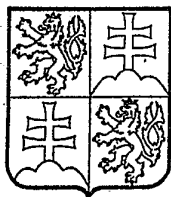


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 929

(21) PV 408-89.D
(22) Přihlášeno 23 11 89

(40) Zveřejněno 13 06 90
(45) Vydáno 16 12 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 N 15/56

(75) Autor vynálezu

PETŘÍČEK MIROSLAV ing.,
TICHÝ PAVEL RNDr. CSc.,
HOŠTÁLEK ZDEŇEK RNDr. DrSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR, člen korespondent ČSAV
PRAHA

(54)

Rekombinovaný plasmid pRS416, kódující zvýšenou
produkci termostabilní alfa-amylázy
ve streptomycetách

(57)

Rekombinovaný plasmid pRS416 s obsahem vydělitelné genetické informace v 8,3 kb velkém insertu chromosomové DNA z kmene *Thermomonospora curvata* kódujícího produkci termostabilní alfa-amylázy ve streptomycetách. Rekombinovaný plasmid pRS416 je množěn a uchován v bunkách kmene *Streptomyces lividans* TK24 uloženého v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4111 a má využití při přípravě termostabilní alfa-amylázy kódované rekombinovaným plasmidem, zejména v textilním průmyslu při barvení látek.

Vynález se týká rekombinovaného plasmidu pRS416 kódujícího zvýšenou produkci termostabilní alfa-amylázy ve streptomycetách.

Alfa-amyláza, enzym štěpící alfa-1,4 vazbu glukosového polymeru škrobu je průmyslovým fermentem, je využíván v řadě výrob. Jedním z průmyslových odvětví je textilní průmysl, kde zejména termostabilní alfa-amyláza je s výhodou používána při barvení látek.

Gen kódující termostabilní alfa-amylázu ve streptomycetách nebyl dosud klonován. Již dříve byly připraveny geny kódující alfa-amylázu v bacilech.

Podstatou vynálezu je rekombinovaný plasmid pRS416 kódující produkci termostabilní alfa-amylázy streptomycetovou buňkou, charakterizovaný vloženým fragmentem chromosomové DNA kmene *Thermomonospora curvata* o velikosti 8,3kb a restriční mapou.

Ke konstrukci plasmidu pRS416 byl použit parciální restrikt chromosomové DNA kmene *Thermomonospora curvata*. Kmen *T. curvata* byl získán z Československé sbírky mikroorganismů v Brně, kde je veden pod katalogovým číslem CCM 3352. Tento kmen, který byl izolován z kompostu, produkuje řadu termostabilních enzymů a mezi nimi také termostabilní škrob ztekucující alfa-amylázu. Gen kódující alfa-amylázu je v chromosomu *T. curvata* přítomen pouze v jedné kopii.

Při konstrukci plasmidu kódujícího termostabilní alfa-amylázu bylo postupováno následujícím způsobem:

Jako replikon byl použit nízkokopiový plasmid pIJ61 (Thompson et al. 1982), který se replikuje v hostitelské buňce kmene *Streptomyces lividans* 1326, a jeho deriváty v maximálním počtu 6 až 8 kopií na buňku. 8,3kb insert obsahující tam gen kódující produkci termostabilní alfa-amylázy, byl získán parciálním štěpením chromosomu *Thermomonospora curvata*, restriční endonukleázou *Sau* 3AI. Vysoká produkce termostabilní alfa-amylázy byla zajištěna zesílením přepisu tam genu. Zesílení přepisu tam genu bylo dosaženo jeho spojením se silným promotorem *aph* genu přítomného na plasmidu (*aph* gen kóduje resistenci k neomycinu). *aph* gen byl štěpen restriční endonukleázou *Bam*HI a ligován *in vitro* s pomocí T4- DNA ligázy s proximální oblastí tam genu, která obsahuje rovněž *Bam*HI zásahové místo. Restriční endonukleáza štěpí *aph* gen v protein kódující oblasti *aph* genu. Obdobně lze využít i další restriční místo pro restriční endonukleázu *Sph*I. Klonovaný tam gen má zachován vlastní aktivní promotor, vazebné místo na ribosomy a sekvenci kódující signální peptid, který umožňuje průchod termostabilní alfa-amylázy cytoplasmatickou membránou a sekreci aktivního proteinu do média.

Provedenými delecemi *in vitro* v 8,3kb klonovaném fragmentu a klonováním do dalších streptomycetových vektorů bylo zjištěno, že tam gen je umístěn v 2,65kb velkém restričním fragmentu ohraničeném zásahovými místy pro restriční endonukleázy *Bam*HI-*Hind*III. Transkripce tam genu probíhá ve směru *Bam*HI-*Hind*III.

Na výkresu je uvedena restriční mapa plasmidu podle vynálezu. Šrafovaná část představuje vložený fragment chromosomu *Thermomonospora curvata* s genem kódujícím produkci termostabilní alfa-amylázy (křížkovane). Z vektorové molekuly plasmidu pIJ561 (slabá čára) je znázorněna jen část v těsné blízkosti insertu. Šipka ukazuje směr transkripce tam genu.

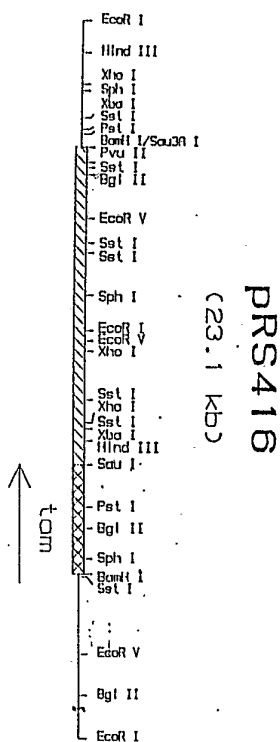
Molekulová hmotnost sekretované termostabilní alfa-amylázy je 62 000 g/Mol a enzym má teplotní optimum 67 °C, vydrží však krátké zahřátí až na 90 °C.

Dosud nebyl izolován a klonován žádný gen kódující termostabilní alfa-amylázu ve streptomycetách.

Rekombinovaný plasmid pRS416 je uchován v buňkách kmene *Streptomyces lividans* TK24 v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4111.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Rekombinovaný plasmid pRS416 kódující produkci termostabilní alfa-amylázy, charakterizovaný vloženým fragmentem chromosomové DNA kmene *Thermomonospora curvata* o velikosti 8,3kb a restrikční mapou,



uchovaný v buňkách kmene *Streptomyces lividans* TK24, uložených v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4111.

