



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

197 796

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 15 02 78

(21) PV 981-78

(51) Int. Cl.³ G 12 N 1/14

(40) Zverejnené 31 08 79

(45) Vydané 01 5 82

(75)

Autor vynálezu ŠUBÍK JÚLIUS RNDr. a TAKÁČSOVÁ GIZELA RNDr. , BRATISLAVA

(54) Spôsob získavania mucidin-rezistentných mutantov nového typu

1

Predmetom vynálezu sú mutanty kvasiniek rezistentné k antibiotiku mucidinu, u ktorých mutácia v mitochondriálnom genóme sa nachádza mimo genetických lokusov MUC1 a MUC2, a spôsob ich získavania.

Mucidin je protihubové antibiotikum získané podľa čs. patentov č.136 492 a č.136 495. Toto antibiotikum inhibuje i rast kvasiniek. Dosiaľ izolované kmene kvasiniek rezistentné k inhibičnému účinku mucidinu nesú mutácie v jadrovom genome alebo v jednom z dvoch rekombinačne separovateľných lokusov MUC1 a MUC2 mitochondriálneho genomu.

Spôsob získavania kmeňov kvasiniek rezistentných k mucidinu sa prevádza podľa vynálezu v podstate tak, že čistá kultúra kvasiniek citlivých k mucidinu sa kultivuje v neprítomnosti alebo v prítomnosti mutagénneho faktora napríklad $MnCl_2$, na čo sa spontánne alebo indukované vzniknuté mutanty rezistentné k mucidinu selektujú rastom v tekutých alebo na povrchu pevných médií, obsahujúcich mucidin a nefermentabilné zdroje uhlíka a energie.

U získaných mitochondriálnych mutantov kvasiniek rezistentných k mucidinu, ktorých determinanty rezistencie podliehajú mitotickej segregácii, sa mutácia v novom lokuse mitochondriálneho genómu identifikuje postupom vykonávaným v podstate tak, že sa zmiešajú naploidné bunky opačného pohlavia testovaných mucidin-rezistentných mutantov a referenčných mucidin-rezistentných mutantov nesúcich mutáciu buď v lokuse MUC1 alebo MUC2, za rastových alebo nerastových podmienok, na čo sa vzniknuté diploidné potomstvo oddelí prototrofnou selekciou a frekvencia mucidin-senzitívnych buniek sa stanoví kvantitatívnou analýzou diploidov na nefermentabilných médiách obsahujúcich a neobsahujúcich mucidin. akto izolované mucidin-rezistentné mutanty, ktoré po vyššie uvedených kríženiach tvoria diploidnom potomstve mucidin-senzitívne bunky s obidvomi referenčnými mucidin-rezistent-

nými mutantami predstavujú novú skupinu /skupiny/ mutantov rezistentných k mucidinu, u ktorých mutácia v mitochondriálnom genome sa nachádza mimo oblasť lokusov MUC1 a MUC2.

Takýmto spôsobom boli pripravené a izolované mucidin-rezistentné kmeňe kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nesúce označenie K50 a K11 deponované v Čsl. zbierke kvasiniek /809 33 Bratislava, Dúbravská cesta, Chemický ústav SAV/ pod číslami CCY 22-15-8 a CCY 22-15-9, predstavujúce mucidin-rezistentné mutanty nového genotypu, nesúce mutácie v lokuse MUC3.

Bunky mucidin-citlivého materského kmeňa kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* 55R5-3C /CCY 22-15-10/ nerastú na pevných glycerolových médiách v prítomnosti už 0,2 /ug mucidinu/ml média. Za tých istých podmienok bunky mutantov K50 a K11 /a ural MUC3/ tolerovali koncentrácie mucidinu 0,5 /ug/ml. Oba mutanty sú špecificky rezistentné k mucidinu ako na úrovni celých buniek tak aj na úrovni izolovaných mitochondrií. Nakoľko morfológické, fyziologické a biochemické vlastnosti mutantných kmeňov rezistentných k mucidinu sú dosť podobné vlastnostiam materského mucidin-citlivého kmeňa, z ktorého sú odvodené /55R5-3C/ uvádzame len ich najvýznačnejšie vlastnosti a tie sú:

1. schopnosť rastu nefermentabilných substrátov slúžiacich ako zdroj uhlíka a energie
2. schopnosť tolerovať niekoľkonásobne vyššie koncentrácie mucidinu pri raste na týchto substrátoch v porovnaní s materským kmeňom, z ktorého sú odvodené.

Prakticky možno vynález prevádzať podľa nasledovného príkladu bez toho, že by sa na tento len výlučne obmedzoval. Uvedený príklad sa týka získavania mucidin-rezistentných mutantov po mutagenéze s $MnCl_2$ a indentifikácie mutantov patriacich k novému mitochondriálnemu genetickému lokusu MUC3.

