

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

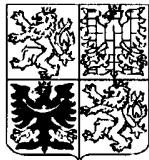
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3170-94

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 02. 91**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.02.90**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **90/48078**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/53
C 07 H 21/04
C 12 P 13/02

(71) Přihlášovatel:

Nitto Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, JP;
Beppu Teruhiko, Tokyo, JP;
YAMADA Hideaki, Kyoto-shi, JP;

(72) Původce:

Beppu Teruhiko, Tokyo, JP;
Yamada Hideaki, Kyoto-shi, JP;
Nagasawa Toru, Kyoto-shi, JP;
Horinouchi Sueharu, Tokyo, JP;
Nishiyama Makoto, Tokyo, JP;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA, a.s., Jívanská 1,
Praha 4, 14021;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Fragment DNA(L), kodující polypeptid s
nitril-hydratasovou aktivitou,
transformant, obsahující tento gen a způ-
sob přípravy nitril-hydratasy a amidů pou-
žitím tohoto transformantu**

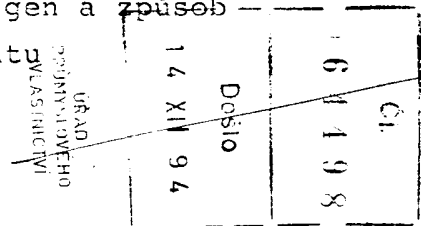
(57) Anotace:

Fragment DNA ^{/L/}, kodující polypeptid a nit-
ril-hydratasovou aktivitou, který je vložen do
expresního vektoru a tento rekombinantní
vektor se použije pro transformaci E.coli.
Transformant obsahuje mnoho kopií genu a
produkuje mnohem vyšší hladinu nitril-
hydratasy při porovnání s běžně používanými
mikroorganismy. Amidy se připravují z nitrilů
za užití uvedených transformantů.

CZ 3170-94 A3

DNA^(L)
~~DNA^(L)~~

Fragment DNA^(L), kodující polypeptid s nitril-hydratasovou aktivitou, transformant, obsahující tento gen a způsob přípravy amidů použitím tohoto transformantu

Oblast techniky

Vynález se týká DNA fragmentu^(L) odvozeného od Rhodococcus rhodochrous J-1 a kodujícího polypeptid s nitrilhydratasovou aktivitou, který hydratuje nitrily na amidy. Vynález se také týká také rekombinantní DNA, obsahující uvedený DNA^(L) fragment a transformantu transformovaného rekombinantní DNA. Vynález se dále týká způsobu přípravy nitril-hydratasy za použití tohoto transformantu a způsobu přípravy amidů pomocí nitril-hydratasy.

J-1 je 1

Dosavadní stav techniky

Nitril-hydratasa nebo nitrilasa je známa jako enzym, který hydratuje nitrily na amidy. Mezi mikroorganismy, které produkují nitril-hydratasa patří mikroorganismy rodu Bacillus, rodu Bacterium, rodu Micrococcus a rodu Brevibacterium /viz japonský patent 8-62-21517/1989, US patent č. 4001081/, rodu Corynebacterium a rodu Nocardia /viz japonský patent B-56-17918/1989, US patent č. 4248968/, rodu Pseudomonas /viz japonský patent 59-37951/1984, US patent č. 4637982/, rodu Rhodococcus, rodu Arthrobacter a rodu Microbacterium /viz japonský patent A-61-162193/1986, evropská patentová přihláška č. 0188316/ a rodu Rhodococcus rhodochrous /viz japonský patent 470/1990 a evropská patentová přihláška č. 0307926/.

Nitril-hydratasa se používá pro hydratování nitrilů na amidy. Podle tohoto vynálezu se upraví mikroorganismy tak, aby obsahovaly více kopií rekombinantní DNA, kodující nitril-hydratasa technologií rekombinantní DNA. Rekombinant produkuje pozoruhodně vysoké hladiny nitril-hydratasy ve srovnání s běžně používanými mikroorganismy.

Autoři vynálezu již dříve objevili fragment DNA odvozené od *Rhodococcus* sp. N-774 /FERM BP-1936/, který také koduje polypeptid s nitril-hydratasovou aktivitou /japonský patent č. A-2-119778/1988/.

Na rozdíl od objevu uvedeného v předchozím odstavci využívají autoři tohoto vynálezu pro přípravu nitril-hydratasy fragmentu DNA odvozeného od *Rhodococcus rhodochrous* J-1. Byl izolován gen, kodující nitrilhydratasy, tento gen byl vložen do vhodného plasmidového vektoru a příslušný hostitel byl transformován tímto rekombinantním plasmidem. Byl tak úspěšně získán transformant, který produkuje nitrilhydratasy s vysokou aktivitou také k aromatickým nitrilům.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká:

Fragmentu DNA^(L), kodujícího polypeptid, který má nitrilhydratasy aktivitu, kde tento peptid obsahuje α ^(L)-

β ^(L) ~~(L)~~ -podjednotky následujících sekvencí aminokyselin:

α ^(L) -podjednotka:

