego białka. Fragment histydynowy pozwala na oczyszczanie białka w jednoetapowej chromatografii na żywicy immobilizowanej jonami Ni^{++} (NOVAGEN 1993). Metoda ta jest szybka i można ją stosować na skalę preparatywną również z użyciem buforów denaturujących.

Białka otrzymane metodami rekombinacji DNA i inżynierii białek mogą być wykorzystane do następujących celów: (1) jako antygeny do uzyskiwania monospecyficznego przeciwciała, (2) do badań funkcjonalnych (aktywność enzymatyczna, białka wiążące hormony, białka regulatorowe) i (3) do badań strukturalnych metodami fizykochemicznymi (krystalografia i analiza rentgenostrukturalna, spektroskopia).

Dodatkową zaletą opisywanego układu ekspresyjnego jest możliwość przeprowadzania mutacji poprzez zmianę określonych liter kodu genetycznego zapisanego w sekwencji nukleotydowej fragmentu kodującego genu. Stwarza to możliwość badania mechanizmu funkcjonowania białek poprzez wprowadzanie mutacji w obrębie fragmentów sekwencji odpowiedzialnych za aktywność biologiczną białek.

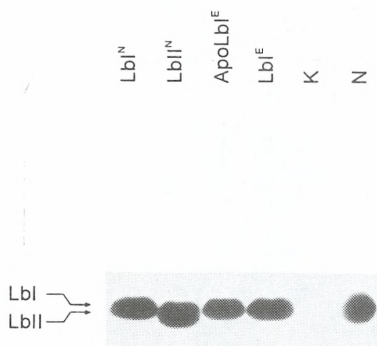
EKSPRESJA GENÓW LEGHEMOGLOBIN I I II (LbI i LbII) ŁUBINU ŻÓŁTEGO W BAKTERYJNYM UKŁADZIE EKSPRESYJNYM

Leghemoglobiny roślin motylkowatych są odpowiednikami zwierzęcej mioglobiny pełniącej funkcję przekaźnika tlenu (STRÓŻYCKI w tym zeszycie; STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995). Występują one w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych jako produkty genów, których ekspresja jest indukowana w trakcie rozwoju symbiozy z bakteriami rodzaju *Rhizobium*.

Opisany układ ekspresyjny T7 RNA polimeraza/T7 promotor zastosowano do ekspresji sekwencji kodujących genów LbI i LbII z brodawek korzeniowych łubinu żółtego (SIKORSKI i współaut. 1994, 1995).

Fragmety sekwencji cDNA o długości 462 pz kodujące leghemoglobinę I i II uzyskane w reakcji amplifikacji metodą PCR z pełnej kopii cDNA, wklonowano do wektora ekspresyjnego pET-3a (pET-3a/LbI, pET-3a/LbII). Następnie transformowano komórki *E. coli*, szczep BL21(DE3)pLysS, wywołując ekspresję przez dodanie IPTG do hodowli bakterii. Produkty ekspresji oczyszczono i wykazano, że rekombinowane białka otrzymane tą drogą posiadają identyczne właściwości, jak LbI i LbII z brodawek korzeniowych łubinu żółtego. Wykazano również, że surowica anty-LbI dla leghemoglobiny I uzyskanej w wyniku ekspresji w *E. coli*

daje krzyżową reakcję immunochemiczną zarówno z rekombinowanymi białkami jak i z natywnymi leghemoglobinami z brodawek korzeniowych łubinu (ryc. 6). W wyniku analizy spektralnej uzyskano charakterystyczne widmo utlenowanej leghemoglobiny I (SIKORSKI i współaut. 1995). Syntetyzowana w komórkach bakteryjnych apoleghemoglobina wykorzystuje hem do utworzenia funkcjonalnej leghemoglobiny. Ponadto sekwencje aminokwasowe N-końca oczyszczonych białek potwierdzają identyczność z białkami natywnymi z brodawek korzeniowych.



Ryc. 6. Analiza immunochemiczna rekombinowanych białek. LbI^N , $LbII^N$ — oczyszczone preparaty leghemoglobin I i II z brodawek korzeniowych łubinu żółtego; $ApoLbI^E$ — apoleghemoglobina pozbawiona hemu; LbI^E — leghemoglobina syntetyzowana w komórkach *E. coli*; K — ekstrakt białkowy komórek *E. coli* nietransformowanych; N — ekstrakt białkowy z brodawek korzeniowych łubinu. Reakcję immunochemiczną przeprowadzono z surowicą króliczą anty- LbI^E . Detekcję przeprowadzono autoradiograficznie z użyciem białka A ze *Staphylococcus aureus* znakowanego izotopem ^{125}J .