Príklad 1

Bunky mucidin-citlivého kmeňa kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* 55R5-3C /a ural/ rástli aerobne 24 hod pri 30°C v tekutom glukózovom médiu zloženia: 2 % glukóza, 1 % pepton, 1 % kvasničný extrakt, 0,005 % uracil. Vyrastené bunky sa potom inokulovali na koncentráciu 2×10^5 buniek/ml do čerstvého média zloženia: 2 % glukóza, 1 % pepton, 1 % kvasničný extrakt, 0,005 % uracil a 7 mM $MnCl_2$. Po 20 hod rastu pri 30°C sa suspenzia kvasiniek premyla, zriedila a v množstve 10^6 buniek/Petriho misku vysiala na pevné glycerolové médium s mucidinom zloženia: 2 % agar, 2 % glycerol, 1 % pepton, 1 % kvasničný extrakt, 0,005 % uracil, 0,5 /ug/ml mucidinu. Po 10 dňoch rastu vyrastené kolónie na Petriho miskách predstavujú bunky mucidin-rezistentných mutantov, ktorých maximálna rezistencia k mucidinu po vyčistení kultúry klonovaním sa stanoví na pevných glycerolových médiách vyššie popísaného zloženia obsahujúcich rôzne koncentrácie mucidinu v rozmedzí 0,5 až 10,0 /ug/ml.

Po overení mitochondriálnej povahy mutácií získaných mucidin-rezistentných mutantov kvasiniek mitotickou segregáciou sa indentifikácia mutantov patriacich k lokusu /-om/ odlišnému od lokusov MUC1 a MUC2 stanoví alelickým testom. Bunky analyzovaných mucidin-rezistentných mutantov napríklad K50 resp. K11 ako aj bunky štandardných mucidin-rezistentných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* ale opačného pohlavia 3D a 101-4B /PV 5531-75/ rástli 24 hod pri 30°C v tekutom glukózovom médiu obsahujúcom 2 % glukózu, 1 % pepton, 1 % kvasničný extrakt, 0,005 % adenín a 0,005 % uracil. Potom sa 1 ml vyrastených buniek z odpovedajúcich kmeňov K50 a 3D resp. K50 a 101-4B /podobne K11 a 3D ako aj K 11 a 101-4B/ pridá k 3 ml čerstvých tekutých glukózových médií, premieša sa po 24 hod kultivácie sa vyseje na Petriho misky obsahujúce minimálne glukózové médium zloženia: 3 % agar, 2 % glukóza, 0,001 % inozitol, 0,0001 % tiamín, 0,0001 % pyridoxín, 0,0001 % kyselina nikotínová, 0,0001 % kyselina para-aminobenzoová, 0,0001 % pantoténan vápenatý, 0,00001 % biotin a 0,00002 % riboflavín, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,05 % $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,05 % KCl, 0,12 % $NH_4/2SO_4$, 0,2 % $NaNO_3$, 0,001 % $FeSO_4 \times 7 H_2O$. Po troch dňoch vyrastené bunky na Petriho miskách sa zmyjú a vysejú v množstve 40 až 90 buniek/ Petriho misku na minimálne glukózové médium toho istého zloženia. Po troch dňoch vyrastené kolónie buniek na Petriho miskách sa replikujú na pevné glycerolové médiá neobsahujúce mucidin a súčasne aj na médiá obsahujúce mu-

cidin v koncentrácii 0,5 µg/ml média obsahujúceho glycerol /2 %/ ako zdroj uhlíka a energie. Po troch a 6 dňoch kolónie buniek nevyrastené na mucidin-obsahujúcich glycerolových médiách ale súčasne dobre rastúce na glycerolových médiách neobsahujúcich mucidin predstavujú diploidné mucidin-senzitívne kvasinky, ktorých objavenie sa vo frekvenciách väčších ako 2 % v oboch typoch kríženia so štandardnými kmeňmi 3D a 101-4B indikuje existenciu nových mutácií mapujúcich sa v mitochondriálnom genóme v oblasti inej než MUC1 a MUC2. V prípade mutantných kmeňov K50 a K11 frekvencie odpovedajúcich mucidin-senzitívnych rekombinantov boli nasledovné: 8,3 % v krížení K50 x 3D, 4,3 % v krížení K50 x 101-4B, 13,1 % v krížení K11 x 3D a 8,4 % v krížení K11 x 101-4B.

Uvedené kmene mucidin-rezistentných kvasiniek sú použiteľné vo výskume štruktúry, funkcie, biogenézy a genetiky organel eukaryotických buniek, v hygienickej službe a v priemysle antibiotík pri mikrobiologickom stanovení rôznych látok v prítomnosti mucidinu ako aj pri výskume a získavaní prirodzených alebo syntetických analógov antifungálneho antibiotika mucidinu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob získavania mucidin-rezistentných mutantov nového typu, vyznačujúci sa tým, že z kultúry mikroorganizmov citlivých k inhibičnému účinku antifungálneho antibiotika mucidinu napríklad kvasiniek, obzvlášť rodu *Saccharomyces* sa priamo alebo po pôsobení mutagénneho faktora napríklad iónov dvojmocného mangánu za rastových alebo nerastových podmienok, selektujú rastom na pevných alebo v tekutých médiách obsahujúcich mucidin a zdroje uhlíka a energie, obzvlášť nefermentabilné, mucidin-rezistentné mutanty, ktorých determinanty rezistencie podliehajú mitotickej segregácii, a ktoré po krížení so štandardnými mucidin-rezistentnými kmeňmi, obsahujúcimi odpovedajúce mutácie v lokusoch MUC1 a MUC2, tvoria mucidin-senzitívne rekombinanty.
2. Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae* K50, CCY 22-15-8, rezistentný k mucidinu, mutáciou v novom lokuse mitochondriálneho genómu označenom MUC3, získaný spôsobom podľa bodu 1.
3. Kmeň mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae* K11, CCY 22-15-9, rezistentný k mucidinu, mutáciou v novom lokuse mitochondriálneho genómu označenom MUC3, získaný spôsobom podľa bodu 1.