	5		10		15									
Met	Thr	Ala	His	Asn	Pro	Val	Gln	Gly	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Asn
	20		25		30									
Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Arg	Val	Lys	Ala	Met	Glu	Ala	Ile	Leu	Val
	35		40		45									
Asp	Lys	Gly	Leu	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	His	Met	Ser	Ser
	50		55		60									
Val	Tyr	Glu	Asn	Glu	Val	Gly	Pro	Gln	Leu	Gly	Ala	Lys	Ile	Val
	65		70		75									
Ala	Arg	Ala	Trp	Val	Asp	Pro	Glu	Phe	Lys	Gln	Arg	Leu	Leu	Thr
	80		85		90									
Asp	Ala	Thr	Ser	Ala	Cys	Arg	Glu	Met	Gly	Val	Gly	Gly	Met	Gln
	95		100		105									
Gly	Glu	Glu	Met	Val	Val	Leu	Glu	Asn	Thr	Gly	Thr	Val	His	Asn

110 115 120
MetValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrpProValLeu
125 130 135
GlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArg
140 145 150
AlaValArgAspProArgGlyValLeuAlaGluPheGlyTyrThr
155 160 165
ProAspProAspValGluIleArgIleTrpAspSerSerAlaGlu
170 175 180
LeuArgTyrTrpValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGluAsn
185 190 195
PheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuValThrArgAspSerLeu
200 205
IleGlyValSerValProThrThrProSerLysAla

β (L) -podjednotka:

5 10 15
MetAspGlyIleHisAspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyPro
20 25 30
IleLysProGluSerAspGluProValPheHisSerAspTrpGlu
35 40 45
ArgSerValLeuThrMetPheProAlaMetAlaLeuAlaGlyAla
50 55 60
PheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProPro
65 70 75
HisAspTyrLeuThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAla
80 85 90
MetIleHisHisGlyIleGluAlaGlyIlePheAspSerAspGlu
95 100 105
LeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspAspThr
110 115 120
ThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGln
125 130 135
LeuIleThrHisGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGlu
140 145 150
AlaAlaPheAlaValGlyAspLysValIleValArgSerAspAla
155 160 165
SerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgGlyArg
170 175 180
ValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAsp
185 190 195
ThrAsnAlaLeuGlyAlaGlyGluSerProGluHisLeuTyrThr
200 205 210
ValArgPheSerAlaThrGluLeuTrpGlyGluProAlaAlaPro
215 220 225
AsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuLeuPro
Ala

Dále se předložený vynález týká fragmentu DNA^(L) uvedeného výše, který obsahuje sekvence nukleotidů $\alpha^{(L)}$ - a $\beta^{(L)}$ - podjednotek, kde DNA sekvence $\alpha^{(L)}$ -podjednotky znamená

```
ATGACCGCCACAATCCCGTCCAGGGCACGTTGCCACGATCGAAC
GAGGAGATCGCCGCACGCGTGAAGGCCATGGAGGCCATCCTCGTC
GACAAGGGCCTGATCTCCACCGACGCCATCGACCACATGTCCTCG
GTCTACGAGAACGAGGTCCGTCCTCAACTCGGGCCAAAGATCGTC
GCCCGCGCCTGGGTCCGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCCTGCTCACC
GAGGCCACCAGCGCCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAG
GGCGAAGAAATGGTCTGTGGAAAACACCGGCACGGTCCACAAC
ATGGTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGCTATCCGTGGCCGGTTCTC
GGCCTGCCACCCAACCTGGTACAAGTACCCCGCCTACCGCGCCCGC
GCTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCCGAATTCGGATATACC
CCCGACCCTGACGTCCGAGATCCGGATATGGGACTCGAGTGCCGAA
CTTCGCTACTGGGTCTGCCGCAACGCCAGCCGGCACCGAGAAC
TTCACCGAAGAACAACCTCGCCGACCTCGTCAACCGCGACTCGCTC
ATCGGCGTATCCGTCCCCACCACACCCAGCAAGGCC
```

a DNA sekvence $\beta^{(L)}$ -podjednotky znamená

```
ATGGATGGAATCCACGACCTCGGTGGCCGCGCCGGCCTGGGTCCG
ATCAAGCCCGAATCCGATGAACCTGTTTTCCATTCCGATTGGGAG
CGGTCGGTTTTGACGATGTTCCCGGCGATGGCGCTGGCCGGCGCG
TTCAATCTCGACCAGTTCCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCGG
```

```
      195                210                225
CAGGACTACCTGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGCG
      240                255                270
ATGATCCACCACGGCATCGAGGCGGGCATCTTCGATTCCGACGAA
      285                300                315
CTCGACCGCCGCACCCAGTACTACATGGACCATCCGGACGACACG
      330                345                360
ACCCCCACGCGGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAA
      375                390                405
CTGATCACCCACGGAGCCGATTACCGACGCCCGACCGACACCGAG

      465                480                495
GTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATC
      510                525                540
CCGGAACGGCCGGCCGGCACCGACGGTTGGTCCGAGGAGGAGCTG
      555                570                585
ACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATCGGTGTCAGTAATCCG
      600
CTCACACCGCAGGAAGTGATCGTA
```

Dále se vynález týká rekombinantní DNA, obsahující ve vektoru DNA^(L) jak byla uvedena výše.

Ještě dále se vynález týká transformantu, který je transformován rekombinantní DNA, jak byla uvedena výše.

Ještě dále se vynález týká způsobu přípravy nitril-hydratasy kultivací transformantu uvedeného výše a izolací nitril-hydratasy z kultury.

Dále se vynález týká způsobu přípravy amidů, vyznačujícího se tím, že se nitrily hydratují nitril-hydratasou jak je uvedeno výše, za tvorby amidů.