Na rycinach 3 i 4 przedstawiono schematycznie procedurę przygotowania wektora ekspresyjnego, transformacji komórek bakteryjnych i ekspresji sekwencji kodującej genu *LbI* w komórkach bakteryjnych. Identycznie postępowano w przypadku ekspresji *LbII*.

EKSPRESJA SEKWENCJI KODUJĄCEJ BIAŁKO LIR18A ŁUBINU ŻÓŁTEGO W KOMÓRKACH *E. COLI* Z ZASTOSOWANIEM WEKTORÓW EKSPRESYJNYCH pET-3a I pET-15b

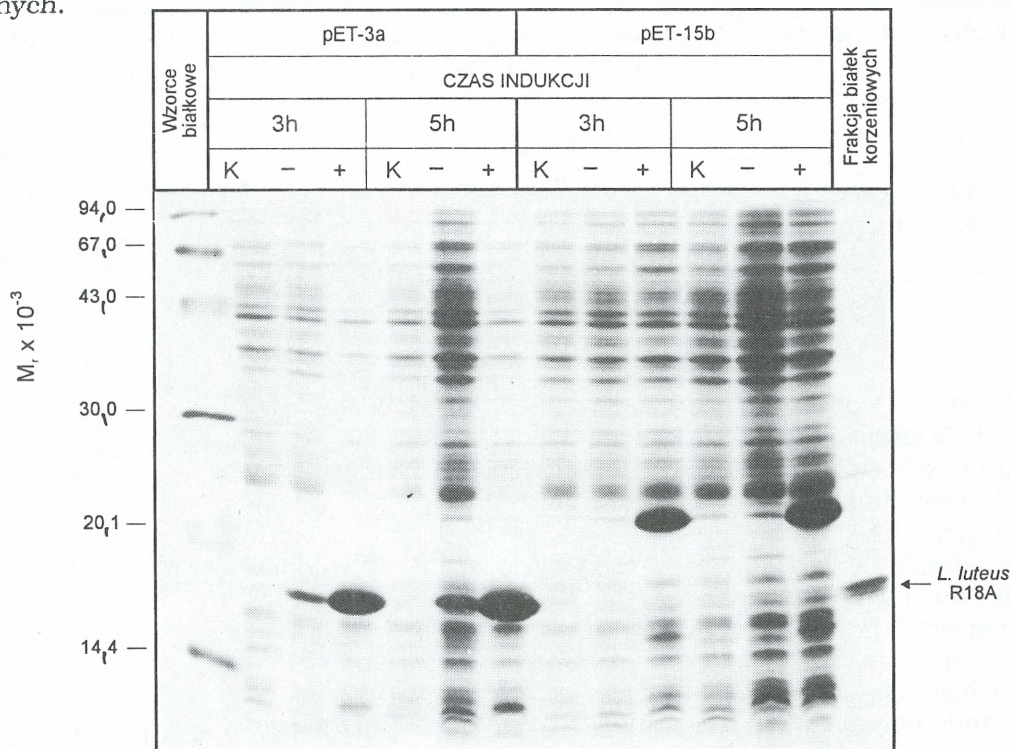
W celu porównania wydajności ekspresji rekombinowanego białka w wektorach pET-3a i pET-15b przeprowadzono ekspresję białka LIR18A łubinu żółtego o masie cząsteczkowej 16,9 kDa. Zastosowano szczep *E. coli* BL21(DE3)pLysS (ryc. 7). Wykazano, że oba wektory (pET-3a i pET-15b) mogą być stosowane z jednakowym powodzeniem do ekspresji genu kodującego białko LIR18A.

Jak wcześniej wspomniano, zaletą stosowania wektora pET-15b jest łatwość oczyszczania produktu ekspresji jako białka fuzyjnego zawierającego fragment 6-ciu histydyn na kolumnie z żywicą chelatującą jony Ni^{++} .

Powstające białko fuzyjne można hydrolizować specyficzną proteazą — trombiną, która odcina fragment znacznika histydynowego łatwy do oddzielenia od właściwego produktu przez rechromatografię na żywicy Ni^{++} .