Ještě dále se vynález týká způsobu přípravy amidů, který se vyznačuje tím, že se kultivuje výše uvedený transformant a nitrily se hydratují výslednou kulturou izolovaných bakteriálních buněk, materiálem z nich získaným nebo fixovaným,

Dále bude předložený vynález podrobněji popsán.
Postupuje se podle stupňů 1 až 8.

1.stupeň: Izolace a čištění nitril-hydratasy a částečné aminokyselinové sekvenování nitril-hydratasy

Z *Rhodococcus rhodochrous* J-1 /FERM BP-1478/ se izolují a vyčistí dva typy nitril-hydratasy /označené jako typ H a L/. Oba enzymy se rozdělí pomocí HPLC na podjednotky α a β . Určí se část aminokyselinové sekvence každé z podjednotek /obr.1/.

2.stupeň: Příprava DNA sondy na gen nitril-hydratasy

DNA sonda se připraví z JM105/pYUK121 /FERM BP-1937/ jak je popsáno v japonském patentu A-2-119778/1990 díky vysokému stupni homologie aminokyselinové sekvence nitril-hydratasové β -podjednotky z *Rhodococcus* sp. N-774 /popsané v uvedeném oficiálním japonském patentovém časopise "Japanese Patent Official Gazette"/ a z *Rhodococcus rhodochrous* J-1. plasmid z pYUK121, obsahující gen nitril-hydratasy odvozený od *Rhodococcus* sp. N-774 se připraví z kultury JM105/pYUK121. pYUK121 DNA se rozštěpí působením SphI a SalI. SphI-SalI fragment obsahuje gen nitril-hydratasy odvozený od *Rhodococcus* sp. N-774 /obr.2/. Fragment DNA se radioaktivně označí.

3.stupeň: Detekce segmentu DNA, obsahujícího gen nitril-hydratasy z chromosomu *Rhodococcus rhodochrous* J-1

Chromosomová DNA se připraví z kultury *Rhodococcus rhodochrous* J_1. Chromosomová DNA se rozštěpí restričními enzymy a hybridizuje se sondou popsanou ve stupni 2 s použitím Southernovy hybridizační metody /Southern E.M.: J.Mol. Biol. 98, 503 /1975//. Testují se dva DNA fragmenty různé délky.

4.stupeň: KONstrukce rekombinantního plasmidu

Rekombinantní plasmid se zkonstruuje vložení chromosomového DNA fragmentu připraveného podle stupně 3 do plasmidového vektoru.

5.stupeň: Transformace a testování transformantu, obsahujícího rekombinantní plasmid

Z rekombinantního plasmidu popsaného ve stupni 4 se připraví transformanty. Transformant, obsahující rekombinantní plasmid se vybere pomocí sondy popsané ve stupni 2 způsobem hybridizace kolonií /Bruce Wallace R. a kol., Nucl. Acids Res. 9, 379/1981//. Přítomnost genu nitril-hydratasy v rekombinantním plasmidu se potvrdí Southernovou hybridizační metodou. Takto vybrané plasmidy se označí pNHJ10H a pNHJ10L.

6.stupeň: Izolace a čištění plasmidové DNA a konstrukce restrikční mapy

Plasmidové pNHJ10H a pNHJ20L, které byly připraveny podle stupně 5, se izolují a vyčistí. Pro určené oblasti, obsahující gen nitril-hydratasy se zkonstruuje restrikční mapa DNA /obr.3/.

7.stupeň: SĚkvenování DNA

Příslušným restrikčním enzymem se vyštěpí z plasmidů pNHJ10H a pNHJ10L segment vloženého fragmentu DNA. Tento vložený fragment DNA se pak použije pro sekvenování. Nukleotidová sekvence fragmentu D /obr.4,5/ ukazuje, že fragment obsahuje sekvenci odvozenou od aminokyselinové sekvence popsané ve stupni 1.

8. stupeň: Příprava nitril-hydratasy pomocí transformantu a konverse nitrilů na amidy

Kultivuje se transformant popsaný v bodě 8. Tyto bakteriální buňky se smíchají s nitrily. Připraví se tak substrát nitril-hydratasy a amidů.

Rhodococcus rhodochrous J-1 byl uložen ve "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology" a byl označen číslem FERM-BP-1478. Transformant TGl/pNHJ10H, obsahující pNHJ10H popsaný ve stupni 5 a transformant TGl/pNHJ20L, obsahující pHJJ10L popsaný ve stupni 5 byl uložen v uvedené sbírce a označen číslem FERM BP-2777 a FERM BP-2778.

Lze používat jakékoliv vektory včetně plasmidového vektoru /např. pAT153, pMP9, pHC624, pKC7 atd./, fágového vektoru /např. gt11 /Toyobo/, Charon 44 /Amersham/ atd/. Mezi enzymy, které se mohou používat, patří SphI, SalI, EcoRI, Bam HI, SacI a podobné, komerčně dostupné od Takara Shuzo. Pro transformaci lze použít různé hostitele včetně /ale bez omezení pouze na tyto/ E.coli JM105 a E.coli T01. Jako kulturační média pro transformanty se používají taková kulturační média, která jsou obvykle v této oblasti používána.

Nitrily se na amidy převádějí pomocí nitril-hydratasy, surové nitril-hydratasy, kultury transformantů, izolovaných bakteriálních buněk nebo zpracovaných materiálů těchto buněk a pod., připravených z kultury transformantů.

Mezi vhodné nitrily podle vynálezu patří aromatické nitrily se čtyřmi až deseti atomy uhlíku v aromatické části a alifatické nitrily se dvěma až šesti atomy uhlíku, které jsou popsány v evropské patentové přihlášce č. 0307926. Typickými příklady jsou 4-,3- a 2-kyanopyridiny, 2-furonitril, kyanopyrazin, akrylonitril, methakrylonitril, krotonnitril, acetonitril a 3-hydroxypropionitril.

Tento vynález popisuje aminokyselinovou sekvenci a nukleotidovou sekvenci α - a β -podjednotek typu nitril-hydratasy odvozené od *Rhodococcus rhodochrous* J-1. Fragment DNA, kodující nitril-hydratasy se vloží do expresního vektoru a rekombinantní vektor se použije pro transformaci. Transformant obsahuje více kopií genu a může produkovat mnohem vyšší hladiny nitril-hydratasy při srovnání s konvenčně používanými mikroorganismy.

Dále je uveden popis obrázků na připojených výkresech.

Obr.1 - představuje N-koncové aminokyselinové sekvence α - a β -podjednotek dvou typů nitril-hydratasy produkováných *Rhodococcus rhodochrous* J-1.

Obr.2 - představuje sekvenci DNA genu nitril-hydratasy z *Rhodococcus* sp. N-774, která se používá jako sonda DNA.

Obr.3 - představuje restriční mapy rekombinantních plasmidů pHHJ10H a pNHJ20L.

Obr.4- představuje DNA sekvenci fragmentu DNA v pNHJ10H odvozeném od *Rhodococcus rhodochrous* J-1 a odvozenou aminokyselinovou sekvenci.

Obr. 5 - představuje DNA sekvenci fragmentu v pNHJ20L odvozeném od *Rhodococcus rhodochrous* J-1 a odvozenou aminokyselinovou sekvenci.

Předložený vynález bude dále podrobněji ilustrován v následujících příkladech, které jej v žádném případě nikterak neomezují. V příkladech jsou použity tyto zkratky: TE znamená Tris-HCl /10 mM, pH 7,8/ a EDTA /1 mM, pH 8,0/, TNE znamená Tris-HCl /50 mM, pH 8,0/, EDTA /1 mM, pH 8,0/ a NaCl /50 mM/, STE znamená Tris-HCl /50 mM, pH 8,0/, EDTA /5 mM, pH 8,0/ a sacharosa /35 mM/, 2x YT medium znamená 1,6 % Tryptonu, 1,0 % kvasničného extraktu a 0,5 % NaCl.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace a čištění nitril-hydratasy a částečné sekvenování aminokyselin nitril-hydratasy

Rhodococcus rhodochrous J-1 se kultivuje v mediu /3 g/l kvasničného extraktu, 0,5 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l hydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l síranu hořečnatého. $4H_2O$, 0,01 g/l chloridu kobaltnatého a 3 g/l krotonamidu, pH 7,2/ 80 hodin při teplotě 28 °C. Izolují se bakteriální buňky. 50 g bakteriálních buněk se rozruší a frakcionuje se síranem amonným. Vzorek se dialyzuje a dialyzát se odstřeďuje. Supernatant se nanese na chromatografickou kolonu naplněnou nosičem DEAE-Cellulofine, Phenyl-Sepharose, Sephadex G-150 a Octyl-Sepharose. Získají se dvě frakce s enzymovou aktivitou. Obě frakce se dialyzují. Dialyzáty se nanesou na kolonu s reverzní fází /Senshu Pak VP-304-125, Senahu Kagaku/ a chromatografují se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Získají se dvě podjednotky / α a β /. N-Koncové aminokyselinové sekvence $\alpha_i^{(H)}$ -, $\beta_i^{(H)}$ -, $\alpha_i^{(L)}$ - a $\beta_i^{(L)}$ - podjednotek byla stanovena na proteiňovém sekvenátoru Applied Biosystems model 470A. Sekvence aminokyselin jsou uvedeny na obr. 1.

1 je 1
4 α , β ,

Příklad 2

Příprava DNA sondy pro gen nitril-hydratasy

E.coli JM105 /FERM BP-1937/, obsahující pYUK121 se kultivuje ve 100 ml media 2xYT, obsahujícího 50 μ g/ml ampicilinu při 30 °C přes noc /12 hodin/. Bakteriální buňky se izolují. K buňkám se přidá TNE. Suspenze buněk se pak odstřeďuje. K peletě se přidá 8 ml STE a 10 mg lysozymu. Směs se inkubuje 5 minut při teplotě 0 °C. Potom se přidají 4 ml 0,25M EDTA. Ke směsi se za teploty místnosti přidají 2 ml 10% SDS a 5 ml chloridu sodného. Výsledná směs se inkubuje tři hodiny při teplotě 0 až 4 °C. Potom se směs odstřeďuje na ultraodstředivce. K supernatantu se přidá 1/2 objemu 30% PEG 5000. Směs se inkubuje přes noc /12 hodin/ při 0 °C až 4 °C a odstředí se.

K peletě se přidá tolik TNE, aby objem roztoku byl 7,5 ml. K suspenzi se přidá CaCl. Odstředěním směsi se odstraní proteiny. K supernatantu se pak přidá 300 až 500 mg/ml ethidiniumbromidu. Směs se přenesse do ultracentrifugační zkumavky. Zkumavka se zataví a potom se odstřeďuje v ultraodstřeďovce. cccDNase vyextrahuje peristaltickou pumpou. K extraktu se přidá o něco více než je stejné množství isopropylalkoholu nasyceného vodou, pro odstranění ethidiniumbromidu. Vzorek se dialyzuje proti TE. Získají se tak asi 3 ml vyčištěného pYUK121.

pYUK121 DNA se rozštěpí působením SphI a Sali. Získá se tak fragment DNA o 2070 nukleotidech, obsahující gen nitril-hydratasý odvozený od Rhodococcus sp. N-774, Označením fragmentu ^{32}P se získá sonda. Sekvence nukleotidů sondy je uvedena na obr. 2.