Gen kodujący białko LIR18A łubinu żółtego należy do rodziny genów kodujących białka kwaśne o masie cząsteczkowej 17–19 kDa, stanowiących klasę białek IPR (intracellular pathogenesis-related proteins). Białko LIR18A, podobnie jak jego homolog LIR18B (90% podobieństwa do białka LIR18A) ulegają w łubinie żółtym represji w trakcie rozwoju efektywnej symbiozy *L. luteus* — *B.*

lupini (LEGOCKI i współaut. 1994). Rola i struktura tych białek, uczestniczących prawdopodobnie w procesach obronnych rośliny, jak dotąd nie została poznana. Stąd nasze zainteresowanie uzyskiwaniem białek LIR18A i LIR18B na skalę preparatywną w celu ich wykorzystania do badań strukturalnych i funkcjonalnych.



Ryc. 7. Porównanie ekspresji genu białka LIR18A łubinu żółtego w komórkach *E. coli* w wektorach ekspresyjnych serii pET: pET-3a i pET-15b — elektroforeza białek po lizie komórek *E. coli* w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Ekspresję prowadzono w temp. 37°C przez 3 i 5 godz. Produkt ekspresji w wektorze pET-15b jest białkiem fuzyjnym, zawierającym fragment sekwencji „histydynowej”, służącej do chromatografii na kolumnie z żywicą chelatującą.

Ze względu na dużą różnorodność zarówno komórkowych układów ekspresyjnych, jak i odpowiednich wektorów dostępnych komercyjnie, ograniczyliśmy się do opracowania najczęściej stosowanego układu bakteryjnego, który jak nam się wydaje, będzie użyteczny również dla produkcji innych białek roślinnych na skalę preparatywną.

IDENTIFICATION OF PLANT GENES AND THEIR EXPRESSION IN AN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEM

Summary

Identification of higher plant genes encoding individual proteins is based on determination of protein amino acid sequence of N-termini. The sequence of 10–20 amino acid residues of protein is

sufficient to design the deoxyoligonucleotide probe which can be used for screening of cDNA library in order to distinguish full cDNA copies of individual clones.

The coding part of a cDNA clone can be introduced into the expression vector of pET series to overexpress protein in *E. coli* cells. The overexpression of yellow lupin leghemoglobins (LbI and LbII) and PR-like protein (LIR18A) is described. These are examples of using the bacterial expression system for production of recombinant proteins for structural and functional studies.

The pET system is the most powerful system yet developed for the cloning and expression of recombinant proteins in *E. coli* cells.

LITERATURA

- AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH J. A., STRUHL K., 1995. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, U.S.A.
- FRANKS F., 1993. *Protein Biotechnology*. Humana Press. Totova, New Jersey, 467-488.
- LEGOCKI A. L., SIKORSKI M. M., STRÓŻYCKI P. M., SZLAGOWSKA A. E., 1994. *Structure and expression of nodule-specific genes of yellow lupin (Lupinus luteus)*. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference. Officina Press, Szeged, Hungary. 180-184.
- MATSUDAIRA P., 1993. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Academic Press, Inc. San Diego, U.S.A.
- NOVAGEN pET System Manual. 1993. NOVAGEN, Inc. Madison, U.S.A.
- SIKORSKI M. M., ROZEK M., 1994. *Expression of Lupinus luteus nodulin-45 gene in E. coli cells. Mutagenesis of coding sequence by PCR method*. Acta Biochim. Polon. 41, 106-109.
- SIKORSKI M. M., TOPUNOV A. F., SZLAGOWSKA A. E., ŚWIDERSKI M. R., STRÓŻYCKI P. M., VORGAS C. E., WILSON K. S., LEGOCKI A. B., 1994. *Expression of leghemoglobin cDNA's of Lupinus luteus in Escherichia coli and purification of recombinant proteins*. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference. Officina Press, Szeged, Hungary. 341.
- SIKORSKI M. M., TOPUNOV A. F., STRÓŻYCKI P. M., VORGAS C. E., WILSON K. S., LEGOCKI A. B., 1995. *Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of Lupinus luteus in Escherichia coli and purification of the recombinant protein*. Plant Sci. 108, 109-117.
- STRÓŻYCKI P. M., LEGOCKI A. B., 1995. *Leghemoglobins from an evolutionarily old legume, Lupinus luteus*. Plant Sci. 110, 83-93.
- STUDIER F. W., ROSENBERG A. H., DUNN J. J., DUBENDORFF J. W., 1990. *Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes*. Meth.Enzymol. 185, 60-89.