Příklad 3

Příprava fragmentu DNA, obsahujícího gen nitril-hydratasový gen z chromosomu

Rhodococcus rhodochrous J-1 se kultivuje ve 100 ml media /10 g/l glukosy, 0,5 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l hydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l síranu hořečnatého. 7 H₂O/, 1 g/l kvasničného extraktu, 7,5 g/l peptonu, 0,01 g/l chloridu kobaltnatého, 7,5 g/l močoviny, 1 % glycinu nebo 0,2 µg/ml ampicilinu, 1 litr vody, pH 7,2/. Bakteriální buňky se izolují a pelety se promyjí TNE. Pelety se suspendují v 10 ml TE. K suspenzi se přidají 4 ml 0,25M EDTA, 10 až 20 mg lysozymu, 10 až 20 mg acromoproteasy a 10 ml 10xSDS. Suspenze se inkubuje tři hodiny při 37 °C. K suspenzi se přidá 15 ml fenolu. Směs se inkubuje patnáct minut při teplotě místnosti, odstředí, horní vrstva se odloží a k supernatantu se přidá 0,7 ml 2,5M octanu sodného a diethylether. Směs se odstřeďuje. Horní vrstva se odstraní. Ke spodní vrstvě se přidají dva objemy ethanolu a DNA se odebere skleněnou tyčinkou. DNA se promývá pět minut směsí TE:ethanol 2:8,1:9 a 0:10 /objemové

díly:objemovým dílům/. Potom se DNA suspenduje ve dvou až čtyřech ml TE /37 °C/. K suspenzi se přidá 10 μ l směsi RNA-sy A a T₁. Směs se inkubuje při teplotě 37 °C. Ke směsi se přidá stejné množství fenolu a výsledná směs se odstředí. K supernatantu se přidá více než stejné množství etheru. Směs se opět odstřeďuje. Horní vrstva se oddělí. Spodní se přes noc dialyzuje proti dvěma litrům TE, obsahujícího malé množství chloroformu, potom se dialyzuje tři až čtyři hodiny proti čerstvému TE. Získají se tak 4 ml surové chromosomové DNA.

K 15 μ l surové chromosomové DNA se přidá 10 μ l TE, 3 μ l reakčního pufru /10x/ a 2 μ l SacI. Směs se inkubuje jednu hodinu při teplotě 37 °C. Potom se elektroforezuje na agarosovém gelu tři hodiny při 60 V. Southernova hybridizace chromosomové DNA se provádí sondou, která je popsána v příkladu 2. Silnou hybridizaci vykazovaly fragmenty s asi 6000 nukleotidy a 9400 nukleotidy.

Působením SacI se rozštěpí 15 μ l chromosomové DNA. Směs se elektroforezuje na agarosovém gelu jak bylo dříve popsáno. Z gelu se vyříznou fragmenty DNA se 6000 a 9400 nukleotidy a přenesou se do třech objemů 8M chloristanu sodného. Po rozpuštění se každý roztok natečkuje na filtrační papír GF/C /Whatman//průměr 6 mm/. Na filtrační papír se pak přidá 10 kapek /přibližně 100 mikrolitrů/ TE, obsahujícího 6M chloristan sodný a 10 kapek /přibližně 100 mikrolitrů/ 95% ethanolu. Papír se suší tři minuty na vzduchu, přenesou se do 0,5ml eppendorfovy zkumavky, přidá se 40 mikrolitrů TE a vše se inkubuje třicet minut při teplotě 47 °C. Zkumavka se pak odstřeďuje. Získá se asi 40 mikrolitrů supernatantu, který obsahuje fragmenty DNA o 6000 a 94000 nukleotidech, které obsahují nátrilhydrátasový gen chromosomové DNA.

Dále je popsán způsob inserce fragmentu DNA o 6000 nukleotidech do vektoru. Stejný způsob se použije také pro inserci fragmentu DNA o 9400 nukleotidech do vektoru.

Příklad 4

Inzerce fragmentu chromosomové DNA do vektoru

K 10 μ l pUC19 se přidá 10 μ l TE, 3 μ l reakčního pufru /10x/ a 2 μ l SacI. Směs se inkubuje jednu hodinu při 30 °C. Pro zastavení reakce se ke směsi přidají 2 μ l 0,25M EDTA. Potom se ke směsi přidá 7 μ l 1M Tris-HCl /pH 9/ a 3 μ l BAP /bakteriální alkalická fosfatáza/. Směs se inkubuje jednu hodinu při teplotě 65 °C. Ke směsi se přidá tolik TE, aby konečný objem byl 100 mikrolitrů. Směs se extrahuje 3x stejným množstvím fenolu. K extraktu se přidá stejné množství etheru. Spodní vrstva se odebere a přidá se k ní 10 mikrolitrů 3% octanu sodného a 250 mikrolitrů ethanolu. Směs se inkubuje třicet minut při teplotě -80 °C, odstředí se, vysuší a resuspenduje v TE.

Pět mikrolitrů takto získané pUC19 DNA se smísí se 40 μ l fragmentu DNA o 6000 nukleotidech, který byl popsán v příkladu 3. Ke směsi se přidá 6 μ l ligačního pufru, 6 μ l ATP /6 mg/ml/ a 3 μ l T4 DNA ligasy. Směs se inkubuje přes noc /12 hodin/ při 4 °C. Získá se tak rekombinantní plasmid, obsahující fragment DNA o 6000 nukleotidech, kodující žádaný enzym v místě SacI pUC19.

Příklad 5

Transformace a testování transformantů

Do 10 ml media 2xYT se naočkuje E.coli Tgl /Amersham/ a inkubuje se dvanáct hodin při 37 °C. Po inkubaci se výsledná kultura přidá k čerstvému mediu 2xYT na koncentraci asi 1 % a směs se inkubuje 2 hodiny při teplotě 37 °C. Kultura se odstředí a peleta se suspenduje v 5 ml chladného 50 mM chloridu vápenatého. Suspenze se vloží do ledu na 40 minut a pak se odstředí. K peletě se přidá 0,25 ml chladného 50 mM chloridu vápenatého a 60 mikrolitrů rekombinantní DNA, která je po-

psána v příkladu 4. Směs se inkubuje 40 minut při teplotě 0 °C, vystaví se dvouminutovému působení tepelného šoku /42 °C/, vloží se na pět minut do ledu a přidá se k 10 ml media 2xYT. Směs se inkubuje 90 minut při 37 °C za třepání. Potom se odstředí. Peleta se suspenduje v 1 ml media 2xYT. Na agarosovou plotnu, obsahující /2xYT/ 50 µg/ml ampicilinu se jednotlivě vysejí dva podíly /po 10 mikrolitrech/ suspenze. Plotna se inkubuje při teplotě 37 °C. Kolonie vyrostlé na plotně se vyberou způsobem hybridizace kolonií: kolonie se přenesou na nitroceluloseový filtr a rozštěpí. DNA zůstala fixována na filtru. Byla hybridizována sondou jak je to popsáno v příkladu 2. Filtr se autoradiografuje. Vybere se rekombinantní kolonie. Přítomnost genu nitril hydratasy v transformantu byla potvrzena také Southernovou hybridizační metodou.

Příklad 6

Izolace a ^{čištění} ~~čištění~~ rekombinantního plasmidu a konstrukce restrikční mapy vložených fragmentů DNA

Transformant, který se vybere jak je popsáno v příkladu 5, se nechá růst ve 100 ml media 2xYT, obsahujícího 50 µg/ml ampicilinu přes noc /12 hodin/ při 37 °C. Izolují se bakteriální buňky. K buňkám se přidá TNE. Buňky se opět odstředí. K buňkám se přidá 8 ml STE a 10 mg lysozymu. Směs se inkubuje pět minut při 0 °C. Ke směsi se přidají 4 ml 0,25N EDTA, 2 ml 10% SDS /za teploty místnosti/ a 5 ml 5M chloridu sodného. Směs se inkubuje tři hodiny při teplotě 0 až 4 °C a odstřeďuje se na ultraodstředivce. K supernatantu se přidá 1/2 objemu 30% PEG. Směs se inkubuje přes noc /12 hodin/ při teplotě 0 až 4 °C a opět se odstřeďuje. K peletě se přidá tolik TNE, aby konečný objem byl 7,5 ml. K suspenzi se přidá CsCl. Tím se suspenze zbaví proteinů. K supernatantu se potom přidá 300 až 500 mg/ml ethidiniumbromidu a směs se přenesou do centrifugační zkumavky. Zkumavka se zataví a odstřeďuje se na ultracentrifuze. Peristaltickou pumpou se odstraní

cccDNA. K cccDNA se pro odstranění ethidiniumbromidu přidá o něco víc než stejné množství isopropylalkoholu nasycené vodou. Vzorek DNA se dialyzuje proti TE. Získají se asi 3 ml vyčištěné rekombinantní DNA. Takto získaný rekombinantní plasmid, obsahující fragment DNA o 67000 nukleotidech se označí pNHJ10H a rekombinantní plasmid, obsahující fragment DNA o 9400 nukleotidech se označí pNHJ20L.

Tyto plasmidové DNA se rozštěpí působením EcoRI, BamHI, PstI, SacI, popř. SalI. Zkonstruované mapy jsou uvedeny na obr. 3.

Příklad 7

Sekvenování DNA

Umístění genu nitril-hydratasy ve fragmentu DNA pNHJ10H bylo stanoveno podle zkonstruované restriční mapy a podle Southernovy hybridizační metody. Přidaný segment v pNHJ10H byl štěpen působením PstI a SalI. Fragment DNA o 6000 nukleotidech poskytl fragment o 1970 nukleotidech. Podobně byl štěpen působením EcoRI a SacI přidaný fragment v pNHJ20L. Z fragmentu o 9400 nukleotidech byl získán fragment o 1730 nukleotidech.

Tyto fragmenty DNA byly sekvenovány způsobem podle Sangera /Sanger F.:Science 214, 1205 až 1210/1981// pomocí fágového M13 vektoru. Sekvence nukleotidů fragmentu DNA o 1970 nukleotidech /pNHJ10H/ a sekvence nukleotidů fragmentu DNA o 1730 nukleotidech /pNHJ20L/ jsou uvedeny na obr.4 a 5.

Bylo zjištěno, že sekvence aminokyselin odvozená od sekvence nukleotidů je plně identická se sekvencí aminokyselin, která byla stanovena v příkladu 1. Sekvenční analýza také odhalila, že fragment DNA obsahoval sekvenci, obsahující α - a β -podjednotky.

Příklad 8

Příprava nitril-hydratasy pomocí transformantu a konverze nitrilů na amidy pomocí nitril-hydratasy

Do 10 ml media 2xYT, které obsahuje 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu se naočkuje TG-1/pNHJ10H a TG-1/pNHJ20L. Směs se inkubuje přes noc při teplotě 30 °C /12 hodin/. Jeden mililitr výsledné kultury se přidá ke 100 ml media 2xYT /50 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu, 0,1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ /. Směs se inkubuje čtyři hodiny při 30 °C. Ke směsi se přidá IPTG na konečnou koncentraci 1 mM. Směs se inkubuje 10 hodin při 30 °C. Po izolování buněk se buňky suspendují v 5 ml 0,1M fosforečnanového pufru /pH 7,5/. Suspenze se rozbije ultrazvukem /pět minut/ a odstřeďuje se 30 minut při 12000 g. Výsledné supernatanty se použijí pro enzymovou analýzu.

Enzymová analýza se provádí v reakční směsi /12 ml/, obsahující 50 mM pufru fosforečnanu draselného /pH 7,5/, 6 ml benzonitrilu a příslušné množství enzymu. Reakce se nechá probíhat 30 minut při 20 °C. Reakce se zastaví přidáním 0,2 ml 1M HCl. Množství vytvořeného benzamidu v reakční směsi bylo stanoveno HPLC. Jako kontrola se používá reakční směs získaná stejným postupem jak bylo výše popsáno z E. coli TG-1. Hladiny nitril-hydratasy v bezbuněčných extraktech E.coli, obsahujících pNHJ10H a pNHJ20L byly $1,75 \cdot 10^{-3}$ a $6,99 \cdot 10^{-3}$ jednotek na mg při kultivaci v mediu 2xYT za přítomnosti CoCl_2 a IPTG. V reakční směsi s TG-1/pNHJ10H a pNHJ20L byl nalezen benzamid, zatímco v reakční směsi s TG-1 žádný benzamid nalezen nebyl.

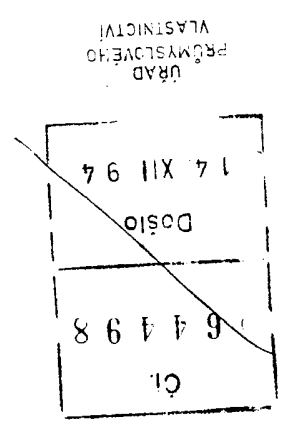
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Fragment DNA^(L), kodující polypeptid, který má nitril-hydratasovou aktivitu, kde uvedený polypeptid obsahuje $\alpha^{(L)}$ - a $\beta^{(L)}$ -podjednotky následujících sekvencí aminokyselin:

$\alpha^{(L)}$ -podjednotka:

```

      5           10           15
MetThrAlaHisAsnProValGlnGlyThrLeuProArgSerAsn
      20           25           30
GluGluIleAlaAlaArgValLysAlaMetGluAlaIleLeuVal
      35           40           45
AspLysGlyLeuIleSerThrAspAlaIleAspHisMetSerSer
      50           55           60
ValTyrGluAsnGluValGlyProGlnLeuGlyAlaLysIleVal
      65           70           75
AlaArgAlaTrpValAspProGluPheLysGlnArgLeuLeuThr
      80           85           90
AspAlaThrSerAlaCysArgGluMetGlyValGlyGlyMetGln
      95           100          105
GlyGluGluMetValValLeuGluAsnThrGlyThrValHisAsn
      110          115          120
MetValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrpProValLeu
      125          130          135
GlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArg
  
```



AlaValArgAsp¹⁴⁰ProArgGlyVal¹⁴⁵LeuAlaGluPheGlyTyrThr¹⁵⁰
ProAspProAsp¹⁵⁵ValGluIleArgIleTrpAspSerSerAlaGlu¹⁶⁵
LeuArgTyrTrp¹⁷⁰ValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGluAsn¹⁸⁰
PheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuVal¹⁸⁵ThrArgAspSerLeu¹⁹⁵
IleGlyValSerVal²⁰⁰ProThrThrProSerLysAla²⁰⁵

β (L) - podjednotka:

MetAspGlyIleHis⁵AspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyPro^{10 15}
IleLysProGluSer²⁰AspGluProValPheHisSerAspTrpGlu^{25 30}
ArgSerValLeuThr³⁵MetPheProAlaMetAlaLeuAlaGlyAla^{40 45}
PheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProPro^{50 55 60}
HisAspTyrLeuThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAla^{65 70 75}
MetIleHisHisGlyIleGluAlaGlyIlePheAspSerAspGlu^{80 85 90}
LeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspAspThr^{95 100 105}
ThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGln^{110 115 120}
LeuIleThrHisGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGlu^{125 130 135}
AlaAlaPheAlaValGlyAspLysValIleValArgSerAspAla^{140 145 150}
SerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgGlyArg^{155 160 165}
ValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAsp^{170 175 180}
ThrAsnAlaLeuGlyAlaGlyGluSerProGluHisLeuTyrThr^{185 190 195}
ValArgPheSerAlaThrGluLeuTrpGlyGluProAlaAlaPro^{200 205 210}
AsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuLeuPro^{215 220 225}
Ala

2. Fragment DNA^(L) podle nároku 1, obsahující sekvence nukleotidů $\alpha^{(L)}$ - a $\beta^{(L)}$ -podjednotek, kde DNA sekvence $\alpha^{(L)}$ -podjednotky znamená:

```
ATGACCGCCCACAATCCCGTCCAGGGCACGTTGCCACGATCGAAC
GAGGAGATCGCCGCACGCGTGAAGGCCATGGAGGCCATCCTCGTC
GACAAGGGCCTGATCTCCACCGACGCCATCGACCACATGTCCTCG
GTCTACGAGAACGAGGTCCGTCCTCAACTCGGGCCCAAGATCGTC
GCCCGCGCCTGGGTCCGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCCTGCTCACC
GACGCCACCAGCGCCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAG
GGCGAAGAAATGGTTCGTGCTGGAAAACACCGGCACGGTCCACAAC
ATGGTTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGCTATCCGTGGCCGGTTCTC
GGCCTGCCACCCAACCTGGTACAAGTACCCCGCCTACCGCGCCCGC
GCTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCCGAATTCGGATATACC
CCCGACCCTGACGTCCGAGATCCGGATATGGGACTCGAGTGCCGAA
CTTCGCTACTGGGTCCCTGCCGCAACGCCCGCCAGCCGGCACCGAGAAC
TTCACCGAAGAACAACCTCGCCGACCTCGTCACCCGCGACTCGCTC
ATCGGCGTATCCGTCCCCACCACACCCAGCAAGGCC
```

a DNA sekvence $\beta^{(L)}$ - podjednotky znamená:

```
ATGGATGGAATCCACGACCTCGGTGGCCCGCCGGCCTGGGTCCG
ATCAAGCCCGAATCCGATGAACCTGTTTTCCATTCCGATTGGGAG
CGGTCCGTTTTGACCGATGTTCCCGGCGATGGCGCTGGCCGGCGCG
TTCAATCTCGACCAGTTCCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCGG
CAGGACTACCTGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGGC
ATGATCCACCACGGCATCGAGGGGGCATCTTCGATTCCGACGAA
CTCGACCGCCGACCCAGTACTACATGGACCATCCGGACGACACG
```

ACCCCCACGGCGGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAA³³⁰ ³⁴⁵ ³⁶⁰
CTGATCACCCACGGAGCCGATTACCGACGCCCGACCGACACCGAG³⁷⁵ ³⁹⁰ ⁴⁰⁵
GCCGCATTGCCCGTAGGGGACAAAGTCATCGTGCGGTCCGGACGCC⁴²⁰ ⁴³⁵ ⁴⁵⁰
TCACCGAACACCCACACCCGCGCGCCGGATACGTCCGCGGTCTGT⁴⁶⁵ ⁴⁸⁰ ⁴⁹⁵
GTCGGCGAAGTCGTGGCGACCCACGGCGCGTATGTCTTTCCGGAC⁵¹⁰ ⁵²⁵ ⁵⁴⁰
ACCAACGCACTCGGCGCCGGCGAAAGCCCCGAACACCTGTACACC⁵⁵⁵ ⁵⁷⁰ ⁵⁸⁵
GTGCGGTTCTCGGCGACCGAGTTGTGGGGTGAACCTGCCGCCCGG⁶⁰⁰ ⁶¹⁵ ⁶³⁰
AACGTCTCAATCACATCGACGTGTTTGAACCGTATCTGCTACCG⁶⁴⁵ ⁶⁶⁰ ⁶⁷⁵
GCC

3. Rekombinantní DNA, obsahující ve vektoru DNA^(L) podle nároků 1 a 2.
4. Transformant TGI/pNHJ20L/FERM BP-2778/ E.coli, který je transformován rekombinantní DNA podle nároku 3.
5. Způsob přípravy nitril-hydratasy, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivuje transformant podle nároku 4 a nitril-hydratasa se izoluje z kultury.

6. Způsob přípravy amidů vybraných ze skupiny zahrnující 4-pyridin^{karboxamid}, nikotinamid, 2-pyridinkarboxamid, benzamid, 2,6-difluorbenzamid, 2-thiofenkarboxamid, 2-furankarboxamid, pyrazinamid, akrylamid, methakrylamid, krotonamid, acetamid a 3-hydroxypropionamid, vyznačující se tím, že se aromatické nitrily, mající 4 až 10 atomů uhlíku v aromatické skupině, a alifatické nitrily, mající 2 až 6 atomů uhlíku, hydratují nitril-hydratasou získanou z kultury transformantu podle nároku 4.

7. Způsob přípravy amidů vybraných ze skupiny zahrnující 4-pyridin^{karboxamid}, nikotinamid, 2-pyridinkarboxamid, benzamid, 2,6-difluorbenzamid, 2-thiofenkarboxamid, 2-furankarboxamid, pyrazinamid, akrylamid, methakrylamid, krotonamid, acetamid a 3-hydroxypropionamid, vyznačující se tím, že se kultivuje transformant podle nároku 4 a aromatické nitrily, mající 4 až 10 atomů uhlíku v aromatické skupině, a alifatické nitrily, mající 2 až 6 atomů uhlíku, se hydratují výslednou kulturou izolovaných bakteriálních buněk, materiálem z nich zpracovaným nebo fixovaným za vzniku odpovídajících amidů.

-Zastupuje: