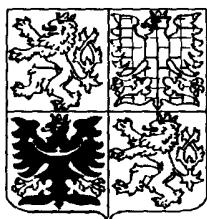


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 22.03.96
(32) 24.03.95, 13.04.95
(31) 95/19510930, 95/19514056
(33) DE, DE
(40) 11.12.96

(21) 875-96

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/31
C 12 N 15/11
C 12 N 15/63
C 12 N 1/20
C 07 K 14/195
C 07 K 14/26

- (71) CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE
INDUSTRIE GMBH, München, DE;
- (72) Böck August Prof. Dr., Geltendorf, DE;
Mayer Dagmar, München, DE;
Schlensog Verena Dr., Ismaning, DE;
Candussio Anton Dr., München, DE;
- (54) **Regulovatelný expresní systém, regulátorový
protein, gen, kodující protein, expresní kazeta,
mikroorganismy, obsahující expresní systém,
způsob fermentace a výroby proteinů a použití
Fnr-negativních mikroorganismů**
- (57) Podstatou vynálezu je acetátem, pH-hodnotou a kyslíkem
regulovatelný expresní systém, obsahující trans-působící
regulátorový protein a jeden tímto proteinem aktivovatelný
promotor. Libovolné strukturní geny se exprimují pod
kontrolou expresního systému při parciálním tlaku kyslíku
pO₂ 0 až 5 %, hodnotě pH 6,0 až 6,5 a za přítomnosti acetátu
v koncentraci 40 až 60 mM maximálně. Vynález se dále
týká způsobu pro výrobu a použití expresního systému.

PŘÍL.	URAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	19. IX. 96	DOŠLO	875/87	875- 96
				č.j. 684/92	

Regulovatelný expresní systém, regulátorový protein, gen, kodující protein, expresní kazeta, mikroorganismy, obsahující expresní systém, způsob fermentace a výroby proteinů a použití Fnr-negativních mikroorganismů

Oblast techniky

Vynález se týká regulovatelného expresního systému, způsobu jeho výroby a použití.

Dosavadní stav techniky

Důležitou oblastí využití moderní genové technologie je produkce definovaných proteinů za použití rekombinantních produkčních systémů. Takové rekombinantní produkční systémy sestávají alespoň ze dvou složek, a to a) hostitele, který poskytuje buněčný nástroj pro produkci proteinu a b) rekombinantních DNK, které kodují produkovaný protein.

Znamé hostitelské systémy jsou např. mikroorganismy, zvířata, rostliny nebo eukaryotické buněčné kultury. Pro produkci větších množství rekombinantních proteinů se jako hostitelské systémy používají výhodně mikroorganismy jako houby nebo bakterie, zejména E.coli.

Rekombinantní DNK, které obsahují genetickou informaci pro produkci definovaného proteinu, mohou být integrovány v chromosomu hostitele nebo episomálně, ve formě plasmidu, kosmidu nebo fágů popřípadě virů. Vedle genetické informace pro produkovaný protein obsahuje rekombinantní DNK regulační prvky, tak zvané promotory, které jsou nezbytné pro první stupeň exprese strukturního genu, transkripci DNK - sekvence do RNK. Promotory, definované krátké DNK -regiony, přitom slouží jako rozpoznávací místa pro RNK polymerázy, enzymy, které katalyzují transkripci DNK-sekvencí na RNK.

Promotory jsou často funkčně kombinovány s DNK-regiony, které slouží jako rozpoznávací nebo vazebná místa pro skupiny proteinů, které v závislosti na různých stimulech ovlivňují aktivitu promotorů a proto se označují jako regulátory. Vazbou takových regulátorů na jejich vazebná místa mohou být s nimi spojené promotory aktivovány (aktivátory) nebo reprimovány (represory). V genetických systémech pro produkci rekombinantních proteinů se používají takové interakce regulátor/promotor, aby produkce cílových proteinů byla regulovatelná.

Příklady takových technicky použitelných systémů jsou lac- a tac-promotor, kdy se jedná o promotory, které se inaktivují vazbou tzv. lac-represor proteinu. Při přidavku laktozy nebo analogu laktozy jako je IPTG, oddisociuje represor ze svého vazebného místa; dochází k indukci exprese genů položených za promotorem.

Další technicky použitelný regulační systém sestává z kombinace trp-promotoru a trp-represor proteinu. Jen za přítomnosti tryptofanu se váže receptor na promotor a tento inaktivuje.

Pro technickou produkci rekombinantních proteinů mají tyto systémy mnoho nevýhod. Pro indukci nebo represi tohoto systému používané substance jsou drahé a těžko dostupné, zejména když se jedná o metabolizované substance jako je laktoza nebo tryptofan. Polární poměr regulátorového proteinu a promotoru ovlivňuje silně reprimovatelnost expresního systému. Při přebytku promotoru nejsou takové systémy plně reprimovatelné, protože se represor vytitroval. Promotory závislé na lac-represoru nejsou při molárním přebytku represoru navíc plně indukovatelné.

V DE 3926076 A1 (odpovídá CA-A-2015046) je popsáno použití pfl-promotoru pro produkci rekombinantních proteinů. Tento E.coli vlastní promotor se indukuje za přítomnosti regulátorového proteinu FNR za anaerobních podmínek a pyruvátem a reprimuje kyslíkem. Ve srovnání s lac-, tac- nebo trp-promotorem má pfl-promotor tu přednost, že je technicky jednoduše a levně indukovatelný. Regulace se provádí tak, že se na začátku fermentace aktivita promotoru potlačí přívodem kyslíku. V pozdější logaritmické fázi růstu dochází působením velké buněčné hmoty automaticky k omezení kyslíku, které může technicky posilovat fermentaci nebo ji regulovat. Navíc se v této růstové fázi z hostitelského organismu tvoří pyruvát, který posiluje expresi. Popřípadě může být přidán z zvějšku další pyruvát pro řízení indukce.

Přes své přednosti proti jiným promotorům je tento promotor z následujících důvodů vhodný jen k technické produkci rekombinantních proteinů. Při použití pfl-promotoru není možné indukovat expresi rekombinantního proteinu za přítomnosti kyslíku. Je však žádoucí vybudit maximální syntézní výkon hostitele, který u E.coli probíhá při aerobním růstu během exponenciální růstové fáze, pro produkci rekombinantních proteinů. I když pfl-promotor za aerobních podmínek není indukovatelný, má za přítomnosti kyslíku základní aktivitu, tj. pfl-promotor není plně reprimovatelný. Minimální reaktivita pfl-promotoru za aerobních podmínek činí 5 až 10 % aktivity promotoru za optimálních indukčních podmínek (anaerobně s pyruvátem). Reagulační systém sestává z FNR-regulátorového proteinu a pfl-promotor je proto systém, který je sice technicky jednoduchý a cenově přijatelný, který však není plně reprimovatelný a ne za všech růstových podmínek indukovatelný. Jako všechny ostatní známé technicky používané promotorové systémy, je také pfl-promotor vhodný jen k expresi

strukturních genů nebo rekombinantních genů.

Blomquistem a spol. (J.Bact.(1933) sv.175(5), str. 1392-1404) byla popsána DNK-sekvence 2,3-butandiolového operonu (bud-operon) z *Klebsiella terrigena*. Je známo, že v *Klebsiella terrigena* se tvorba 2,3-butandiolu indukuje nižší hodnotou pH, přítomností acetátu a omezením kyslíku. Blomquist a spol ukazují, že geny, které kodují proteiny potřebné pro vazbu 2,3-butandiolu, tvoří operon, jehož transkripce se indukuje omezením kyslíku. Literatura neobsahuje žádné zmínky o indukci promotoru za přítomnosti kyslíku.

Úlohou vynálezu je nalézt expresní systém, který by umožňoval technicky jednoduše říditelnou expresi za všech růstových podmínek hostitelského organismu.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je acetátem, pH-hodnotou a kyslíkem regulovatelný expresní systém, obsahující trans působící regulátorový protein a tímto proteinem aktivovatelný promotor, který se vyznačuje tím, že regulátorový protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je nejméně ze 75 % homologní s aminokyselinovou sekvencí Seq.ID-č.:1, a promotor, který obsahuje DNK sekvenci, která je alespoň z 95 % homologní s bázemi 315 až 397 DNK-sekvence Seq.ID-č.:2.

Expresní systém podle vynálezu exprimuje libovolné strukturní geny pod kontrolou expresního systému při parciálním tlaku kyslíku pO_2 0-5 %, hodnotě pH 6,0 až 6,5 a za přítomnosti acetátu v koncentraci maximálně 40 až 60 mM.

Expresní systém podle vynálezu umožňuje poprvé technicky

také ve velkém měřítku jednoduše proveditelnou, levnou regulaci exprese rekombinantního genového produktu nezávisle na růstové fázi produkčních kmenů a obsahu O_2 v kultivačním mediu.

Podstatou předloženého vynálezu je dále regulátorový protein, který se vyznačuje tím, že při omezení kyslíku a za přítomnosti acetátu a hodnotě pH kultivačního media 6,0 až 6,5 působí optimální aktivaci bud-promotoru z *Klebsiella terrigena* (DSM2687).

Při omezení kyslíku ve výše uvedeném smyslu je parciální tlak pO_2 0 až 5 %. Koncentrace acetátu činí za těchto podmínek výhodně 40 až 60 mM.

Výhodně obsahuje regulátorový protein podle vynálezu aminokyselinovou sekvenci, která je alespoň ze 75 % hmologní s aminokyselinovou sekvencí Seq.ID-č:1.

Zvláště výhodná forma provedení zahrnuje aminokyselinovou sekvenci regulátorového proteinu podle vynálezu aminokyselinovou sekvenci Seq.ID-č:1. Takový regulátorový protein bude dále označován také jako BudR.

Promotor expresního systému může obsahovat libovolný DNK-region, který za BudR aktivujících podmínek vede k BudR-závislé iniciaci transkripce bezprostředně "downstream" k tomuto regionu ležícího genu. K fyziologickým podmínkám, při kterých se BudR maximálně aktivuje, patří parciální tlak kyslíku pO_2 0 až 5 %, přítomnost acetátu v koncentraci 40 až 60 mM a hodnota pH 6,0 až 6,5.

Výhodně obsahuje promotor DNK-sekvenci, která je alespoň

z 95 % homologní s bázemi 315 až 456 v DNK sekvenci ID-č:2.

Ve zvláště výhodném provedení obsahuje promotor DNK-sekvenci ID-č:2 v oblasti bází 315 až 397. Takový DNK-region se dále také označuje jako bud-promotor.

Gen pro regulátorový protein podle vynálezu může být syntetizován buď plně chemicky nebo enzymaticky in vitro podle v Seq.ID-č.:1 poskytnuté sekvence nebo může být izolován z mikroorganismu vytvářejícího 2,3-butandiol.

Regulátorový protein podle vynálezu se výhodně získá expresí dostupného genu takového typu. Vynález se proto také popřípadě týká genů, které kodují regulátorový protein podle vynálezu.

Klonování genu, který koduje regulátorový protein podle vynálezu, se výhodně provádí za použití takzvaného reporterového kmene. Konstrukce reporterových kmenů pro aktivátory transkripce se odborníkovi zná. Takový kmen obsahuje gen pro výhodně jednoduše prokazatelný protein pod transkripční kontrolou bud-promotoru. Příkladem reporterového kmenu je E.coli BL 142 (srov.příklady 5 a 7).

Jako reporterový gen se výhodně používá odborníkovi známý gen pro β -galaktosidázu na plasmidu pRS552 (Simons a spol.(1987), Gene, sv.53, str.85 až 96).

Pro klonování genu, který koduje regulátorový protein podle vynálezu, se zavede do takového reporterového kmene genová banka z mikroorganismu, který tvoří regulátorový protein podle vynálezu. Konstrukce genové banky a její izolace je odborníkovi zřejmá.

Způsob klonování pomocí reporterového kmene je odborníkovi také známý. Může být například proveden způsobem popsaným Casadanem a Cohenem (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.USA, sv.76,č.9, str. 4530-4533.

K detekci klonů, které vytvářejí hledaný protein, se izolují z genové banky takové klony, u kterých se reporterové geny indukují při pH 6,5 a za přítomnosti acetátu. V případě použití β -galaktosidázy jako reporterového genu obsahují indikátorové plotny například barvivo X-Gal. Takové klony, které v případě použití β -galaktosidázy jako reporterového genu se na X-Gal-obsahujících indikátorových plotnách zabarvují tmavomodře, obsahují regulátorový protein podle vynálezu.

Ve výhodném provedení vynálezu se gen pro regulátorový protein izoluje z genové banky mikroorganismů rodů *Enterobacter* nebo *Klebsiella*, výhodně z *Klebsiella terrigena* (obchodně dostupný od DSM-Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig pod označením DSM2687). *Klebsiella terrigena* je uložena na Mezinárodním ukládacím místě podle předpisů Budapeštské smlouvy pod přírůstkovým číslem DSM 9883.

V zásadě může být gen pro regulátorový protein izolován z mikroorganismu, například 2,3-butandiol tvořícího mikroorganismu, zejména ze 2,3-butandiol tvořícího mikroorganismu z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Způsoby výroby pro expresní systém vhodného promotoru jsou odborníkům zřejmé a není proto nutno je podrobně vysvětlovat. Jedním takovým způsobem pro výrobu DNK-fragmentu, který zprostředkuje promotorovou aktivitu podle vynálezu, je

chemická nebo enzymatická "de novo" syntéza za použití sekvenční informace uvedené v Seq.ID-č:2.

Další způsob výroby promotoru zahrnuje modifikaci jakéhokoliv DNK-fragmentu pomocí odborníkovi známých metod mutageneze za použití sekvenčních informací uvedených v Seq.ID.č.2.

Další způsob výroby promotoru zahrnuje izolaci promotoru z genové banky 2,3-butandiol tvořícího mikroorganismu. 2,3-Butandiol tvořící mikroorganismy jsou obecně známé a veřejnosti dostupné. Příklady jsou zástupci rodů *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* a *Klebsiella*. U těchto způsobů se alespoň "upstream"-regulátorový region bud-operonu, 5' před strukturním genem ležící DNK-oblast, která obsahuje funkci regulující expresi strukturního genu, izoluje z takového organismu o sobě známým způsobem. Současně izolované části, které neobsahují žádnou regulátorovou funkci, se popřípadě odstraní o sobě známými metodami (srov.příklad 14).

Výhodně se izoluje promotor, obsahující DNK-fragment bakterie rodu *Enterobacter* nebo *Klebsiella*, zvláště výhodně z genové banky *Klebsiella terrigena* (DMS2687).

Další podstatou vynálezu je expresní kazeta, která se vyznačuje tím, že je v ní spojen pro expresní systém vhodný promotor funkčně se strukturním genem exprimovaného, rekombinantního proteinu.

Ve výhodné formě provedení expresní kazety leží mezi promotorovým regionem a exprimovaným strukturním genem transkribovatelná ale netranslatovatelná oblast, která obsahuje ribosomové vazebné místo.

Expresní kazetu podle vynálezu je možno vyrobit například tak, že promotor se klonuje odborníkovi známým způsobem před 5'-konec exprimovaného strukturního genu.

Vynález se dále týká mikroorganismů, které obsahují expresní kazetu podle vynálezu.

Expresní kazeta může být přitom integrována v genomu mikroorganismu, může ale také být episomálně umístěna na alespoň jednom vektoru. Výhodně je expresní kazeta umístěna episomálně na alespoň jednom vektoru.

V první uvedené formě provedení se expresní kazeta podle vynálezu známými způsoby integruje do genomu hostitelského mikroorganismu.

Ve výhodné formě provedení uvedené jako druhé, je expresní kazeta přítomna v hostitelském organismu episomálně na vektoru, takzvaném expresním vektoru. Integrace expresní kazety podle vynálezu do vektoru se provádí obvyklými, odborníkovi známými metodami. Vhodné vektorové molekuly jsou odborníkovi známy. Příklad takového vektoru je odborníkovi známý vektor pJF118 (Fürste a spol.(1986), Gene, sv.48, 119-131) a jeho deriváty.

Vynález se rovněž týká způsobu výroby expresního systému podle vynálezu, který se vyznačuje tím, že se zavede do jakéhokoliv mikroorganismu popř. alespoň jeden gen pro regulátorový protein podle vynálezu a/nebo popřípadě alespoň jedna expresní kazeta podle vynálezu, tak že v příslušném mikroorganismu je potom přítomen alespoň jeden gen pro regulátorový protein podle vynálezu a jedna expresní kazeta podle vynálezu.

Vynález se také týká mikroorganismů, které obsahují expresní systém podle vynálezu.

Expresní systém podle vynálezu je možno například vyrobit tak, že se do jakéhokoliv mikroorganismu, který obsahuje alespoň jeden gen pro regulátorový protein podle vynálezu, zavede expresní kazeta podle vynálezu.

Výhodně se při tomto způsobu výroby expresního systému podle vynálezu používají takové mikroorganismy, které přirozeně obsahují gen pro regulátorový protein podle vynálezu.

Zvláště výhodně se při tomto způsobu používají mikroorganismy rodů *Enterobacter* nebo *Klebsiella*, které obsahují regulátorový protein podle vynálezu.

Zvláště výhodně se v tomto způsobu používá *Klebsiella terrigena* (DSM2687).

Dále se při tomto způsobu zvláště výhodně používají takové mikroorganismy jako hostitelské kmeny pro expresní kazetu podle vynálezu, do nichž byl gen pro regulátorový protein podle vynálezu zaveden pro odborníka známým způsobem. Zavedený gen, který koduje regulátorový protein podle vynálezu, se přitom může vyskytovat episomálně nebo být integrován do chromosomu hostitele.

Leží-li zavedený gen, který koduje regulátorový protein, episomálně, lokalizuje se výhodně na stejné vektorové molekule, která také nese expresní kazetu. Vedle toho je ale také možné uspořádání, kdy jsou zavedený gen pro regulátorový protein a expresní kazeta podle vynálezu na dvou různých, ale

komplementárních vektorových molekulách, jaké jsou odborníkovi známe, současně přítomny v jedné buňce hostitelského organismu.

V obecné formě provedení se použijí pro konstrukci expresního systému, při které se do hostitelského kmene zavádí přídavně gen, který koduje regulátorový protein, jako hostitelské kmeny gram-pozitivní nebo gram-negativní bakterie.

Výhodně se jako hostitelské kmeny pro takový expresní systém použijí bakterie čeledi Enterobacteriaceae, zvláště výhodně rodů *Escherichia* a *Salmonella*. Zvláště je výhodné použití *Escherichia coli* jako hostitelského kmene pro takový expresní systém.

Další podstatou vynálezu je použití Fnr-negativních mikroorganismů jako hostitelského kmene pro expresní systém podle vynálezu. Výhodně se používají přirozeně Fnr-negativní mikroorganismy. Zvláště výhodné je použití takových mikroorganismů jako hostitelských kmenů pro expresní systém podle vynálezu, ve kterých je fnr-gen inaktivován způsobem, který je odborníkům zřejmý. Příkladem takového zvláště vhodného mikroorganismu je *E. coli* RM101 (Sawers a Suppmann (1992), J. Bacteriol. sv. 174, str. 3473-3478) a všechny z něj odvozené deriváty.

Další podstatou vynálezu jsou fermentační způsoby pro produkci proteinů pomocí mikroorganismů, které se vyznačují tím, že používají mikroorganismy, které obsahují expresní systém podle vynálezu.

Má-li být dosaženo při fermentaci podle vynálezu maximálního indukčního účinku pěstuje se mikroorganismus, obsahující expresní systém podle vynálezu při hodnotách pH >

pH 7,0 za aerobních podmínek bez externího přídavku acetátu. V jakémkoliv časovém bodě je pak možné maximálně indukovat expresi genu pro rekombinantní protein, který je částí expresní kazety podle vynálezu, tak, že se parciální tlak kyslíku pO_2 upraví na hodnoty 0 až 5 %, pH-hodnota media se reguluje na pH 6,0 až 6,5 a acetát se nastaví na konečnou koncentraci 40 mM až 60 mM.

Vhodnou kombinací různých regulovaných hodnot těchto tří stimulů je navíc jednoduše možné odstupňovaně indukovat expresi fuzního genu v mezistupních postupně od velmi slabé až do velmi silné. Možnost přesně odstupňované indukce je obvykle velmi žádaná, protože je možno nastavit například hladinu exprese tak, že se vytvoří množství cílového proteinu, při kterém se ještě protein nevylučuje jako tzv. uzavřená tělíska.

Indukční podmínka, která vede k velmi slabé indukci, je například kombinace pH-hodnoty $> pH\ 6,5$, vnější přídavek acetátu (na 40 mM) a přítomnost kyslíku s parciálním tlakem pO_2 větším než 10 %.

Předností expresního systému podle vynálezu je, že také za přítomnosti kyslíku ($pO_2 > 5\%$) redukcí pH-hodnoty kultivačního media na pH 6,0 a přídavkem acetátu (40 až 60 mM) umožňuje silnou indukci exprese odpovídajícího fuzního genu.

Následující příklady dále osvětlují spolu s obrázky vynález.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1: Plasmidová mapa pBU1

obr. 2: plasmidová mapa pBTL142

- obr. 3: nukleotidová sekvence (Seq ID-č:3) a aminokyselinová sekvence (Seq ID-č: 4) budA'-lacZ'-přechodového místa na pBTL142 a pRBL2
- obr. 4: plasmidová mapa pBAK1
- obr. 5: plasmidová mapa pBAK14
- obr. 6: plasmidová mapa pBAK16
- obr. 7A: velikost a relativní orientace genu bud-regulonů v genomu *Klebsiella terrigena* (DSM2687)
- obr. 7B: na pBAK14 a pBAK16 obsažený DNK-fragment
- obr. 7C: poloha k PCR-amplifikaci *Klebsiella*-DNK použitého oligonukleotidu (srov. příklady 1 a 10)
- obr. 8: plasmidová mapa pRBL2
- obr. 9: konstrukce pBUD100 (srov. příklad 17)
- obr. 10: nukleotidová sekvence na přechodové oblasti bud-DNK--CGTase-strukturního genu před (pBUD100; Seq ID-č:5) a po (pBUD200; Seq ID-č: 6) řízené mutageneze

Obecně ke konstrukci plasmidů, použitých v příkladech a expresním studiím:

1. Všechny anaerobní kultivace byly provedeny podle Balcha a Wolfe (1976), Appl. Environ. Microbiol. sv.32, str.781-791 v serových lahvích. Aerobní kultivace byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách za silného třepání (baňky byly naplněny max. do 1/10 objemu). Kultury byly inkubovány při 37 °C.

2. Medium pro aerobní kultivaci: TGYEP (1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 0,4 % glukóza, 100mM K-fosfát, pH-hodnota s 0,1M pufrem fosfátu draselného nastavena na 6,0 až 8,0); medium pro aerobní kultivaci: TGYEP (pH nastaveno jak uvedeno výše); přídavek induktoru Na-acetátu na 40 mM z 1M zásobního roztoku.

K práci s k-fágy byla použita media podle Klecknera a spol. ((1978), Genetics sv.90, str. 427-450).

3. Antibiotika byla přidána v následujících koncentracích: ampicilin 100 µg/ml, chloramfenikol 30 µg/ml, kanamycin 50 µg/ml, tetracyklin 20 µg/ml popř. 15 µg/ml pro chromosomálně kodované rezistence.

4. Příprava chromosomální DNK se prováděla metodou podle Ausubela a spol. ((1987), Current protocols in molecular biology, sv.1, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York), příprava plasmidové DNK metodou podle Holmese a Quigley-e ((1981), Anal.Biochem.sv. 114, str.193 až 197).

5. Transformace použitých kmenů plasmidovou DNK se prováděly, pokud není uvedeno jinak, podle standardních postupů (Maniatis a spol. (1982), Molecular cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. str. 249-255).

6. Stanovení β -galaktosidázové aktivity se provádělo podle Millera (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., str. 352-355. Enzymové aktivity jsou udávány v Millerových jednotkách.

7. Výroba lac⁻-mutantu Klebsiella terrigena DSM2687 se prováděla neřízenou UV-mutagenézí podle Millera (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. str. 121-124. Ozařování se provádělo 80 sekund s intenzitou 318 µW/cm². Stabilita mutace byla testována na reverzi inkubací s nitrosoguanidinem (Miller(1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring

Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., str.125-129). Po kontrole pro *Klebsiella* typických reakcí látkové výměny byl pro další výzkum zvolen kmen KT14.

8. Interakce *budA-lacZ*-fuze v chromozomu *E.coli* se prováděly podle metody Simonse a spol. (1987), *Gene* sv.53, str.85-96. Jestliže se vycházelo z kmene *E.coli* MC4100 (F-, *araD*139, *D(argF-lac)*U169, *ptsF*25, *deoC*1, *relA*1, *flbB*501, *rpsL*150, l-) (Casadaban a Cohen (1979), *Proc.Nat.Acad Sci.USA*, sv.76, str. 4530-4533) byly získány následující transduktanty: BL142 a BL1. Jestliže se vyšlo z kmene *E.coli* RM101 (*fnr*-) (Sawers a Suppmann (1992) *J. of Bacteriology* 174, 11 str. 3474-3478) byl po transdukci získán kmen BL12.

9. Enzymatické in vitro-reakce na DNK byly, pokud není uvedeno jinak, provedeny podle Maniatis a spol. (1982), *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. str.98-148.

Výchozí vektory:

1. pUC19 (Yanisch-Perron a spol.(1985), *Gene* sv.33, str.103-119)
2. pBR322 (Bolivar a spol.(1977), *Gene* sv.2, str. 95-113)
3. pRS552 (Simons a spol.(1987), *Gene* sv. 53, str. 85-96)
4. pJF118HE (Fürste a spol. (1986), *Gene* sv.48, str. 119-131)
5. pCM100 (Binder a spol. (1986), *Gene* sv.47, str. 269-277)

Fágy:

kRS45 (Simons a spol. (1987), Gene sv. 53, str. 85-96)

10. Syntetické oligonukleotidy byly získány od firmy Toplab (Martinsried, Německo). Nukleotidové sekvence v příkladech použitých oligonukleotidů jsou shrnuty v tabulce 1:

Tabulka 1: Nukleotidové sekvence použitých oligonukleotidů

Seq ID-č:	označení	nukleotidová sekvence
7	Oligo1	5'-GGGGATCCTGGCAGGTGCATTCAGG-3'
8	Oligo2	5'-GGGGATCCATCGTGGGCGCCCGAG-3'
9	Oligo3	5'-GGGGATCCCGCCTAAACATCTCCAGAAACGC-3'
10	Oligo4	5'-CGGAATTCCG-3'
11	Oligo5	5'-TCTAGAAGCTTCGGACCAACCGCGGCAACGTCCTATACCTGC-3'
12	Oligo6	5'-TCTAGAAGCTTCATGGTCCACTTCCTCGTTCACAA-3'
13	Oligo7	5'-TCTAGAAGCTTCATGGAAAGAAACCGTTTTTTAAATACC-3'
14	Oligo8	5'-TCTAGAAGCTTGAAATCTTAAACGAGCCATTTCGTTGTTG-3'
15	Oligo9	5'-GAACGAGCGGTGATATGAAAAGAAACCGTTT-3'

11. Enzymy pro restrikci, modifikaci a sekvenční analýzu DNK byly získány od Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Pharmacia (Freiburg), New England Biolabs (Schwalbach) a Perkin Elmer Cetus (Langen).

Radioaktivní substance byly od Amersham Buchler (Braunschweig) nebo NEN Du Pont (Dreieich).

Jemné chemikálie byly získány od firem Merck (Darmstadt), Sigma (Mnichov), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm) a Biomol (Mnichov).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Translační kopulace budA-promotor-fragmentu s lacZ-genem

Za pomoci oligonukleotidů oligo1 a oligo2 (tabulka 1), jejichž nukleotidová sekvence byla odvozena z Blomquistem a spol. (J.Bact.(1993) sv.175(5), str. 1392-1404) zveřejněné sekvence bud-operonu z Klebsiella terrigena, byl 223 bp velký fragment z chromozomální DNK z Klebsiella terrigena (DSM2687) amplifikován symetrickou PCR (tepelné opracování: 30 s při 58 °C; prodlužování řetězce: 60 s při 72 °C; dělení řetězce: 30 s při 94 °C; 25 cyklů). Získaný fragment se rozkládá přes polohy 247 až 456 nukleotidové sekvence Seq ID-č:2 a obsahuje sekvenční informaci pro 10 N-terminální aminokyselinové zbytky BudA (srov. obr.7A), jakož i 178 proti směru od budA-startkodonu ležících nukleotidů, které obsahují funkčně aktivní promotor bud-operonu.

Za použití BamHI-restrikčních rozpoznávacích míst

zavedených PCR startnukleotidy oligo1 a oligo2, se po štěpení PCR produktu pomocí BamHI izoluje 219 bp velký DNK fragment a klonuje do vektoru pUC19 štěpeného pomocí BamHI. Správná nukleotidová sekvence jakož i orientace inzertu byly ověřeny dvojřetězcovou sekvenční analýzou (Sanger a spol. (1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74(12), str.5463-5467). Vzniklý konstrukt byl nazván pBU1 (obr.1).

Pro kombinaci bud-promotoru na pBU1 s lacZ-genem jako reporterovým genem pro promotorovou aktivitu se překlenuje BamHI-fragment z pBU1 do BamHI-místa štěpení protomortest-vektoru pRS552. Získaný konstrukt, plasmid pBTL142 (obr.2), koduje fuzní protein, sestávající z 10 N-terminálních aminokyselinových zbytků BudA a na ně přes linker ze 2 aminokyselinových zbytků napojený LacZ od 9.aminokyselinového zbytku (obr.3, Seq-ID č: 3 a 4), jehož transkripce může být regulována jen regulačním elementem obsaženým ve 158 bp před budA.

Příklad 2

Exprese β -galaktosidázového proteinu bud-promotorovým fragmentem na pBTL142 v *Klebsiella terrigena* KT14

Pro funkční výzkum bud-promotoru na pBTL142 v *Klebsiella terrigena* (homologní systém) se *Klebsiella terrigena* KT14 (lacZ-) elektroporací (Fiedler a Wirth (1988) Analytical Biochemistry 170, str. 38-44) transformuje s pBTL142. Pro studie exprese se takto získaný transformant (*Klebsiella terrigena* KT14/pBTL142) za podmínek uvedených v tabulce 2. Takto vytvořené β -galaktosidázové aktivity (tabulka 2), které byly stanoveny podle Millera z buněčného lyzátu, jsou přímým měřítkem pro aktivitu bud-promotoru za příslušných podmínek.

Tabulka 2

Expres budA'-lacZ' v *Klebsiella terrigena* KT14/pBTL142

pH	+O ₂	+O ₂ + acetát	-O ₂	-O ₂ + acetát
6,0	668	5688	2300	11515
6,5	800	2272	1057	4326
7,0	833	1280	760	1533
7,5	884	1123	784	754
8,0	875	1003	741	743

Příklad 3

Expres β -galaktosidáza-proteinu v *Klebsiella terrigena* KT14/pBTL142 při fermentaci za indukujících a neindukujících podmínek

Typ fermentoru: Biostat ED (B.Braun Biotech, Melsungen, Německo).

Objem plnění: 7 l

Medium: KH₂PO₄: 1,5 g/l; (NH₄)₂SO₄: 5,0 g/l; NaCl 0,5 g/l; FeSO₄ x 2H₂O: 0,075 g/l; Na₃citrát x 2 H₂: 1,0 g/l; trypton (Oxoid): 5 g/l; kvasnicový extrakt (Oxoid): 2,5 g/l; glukóza: 12 g/l; kanamycin: 50 mg/l

pH media: konstantně 6,0 (úprava pomocí 6N NH₄OH, popř. 4N H₃PO₄)

teplota: 30 °C

Provzdušňování: Kultivace se během celého průběhu fermentace konstantně provzdušňuje 4 l vzduchu za minutu. Až po dosažení

optické hustoty $OD_{600} = 20$ se udržuje konstantní parciální tlak kyslíku $pO_2 = 40 \%$ mícháním rychlostí mezi 450 a 900 ot/min. Při dosažení $OD_{600} = 20$ se během hodiny pO_2 snížením rychlosti míchání nastaví na $pO_2 = 0 \%$ a udržuje po 48 hodin.

Indukce: Při dosažení $pO_2 = 0 \%$ se přidává při indukované fermentace 40 mM acetátu.

β -Galaktosidázová aktivita se stanoví 24 h a 48 h po indukci.

Tabulka 3:

Expres *budA'*-*lacZ'* v *Klebsiella terrigena* KT14/pBTL142

	β -galaktosidázová aktivita (Millerovy jedn.)	
	24 h	48 h
bez indukce	460	700
s indukcí	10820	15325

Příklad 4

Expres β -galaktosidáza-proteinu *budA*-promotorfragmentem na pBTL142 v *E.coli* FM420

Po transformaci *E.coli* FM420 pomocí pBTL142 byly při následujících studiích exprese nalezeny hodnoty uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4

Expres budA'-lacZ' v E.coli FM420/pBTL142

pH	+O ₂	-O ₂	-O ₂ + acetát
6,0	424	408	737
7,0	613	466	722
8,0	655	607	794

V heterologním systému není zjistitelná žádná významná indukce bud-promotoru. E.coli neobsahuje pro plnou expresi a regulaci potřebné transkripční faktory, tj. na pBTL142 přítomné, cis-působící faktory nejsou samy dostačující, aby zprostředkovaly v *Klebsiella terrigena* (př.2) pozorované expresní poměry v E.coli.

Příklad 5

Integrace budA'-lacZ-translační fuze na plasmidu pBTL142 do genomu E.coli MC4100

Integrace budA'-lacZ-fuze do chromosomu se provede metodou podle Simonse a spol. ((1987), Gene sv.53, str.85 až 96). Transformací pBTL142 v E.coli MC4100 a potom infekcí s kRS45 se integruje translační fuze do chromosomu E.coli MC4100. Úspěšná integrace se přezkouší pomocí transdukované kanamycinové rezistence. Po UV-ozařování získané lyzáty kBTL142 (přečištěná fágová linie) se použijí k obnovené transdukci E.coli MC4100 a takto konstruovaný kmen se označí jako E.coli BL142.

Příklad 6

Expres budA'-lacZ'-proteinu chromosomálně integrovaným genem v E.coli BL142

Všechny kultivace byly provedeny při pH 6,5.

Tabulka 5

Exprese *budA'*-*lacZ'* v *E.coli* BL142

Růstové podmínky	β -galaktosidázová aktivita
+O ₂	35
-O ₂	40
-O ₂ + acetát	70

Za uvedených růstových podmínek je malá základní exprese; ale není zjistitelná žádná významná indukce anaerobiosou a přidavkem acetátu.

Příklad 7

Klonování genu z *Klebsiella terrigena*, kodujícího protein, aktivující *budA*-promotor v *E.coli*

Izoluje se chromosomální DNK z *Klebsiella terrigena* DSM 2687 a částečně se štěpí pomocí *Sau3A* (0,02 jednotek/ μ g DNK, 20 min při 37 °C). Fragmenty mezi 3 a 10 kb se izolují po elektroforetickém oddělení a ligují s *Bam*HI linearizovaným vektorem pBR322. Plasmidový pool získaný po transformaci *E.coli* JM109 a následující preparaci se použije jako genová banka pro *Klebsiella terrigena*.

Pro identifikaci plasmidů, které kodují *bud*-promotor aktivovaný za přítomnosti acetátu v trans-působícím faktoru, se *E.coli* BL142 transformuje pomocí elektroporace s genovou bankou z *Klebsiella terrigena* (Fiedler a Wirth (1988) Analytical Biochemistry 170, str. 38-40). Transformační vsázky

nanesou na takzvané indikátorové plotny (fosforečnanem draselným pufrovaný TGYEP-agar (pH 6,5) s 0,4 % glukózy, 40 mM acetátu, 1 mM X-Gal a ampicilin (100 µg/ml)) a inkubují se při 37 °C. *E.coli* BL142 vytvoří na těchto indikátorových plotnách vzhledem ke své velmi slabé β -galaktosidázové aktivitě (tab.5) světlemodré kolonie. Klon naopak vytváří po transformaci tmavomodré kolonie. Obsahuje plasmid pBAK1 (obr.4), který nese přibližně 1,8 kb velký Sau3A-fragment z *Klebsiella terrigena*. Pro další analýzy byly izolovány 1,8 kb velký HindIII-fragment z pBAK1 (srov.obr.4), který obsahuje 350 bp velký fragment vektoru pBR322 a 1,45 kb velký fragment z *Klebsiella terrigena*; přesahující konce fragmentů byly vyplněny Klenow-polymerásou. Potom se fragment v obou orientacích liguje do SmaI linearizovaného plasmidu pUC19. Takto vzniklé plasmidy, které na indikátorových plotnách rovněž způsobují modré zabarvení kolonií *E.coli* BL142 byly označeny jako pBAK14 a pBAK16 (obr. 5 a 6).

Příklad 8

Sekvenční analýza genu pro regulátorový protein, aktivující budA-promotor na pBAK14 a pBAK16

K sekvenční analýze inzertu na pBAK14 a pBAK16 podle Sangera a spol. ((1977), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, sv.74, str. 5463-5467) se inzerty vždy zkrátí pomocí exonukleázy III. Jako vektorová ochrana slouží restrikce pomocí SacI, napadení exonukleásou probíhá na Asp718-místě štěpení vícenásobného klonovacího místa v pUC19 (Henikoff (1984), Gene sv.28, str. 351-359). Sekvenční reakce s T7-DNA polymerásou (Pharmacia, Freiburg) se provedou paralelně s dGTP a dITP, aby se potlačila silná komprese. Použije se pro pUC-vektory specifický, obchodně dostupný univerzální sekvenční startoligonukleotid. Pro DNK-inzert z *Klebsiella terrigena* na

pBAK14 a pBAK16 byla stanovena následující nukleotidová
sekvence (Seq ID-č:2):

```
1  GGATCCGCCCCGGGCTTTACGCGCGCTGCCGTCAGCGCGCAGCTGGTAGAC
51  CTCGCTGCTAAAGGCAATCAGTTCGCCATCGAGTTCGTTAAAGGTGCCGA
101 GACCGAAGTCGCCGTGGGTCAGCAGGTCGGCGATGGTGGTGCTACCCCTCA
151 TAGACCCCGCTCAGCAGCGCGCTCATCAGAGAGGTCTGATAGATAACGCT
201 ATCAGGGTGGTGGGCGGAGAAGCCGCGTACGGTTTCGCACAGGCTCTCCT
251 GGCAGGTGCATTCAGGATAATGATTCACAATCCACTTCCTCGTTCAACAA
301 ATATAAGAAAGATTAAATAAATATTGACCCGATTCAGCTCTCAGTTCCAA
351 TATAGAATCCATGCTGGTTTGAGACGTTTACGATATGGAAGTTCGCTATT
401 TACGTTATTTTGTGCGCGTTGCCGAGGCGCGGAAGTTCACCCGGGCGGCC
451 CACGATCTTGGCATTCTCAACCGCCACTAAGTCAGCAAATTCAGCGACT
501 TGAGCGAGAAATAGGGACTCCGCTGCTGCGTCGTTTGACGCGGGGGGTTG
551 AGCTGACGGAGGCCGGAGAGTCGTTCTACGTCGACGCGTGTGAGATCCTC
601 GCCTTAAGCGATGCGGCGCTGGAAAAACCAAGGGGATTGCGCGGGGCAT
651 GAACGGTAGCCTGGTGCCGGGGATCACCAGTTCAGCTGCTTTTCATTTCGC
```

701 AGATTTTCTCTTTGCTGTACCAGTTTCAGCAGCGCTATCCGGCGGTGGCT
751 CTGCGCCAGGTCGAAGGCAATATGGCGACGCTGATGCATGCCCTGGGCGA
801 GGCGGAGCTGGATATCGCCTTTGTGCGCCTGCCGTGTGAAAGCAGCAAGG
851 CGTTTAATTTGCGCATTATTGCCGAGGAGCCGATGGTTATCGCGCTGCAT
901 CGCTCGCACCCGCTCTCCGGGGAAAGTGCGCTCTCTCTGGCGCAGCTGAG
951 CGACGCGGTGCCGGTTATTTTCCCGCCGGAGGTGGCGCCGGGCCTCTACG
1001 AGCAGGTTTATGATGGCTGTGCGCGTGCCGGGGTCGATATGAGCCGCGCC
1051 AGGCAATCTTCACAGATCTCGTCTTCTATTAGCATGGTGGACGCGGGCTT
1101 CGGCTTTGCGCTGGTGCCTCAGTCGATGACCTGTATCTGCCTTCCCAACG
1151 TCACATGGCATCCCTTGCAGGACGCGTCGCTGAAGACGGAGATCGCCATC
1201 GCGTGGCGGCGTTTTTGAACGTTGCGGACGGTAAAGCGTTTTCTGGAGAT
1251 GTTTTAGGCGGGGCGCAGGGCTAGCAGGTATAGACGTTTGCCGCGGTTGG
1301 CCCGCGCAGGCCGTTAACCCGACGAACTCAACGGAATACCGGGCGTCAT
1351 CGCCGTGGACTCGTTGGGGGATAATGCGGAAATATGAACCTGAACGTCTT
1401 TACGACCGTCGGAAGGGACGATAAGGCCTCTGCCGGTTTTATTATCAAAG
1451 CT

Ze stanovené nukleotidové sekvence (Seq ID-č:2) mohl být odvozen otevřený čtecí rámec (nukleotid 385 až 1254), který koduje protein (Seq ID-č: 1), sestávající ze 290 aminokyselin. Aminokyselinové sekvence odvozené z tohoto otevřeného čtecího rámce jsou následující:

```

1  MELRYLRYFV AVAEARNFTR AAHDLGISQP PLSQQIQRL EIGTPLLRR

51  LTRGVELTEA GESFYVDACQ ILALSDAALE KTKGIARGMN GSLVPGITSS

101 AAFHSQIFSL LYQFQORYPA VALRQVEGNM ATLMHALGEA ELDIAFVRLP

151 CESSKAFNLR IIAEPMVIA LHRSHPLSGE SALSQAQLSD AVPVIFPPEV

201 APGLYEQVYD GCRRAGVDMS RARQSSQISS SISMVDAGFG FALVPQSMTC

251 ICLPNVTWHP LQDASLKTEI AIAWRRFERS RTVKRFLEMF *
```

Na základě své aktivity bud-promotor regulující aktivity se tento protein označí jako BudR (Bud-regulátor). Směr transkripce budR je protisměru k bud-operonu, ovšem nachází se

mezi bud-operonem a budR jen jeden intergenový region o toliko 106 bp (nukleotid 279 až 384 v Seq ID-č:2). bud-Operon a budR tak tvoří divergentně orientovaný regulon pro syntézu enzymu (obr.7), který se podílí na tvorbě 2,3-butandiolu.

Příklad 9

Expresa β -galaktosidázového proteinu chromosomálně probíhající budA'- lacZ -translatační fuzí v E.coli BL142/pBAK1

Indukovatelnost chromosomálně kodované budA'- lacZ -fuze plasmidy genové banky, které vyvolávají lac+ fenotyp (modré zbarvení), je demonstrována následujícím příkladem. Všechny kultivace se provádějí při pH 6,5.

Tabulka 6

Expresa budA'- lacZ - v E.coli BL142/pBAK1

Podmínky růstu	β -galaktosidázová aktivita
+O ₂	1832
-O ₂	1147
-O ₂ + acetát	5802

Příklad 10

Konstrukce budA'- lacZ -fuze spolu s plnou sekvencí budR a intergenovým regionem mezi budR a budA

Za pomoci oligonukleotidů Oligo1 a Oligo3 (tab.1) se pomocí PCR z pBAK16 (pUC19-derivát) amplifikuje 1027 bp velký fragment (obr.7). Za použití pomoci PCR-startnukleotid oligo1

a oligo3 zavedených BamHI-restrikčních míst se po štěpení PCR-produktu pomocí BamHI izoluje 1023 bp velký DNK-fragment a klonuje se do Vektoru pRS552 štěpeného pomocí BamHI. Správná orientace inzertu byla přezkoušena pomocí sekvenční analýzy podle Sangera a spol. ((1977), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, sv.74, str.5463-5467). Vzniklý konstrukt byl nazván pRBL2 (obr.8).

Plasmid pRBL2 obsahuje plný gen pro BudR, kompletní intergenový region mezi budR a budA jakož i gen, kodující fuzní protein, sestávající z 10 N-terminálních AK-zbytků BudA a na nich přes linker ze 2 aminokyselinových zbytků připojený LacZ od 9.aminokyselinového zbytku, který je také obsažen na pBTL142 (obr.3).

Příklad 11

Integrace budR do genomu E.coli MC4100

Integrace budA'-`lacZ-fuze s přidavnou sekvencí budR na plasmidu pBRL2 do chromosomu E.coli MC4100 se provádí metodou podle Simonse a spol.(1987), Gene, sv.53, str.85-96. Transformací pRBL2 do E.coli MC4100 a potom infekcí s lambdaRS45 E.coli MC4100(pRBL2 se fuze integruje do chromosomu E.coli MC4100. Úspěšná integrace byla přezkoušena na základě kanamycinem transdukované rezistence. Po UV-ozařování získaný lyzát RBL2 (přečištěné fágové linie) se použijí k obnovené transdukci E.coli MC4100 a takto konstruovaný kmen byl nazván E.coli BL2.

Příklad 12

Expresse β -galaktosidáza-proteinu chromosomálně přítomnou budA'-`lacZ-fuzí v E.coli BL2

Regulace dosažená expresse budA'-`lacZ-fuzního genu

v chromosomu E.coli jednoduchou kopií budR je uvedena v tabulce 7. Všechny kultivace byly prováděny v TGYEP-mediu při pH 6,5.

Tabulka 7

Expres budA'-lacZ v E.coli BL2

Podmínky růstu	β -galaktosidázová aktivita
-O ₂	99
-O ₂ + acetát	1130

Příklad 13

Expres β -galaktosidázového proteinu v E.coli BL2/pBTL142

Indukce plasmidově kodovaného budA'-lacZ-fuzního genu chromosomálně kodovaným BudR je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8

Expres budA'-lacZ- v E.coli BL2/pBTL142

pH	+O ₂	+O ₂ + acetát	-O ₂	-O ₂ + acetát
6,0	1435	10114	1520	14413
6,5	1410	6907	928	5381
7,0	1403	2257	980	1968
7,5	1281	1440	960	1339
8,0	1265	1665	1135	1243

Příklad 14

Postupná delece 5'-oblasti budA-promotorového regionu na plasmidu pBTL142

Pro stanovení minimální nukleotidové oblasti bud-promotoru, která ještě vykazuje budR aktivovatelnou promotorovou aktivitu, se zkracuje na plasmidu pBTL142 přítomný promotor postupně ze své 5'-strany. Proto se linearizuje pBU1 restrikcí s EcoRI na 5'-konci inzertu a inkubuje se s Bal31-exonukleásou (Boehringer Mannheim) při 30 °C (0,3 jednotky/μg DNK) (Schaffner a spol., 1976). 5'-přesahující DNK-konce se vyplní Klenow-fragmentem DNA-polymerázy I a opatří EcoRI-linkery (Oligo4 (tab.1)). Po restrikci s EcoRI a BamHI se fragmenty elektroforeticky rozdělí, fragmenty vhodné délky se eluují a zavedou do vektoru pRS552 předem zpracovaného s EcoRI a BamHI. 5'-konce inzertů v delečních konstruktech se stanoví sekvenční analýzou. Zvolené klony (pBTL6 až pBTL124) jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9:

Velikost bud-promotor- podílu na plasmidech pBT6 až pBTL142

Plasmid	velikost promotoro- vého podílu (bp)	(bp)od polohy 315 do polohy xxx v Seq ID-č:10
pBTL6	6	320
pBTL22	22	336
pBTL34	34	348
pBTL51	51	365
pBTL	64	378
pBTL	83	397
pBTL103	103	407
pBTL124	124	438
pBTL142	142	456

Příklad 15

Expresse β -galaktosidáza-proteinu zkrácenými
budA-promotorfragmenty na plasmidech pBTL6 až pBTL142

Expresní studie byly provedeny se zkrácenými klony v
Klebsiella terrigena KT14 jako hostitelským kmenem. Všechny
kultivace byly provedeny při pH 6,5:

Plasmid	+O ₂	+O ₂ + acetát	-O ₂	-O ₂ + acetát
pBTL6	30	49	18	30
pBTL22	52	136	41	120
pBTL34	34	70	24	84
pBTL51	264	645	205	523
pBTL64	252	677	214	624
pBTL83	398	2575	967	5563
pBTL103	211	1675	752	4703
pBTL124	238	1849	828	4444
pBTL142	449	2040	767	3145

Příklad 16

Exprese β -galaktosidáza-proteinu v *E.coli* BL12 a *E.coli* BL12/pUFR1

Pro stanovení vlivu *E.coli* vlastního induktoru anaerobní látkové výměny, Fnr, na BudR-závislou aktivaci bud-promotoru, se budR jakož i budA'-lacZ'-translační fuze na plasmidu pRBL2 (obr.8) integruje přes transdukcii s lambdaRS45 analogicky příkladu 11 do chromosomu fnr-negativní *E.coli* RM101. Takto získaný kmen se označí jako *E.coli* BL12. Pro stanovení možných Fnr-efektů se *E.coli* BL12 navíc transformuje funkční fnr-gen nesoucím plasmidem pUFR1 (Sawers a Suppmann (1992) J.of

Bacteriology 174, 11 str. 3474-3478).

Tabulka 11

Exprese budA'-lacZ' v E.coli BL12 a BL12/pUFR1

Kmen/plasmid	růstové podmínky	β -galaktosidázová aktivita
BL12	-O ₂	371
BL12	-O ₂ + acetát	3700
BL12/pUFR1	-O ₂	115
BL12/pUFR1	-O ₂ + acetát	509

Příklad 17

Funkční kopulace bud-regulátor-systému s alfa-CGTasovým
strukturním genem

Pro konstrukci CGTasového expresního plasmidu pBUD200
byly použity oligonukleotidy Oligo5 až Oligo9 uvedené v
tabulce 1.

A) Konstrukce pBUD100

Úplný budR-gen a budA-promotor obsahující DNK-fragment
(nukleotidy 281 až 1300 v SEQ ID-č:2) se za pomoci
oligonukleotidů Oligo5 a Oligo6 (tab.1) za použití plasmidu
pBAK16 jako předloh-DNK amplifikuje a štěpí restrikcními
endonukleázami NruI a NcoI.

Pro amplifikaci strukturního genu alfa-CGTasy z

Klebsiella oxytoca M5aI se použijí oligonukleotidy Oligo7 a Oligo8 (tab.1) jako startoligonukleotidy, jakož i plasmid pCM100 (Binder a spol. (1986), Gene, sv. 47, str.269-277) jako předloha DNK. Amplifikovaný DNK-fragment se štěpí restričními endonukleázami NcoI a EcoRI.

Oba PCR-fragментy se společně ligují do pomoci NruI a EcoRI štěpeného vektoru pJF118HE (obr.9). Takto vzniklý plasmid se označí jako pBUD100.

B) Konstrukce pBUD200 řízenou mutagenezí

Pro umožnění účinné translace alfa-CGTasového genu na pBUD100 se tři bodové mutace, které byly vyrobeny při konstrukci pBUD100 revertují, aby mohly být spojeny přes NcoI-rozpoznávací místo budA-promotoru a alfa-CGTasový strukturní gen (obr.10).

Řízenou mutagenezí podle Denga a Nickoloffa (1992), Anal.Biochem.sv.200, str.81 ff se za použití oligo9 (tab.1) jako mutagenizovaného oligo upraví DNK-sekvence v oblasti přechodu podle originální sekvence budA popř. alfa-CGTasy. Polohy mutagenizovaných bází jsou zřejmé z obr. 10 (Seq ID-č:5 a 6). Mutagenizovaný plasmid byl označen jako pBUD200.

Příklad 18

Enzymový test pro stanovení alfa-CGTasové aktivity

Stanovení aktivity CGTasy se provádí podle Candussi a spol. v Eur.J.Biochem. (1990) 191, str.177-185 popsané metody.

Vždy 2 jednotky na gram škrobu testované CGTasy se inkubují s 5% (hmotn./obj.) roztokem rozpustného škrobu

(Merck, Darmstadt) v pufru sestávajícím ze 20 mM Tris/HCl pH 7,2 a 5 mM CaCl_2 po definovanou dobu při 45 °C. Potom se reakce ukončí přidavkem 1,5 objemových dílů methanolu. Nezreagovaný zbytkový škrob se vyloučí jednohodinovou inkubací při 4 °C a odstředováním (10 min, 12000 x g). Vzniklé produkty se stanoví pomocí HPLC na Nucleosil 10-NH₂-koloně (Macherey a Nagel, Düren), přičemž jako definované cyclodextriny (Wacker-Chemie, Mnichov) slouží jako standard.

Příklad 19

Expresí alfa-CGTasy bud-regulátor/promotor-systémem na plasmidu pBUD200 v E.coli WCM105

Pro kyslíkem, pH-hodnotou a/nebo acetátem regulovatelnou produkci alfa-CGTasy se v příkladu 16 popsáný expresní plasmid pBUD200 transformuje do E.coli sekrečního kmene. Jako E.coli sekreční kmen se použije E.coli WCM105. Tento kmen se vyrobí z E.coli DS410 jak je popsáno v EP 338410.

Pro prokázání regulovatelné alfa-CGTasové produkce se pěstuje E.coli WCM105/pBUD200 při 37 °C v pufru z fosforečnanu draselného pufovaném plném mediu (TGYEP s pH 6,5 popř. pH 8,0; Begg a spol.(1977), FEMS Microbiol.Lett.sv.2, str.47-50) za přidavku 0,4 % glukózy (hmotn./obj.) a popř. 40 mM octanu sodného. Anaerobní kultivace se provádí v serových lahvích technikou podle Balche a Wolfa (1976). Při OD₆₀₀ mezi 0,8 a 1,0 se buňky oddělí odstředováním při 5000 x g. Buněk prostý kultivační supernatant se použije, jak je popsáno v příkladu 15, pro stanovení v něm obsažené alfa-CGTasové aktivity. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12

alfa-CGTasová aktivita v supernatantu E.coli WCM105/pBUD200
 (U stanovených hodnot se vždy jedná o průměrnou hodnotu ze
 dvou paralelních pokusných kultivací)

pO ₂	pH	acetát(mM)	CGTasová-aktivita (mj/10 ⁻¹ .ml ⁻¹)
aerob	6,5	0	2,5
anaerob	6,5	0	30,0
anaerob	6,5	40	64,0
aerob	8,0	0	< 1,0
anaerob	8,0	0	24,0
anaerob	8,0	40	46,5

- I -

Sekvenční protokol

(1) Obecné údaje:

(i) Přihlašovatel:

- (A) Jméno: Consortium für elektrochemische
industrie GmbH
- (B) Ulice: Zielstattstr.20
- (C) Místo: Mnichov
- (D) Spolková země: Bavorsko
- (E) Země: Německo
- (F) Směr.pošt.číslo: 81379
- (G) Telefon: 089/74844-0
- (H) Telefax: 089/74844-350
- (I) Telex: 5215553 cons d

(ii) Název vynálezu: Regulovatelný expresní systém

(iii) Počet sekvencí: 15

(iv) Počítačově čitelná forma:

- (A) Nosič dat: floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Pracovní systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatntIn Release #1,0,verze #1,30(EPA)

(2) Údaje o SEQ ID-č:1:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 290 aminokyselin
- (B) Typ: aminokyselina
- (C) Forma řetězce:
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: protein

(vi) původní zdroj:

- (A) Organismus: KLebsiella terrigena
- (B) Kmen: DSM2867

(xi) Popis sekvence: SEQ ID-č:1:

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

- III -

Leu Ser Gly Glu Ser Ala Leu Ser Leu Ala Gln Leu Ser Asp Ala Val
130 135 190

Pro Val Ile Phe Pro Pro Glu Val Ala Pro Gly Leu Tyr Glu Gln Val
195 200 205

Tyr Asp Gly Cys Arg Arg Ala Gly Val Asp Met Ser Arg Ala Arg Gln
210 215 220

Ser Ser Gln Ile Ser Ser Ser Ile Ser Met Val Asp Ala Gly Phe Gly
225 230 235 240

Phe Ala Leu Val Pro Gln Ser Met Thr Cys Ile Cys Leu Pro Asn Val
245 250 255

Thr Trp His Pro Leu Gln Asp Ala Ser Leu Lys Thr Glu Ile Ala Ile
260 265 270

Ala Trp Arg Arg Phe Glu Arg Ser Arg Thr Val Lys Arg Phe Leu Glu
275 280 285

Met Phe
290

(2) Údaje o SEQ ID-č:2:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 1453 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: dvojité
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: genom-DNK

(vi) původní zdroj:

- (A) Organismus: *Klebsiella terrigena*
- (B) Kmen: DSM2867

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) Klon(y): pBAK14/16

(viii):poloha v genomu:

(C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-8:2:

GGATCCGCCC GGGCTTTACG CGCGCTGCCG TCAGCGCCCA GCTGGTAGAC CTCGCTGCTA	60
AAGGCAATCA GTTCGCCATC GAGTTCGTTA AAGGTGCCGA GACCGAAGTC GCCGTGGGTC	120
AGCAGGTCGG CGATGGTGGT GCTACCCTCA TAGACCCCGC TCAGCAGCGC GCTCATCAGA	180
GAGGTCTGAT AGATAACGCT ATCAGGGTGG TGGGCGGAGA AGCCGCGTAC GGTTCGCGAC	240
AGGCTCTCCT GGCAGGTGCA TTCAGGATAA TGATTCACAA TCCACTTCCT CGTTCAACAA	300
ATATAAGAAA GATTAAATAA ATATTGACCC GATTTCAGCTC TCAGTTCCAA TATAGAATCC	360
ATGCTGGTTT GAGACGTTTA CGATATGGAA CTTGCTATT TACGTTATTT TGTCGCCGTT	420
GCCGAGGCGC GGAACCTCAC CCGGGCGGCC CACGATCTTG GCATTTCTCA ACCGCCACTA	480
AGTCAGCAAA TTCAGCGACT TGAGCGAGAA ATAGGGACTC CGCTGCTGCG TCGTTTGACG	540
CGGGGGGTTG AGCTGACGGA GGCCGGAGAG TCGTTCTACG TCGACGCGTG TCAGATCCTC	600
GCCTTAAGCG ATGCGGCGCT GGAAAAAACC AAGGGGATTG CGCGGGGCAT GAACGGTAGC	660
CTGGTGCCCG GGATCACCAG TTCAGCTGCT TTTCATTGCG AGATTTTCTC TTTGCTGTAC	720
CAGTTTCAGC AGCGCTATCC GGCGGTGGCT CTGCGCCAGG TCGAAGGCAA TATGGCGACG	780
CTGATGCATG CCCTGGGCGA GCGGAGCTG GATATCGCCT TTGTGCGCCT GCCGTGTGAA	840
AGCAGCAAGG CGTTTAATTT GCGCATTATT GCCGAGGAGC CGATGGTTAT CGCGCTGCAT	900

CGCTCGCACC CGCTCTCCGG GGAAAGTGCG CTCTCTCTGG CCGAGCTGAG CGACGCGGTG	960
CCGGTTATTT TCCGCGCGGA GGTGGCCCGG GGCCTCTACG AGCAGGTTTA TGATGGCTGT	1020
CGGCGTGCCG GGGTCGATAT GAGCCGCGCC AGGCAATCTT CACAGATCTC GTCTTCTATT	1080
AGCATGGTGG ACGCGGGCTT CGGCTTTGCG CTGGTGCCTC AGTCGATGAC CTGTATCTGC	1140
CTTCCCAACG TCACATGGCA TCCCTTGCGG GACGCGTCGC TGAAGACGGA GATCGCCATC	1200
GCGTGGCGGC GTTTTGAACG TTCGCGGACG GTAAAGCGTT TTCTGGAGAT GTTTTAGGCG	1260
GGGCGCAGGG CTAGCAGGTA TAGACGTTTG CCGCGGTTGG CCCGCGCAGG CCGTTAACCC	1320
GACGAAACTC AACGGAATAC CGGGCGTCAT CGCCGTGGAC TCGTTGGGGG ATAATGCGGA	1380
AATATGAACC TGAACGTCTT TACGACCGTC GGAAGGGACG ATAAGGCCTC TGCCGGTTTT	1440
ATTATCAAAG CTT	1453

(2) Údaje o SEQ ID-č:3:

(i) Údaje o sekvenci:

(A) Délka: 39 párů bází

(B) Typ: nukleotid

(C) Forma řetězce: dvojity

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: genom-DNK

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) Klon(y): pBAK142 a pRBL2

(viii):poloha v genomu:

(C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:3
TATCCTGAAT GCACCTGCCA GGATCCCGTC GTATTACAA

39

(2) Údaje o SEQ ID-č:4:

(i) Údaje o sekvenci:

(A) Délka: 13 aminokyselin

(B) Typ: aminokyselina

(C) Forma řetězce:

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: peptid

(v) Typ fragmentu: vnitřní fragment

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) Klon(y): pBAK142 a pRBL2

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:4

Tyr	Pro	Glu	Cys	Thr	Cys	Gln	Asp	Pro	Val	Val	Leu	Gln
1				5							10	

(2) Údaje o SEQ ID-č:5:

(i) Údaje o sekvenci:

(A) Délka: 29 párů bází

(B) Typ: nukleotid

(C) Forma řetězce: dvojitý

(D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: genom-DNK

(vii) bezprostřední zdroj:

(B) Klon(y): pBUD100

(viii):poloha v genomu:

(C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:5:

CGAGGAAGTG GACCATGGAA AGAAACCGT

29

(2) Údaje o SEQ ID-č:6:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 29 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: dvojitý
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: genom-DNK

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): pBUD200

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:6:

CGAGGAAGTG GATTATGAAA AGAAACCGT

29

(2) Údaje o SEQ ID-č:7:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 25 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligol

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:7:

GGGGATCCTG GCAGGTGCAT TCAGG

25

(2) Údaje o SEQ ID-č:8:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 25 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo2

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:8:

GGGGATCCAT CGTGGGCCCG CCGAG

25

(2) Údaje o SEQ ID-č:9:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 33 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo3

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:9:

GGGGATCCCG CCTAAAACAT CTCCAGAAAA CGC

33

(2) Údaje o SEQ ID-č:10:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 10 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo4

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:10:

CGGAATTCCG

(2) Údaje o SEQ ID-č:11:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 43 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo5

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:11:

TCTAGAAGCT TCGCGACCAA CCGCGGCAAA CGTCTATACC TGC

(2) Údaje o SEQ ID-č:12:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 37 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo6

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:12:

TCTAGAAGCT TCCATGGTCC ACTTCCTCGT TCAACAA

37

(2) Údaje o SEQ ID-č:13:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 40 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo7

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:13:

TCTAGAAGCT TCCATGGAAA GAAACCGTTT TTTTAATACC

40

(2) Údaje o SEQ ID-č:14:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 41 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo8

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:14:

TCTAGAAGCT TGAATTCTTA AAACGAGCCA TTCGTTGTTT G

41

(2) Údaje o SEQ ID-č:15:

(i) Údaje o sekvenci:

- (A) Délka: 36 párů bází
- (B) Typ: nukleotid
- (C) Forma řetězce: jediný
- (D) Topologie: lineární

(ii) Typ molekuly: jiná nukleová kyselina

- (A) Popis: /desc= "syntetická DNK"

(vii) bezprostřední zdroj:

- (B) Klon(y): Oligo9

(viii):poloha v genomu:

- (C) jednotky: bp

(xi) Popis sekvence: SEQ-ID-č:15:

GAACGAGGCC GTGGATTATG AAAAGAAACC GTTTTT

36

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Regulovatelný expresní systém, obsahující trans-působící regulátorový protein a tímto proteinem aktivovatelný promotor a který může být regulován acetátem, hodnotou pH a kyslíkem,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že regulátorový protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je alespoň ze 75 % homologní k aminokyselinové sekvenci Seq.ID-č:1 a který obsahuje promotor DNK-sekvence, která je alespoň z 95 % homologní k bázím 315 až 397 DNK-sekvence Seq.ID-č.:2.

2. Expresní systém podle nároku 1,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že exprimuje jakýkoliv strukturní gen pod kontrolou expresního systému při parciálním tlaku kyslíku pO_2 0 až 5 %, hodnotě pH 6,0 až 6,5 a za přítomnosti acetátu v koncentraci 40 až 60 mM maximálně.

3. Regulátorový protein, v y z n a č u j í c í s e t í m , že při omezení kyslíku a za přítomnosti acetátu a hodnotě pH kultivačního media pH 6,0 až pH 6,5 působí optimální aktivaci bud-promotoru z *Klebsiella terrigena* (DSM2687).

4. Regulátorový protein podle nároku 3,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje aminokyselinovou sekvenci, která je alespoň ze 75 % homologní k aminokyselinové sekvenci Seq.ID-č:1.

5. Gen, kodující protein podle nároku 3 nebo 4.

6. Expresní kazeta, v y z n a č u j í c í s e t í m, že promotor, který obsahuje DNK-sekvenci, která je nejméně z 95 % homologní k bázím 315 až 397 DNK-sekvence sekvence ID-č:2, je funkčně spojen se strukturním genem exprimovaného, heterologního proteinu.

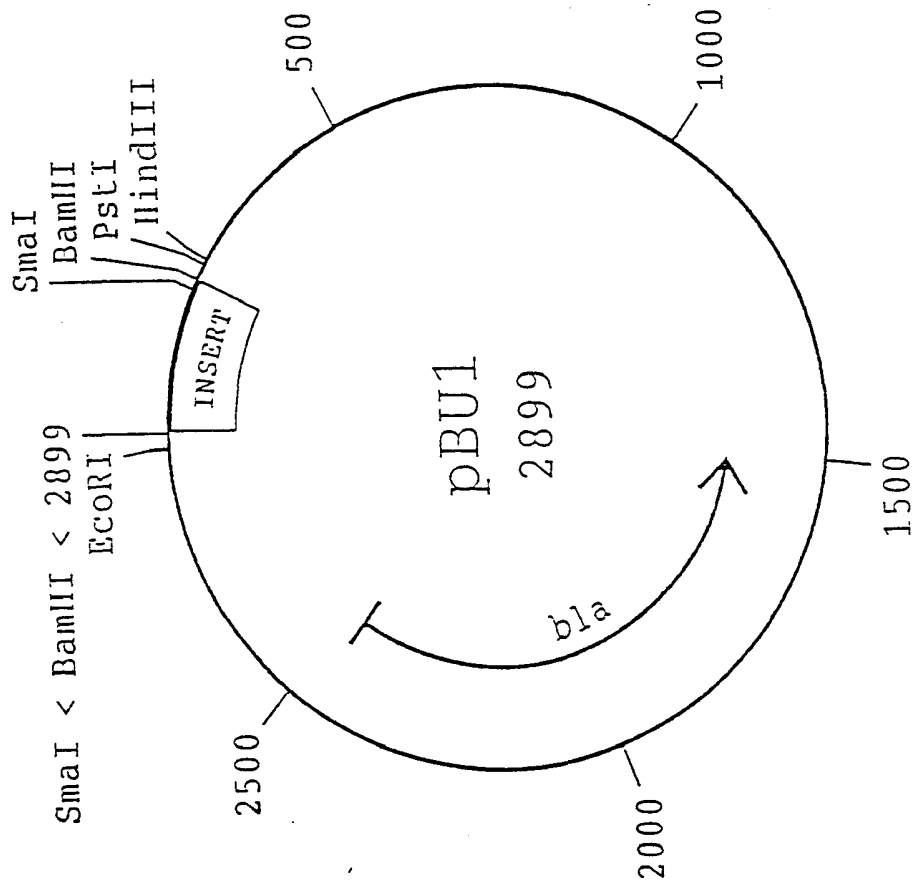
7. Mikroorganismy, obsahující alespoň jednu expresní kazetu podle nároku 6.

8. Mikroorganismy, obsahující alespoň jeden expresní systém podle nároku 1.

9. Způsob fermentace pro produkci proteinů pomocí mikroorganismů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použijí mikroorganismy podle nároku 7 nebo 8.

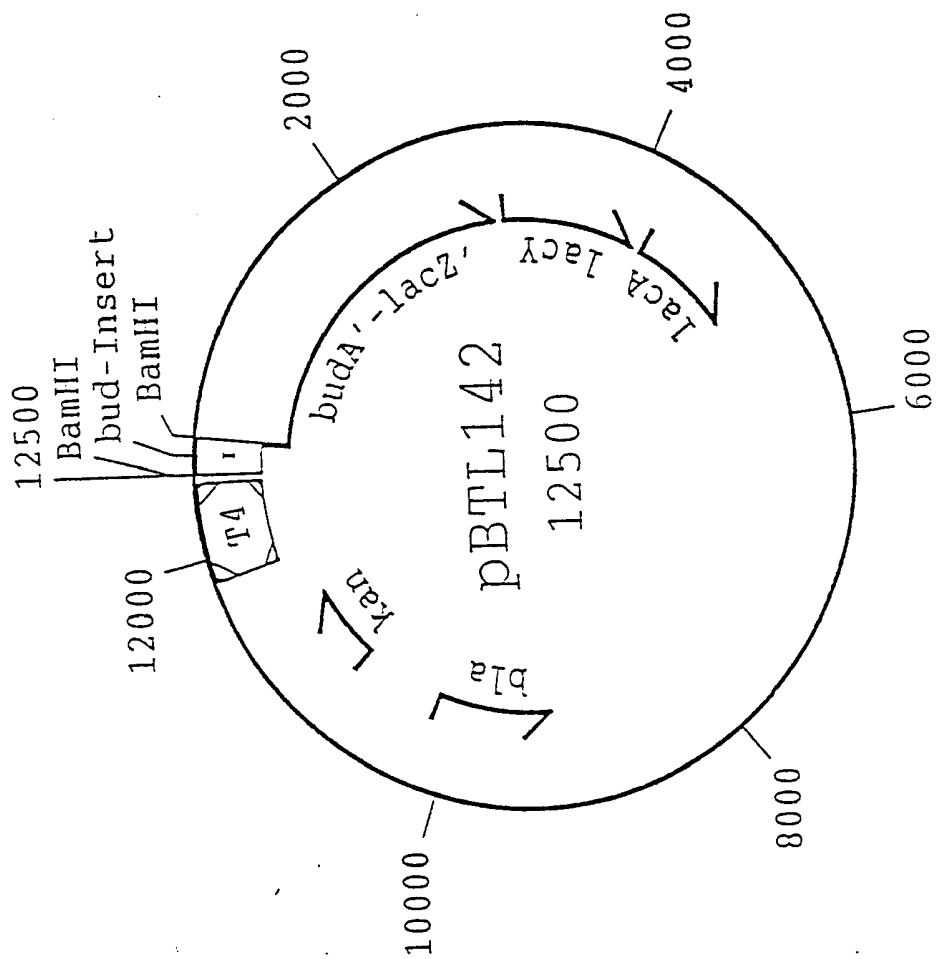
10. Způsob výroby mikroorganismů podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se do libovolného mikroorganismu zavede popřípadě alespoň jeden gen pro regulátorový protein podle nároku 4 nebo 5 a/nebo popřípadě alespoň jedna expresní kazeta podle nároku 7.

11. Použití Fnr-negativních mikroorganismů jako hostitelského kmene pro expresní systém podle nároku 1.



Pril.	22. III 96	021658	2.1
Vlastnicky	00510		
Urad			
Pril. 22. III 96			

Obr. 1



Obr. 2

g.j.	0 2 1 6 5 8	00510	2 2. III 96	ÚRAD PRŮMYSL OVĚHO VLASTNICTVÍ	PRIL.
------	-------------	-------	-------------	--------------------------------------	-------

-TAT CCT GAA TGC ACC TGC CAG GAT CCC GTC GTA TTA CAA-
 -Tyr Pro Glu Cys Thr Cys Gln Asp Pro Val Val Leu Gln-
 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 9. 10. 11. 12.

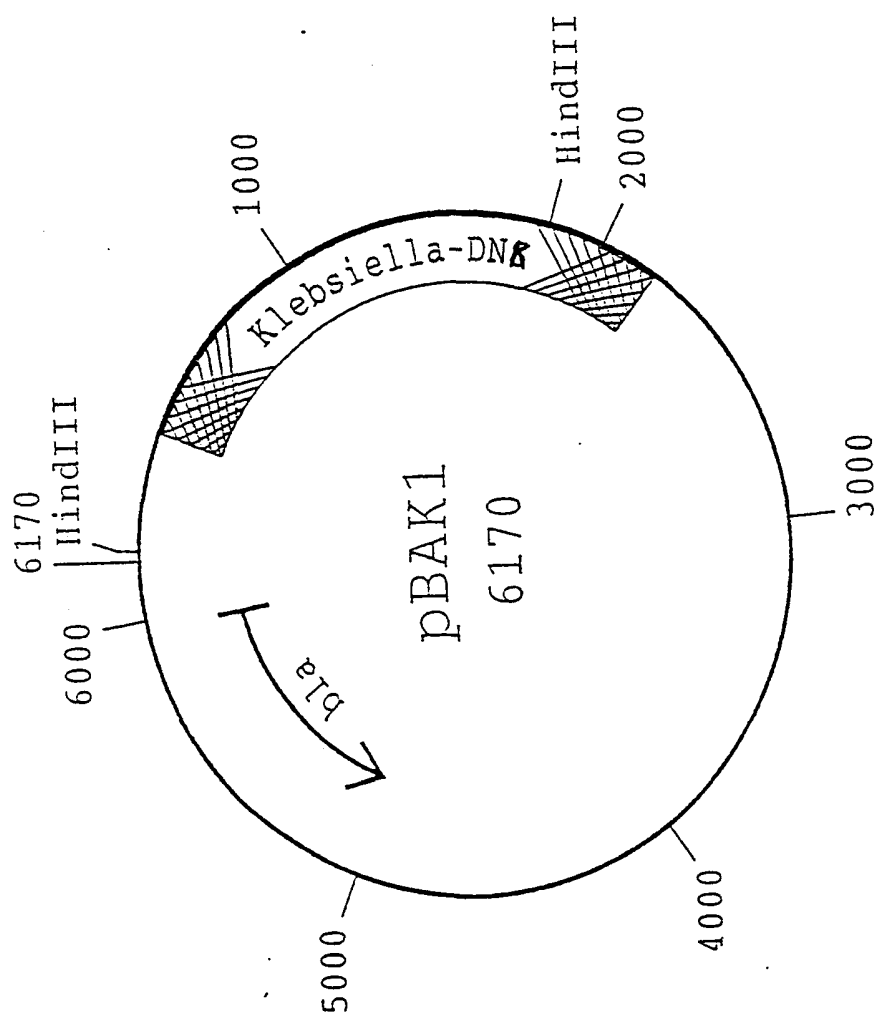


lacZ'-podil

budA'-podil

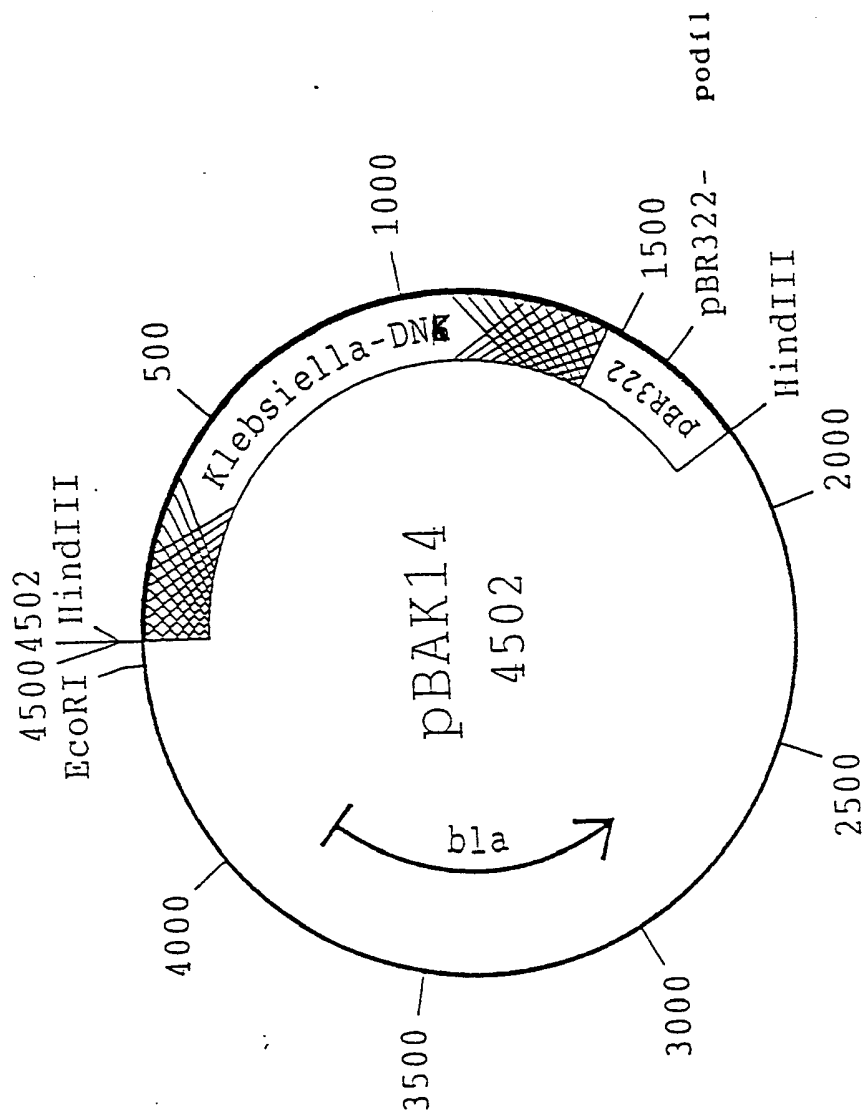
Obr. 3

PRIL.	
VLASTNICTV	
PRŮMYSLOVÉHO	
URAD	
0 2 1 6 5 8	22. III 96
DOŠLO	
e.j.	



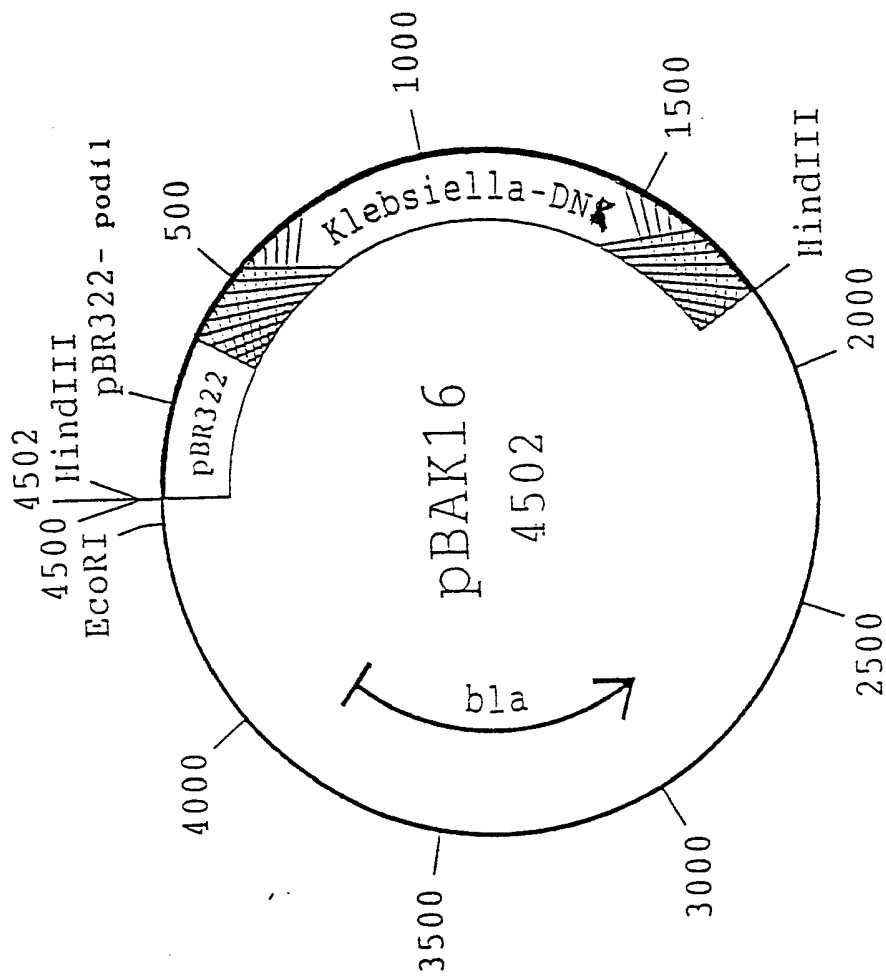
Obr. 4

2. 1. 6. 5. 8	2. 2. III. 9. 6	PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PRIL.
6. J.	00510	URAD	

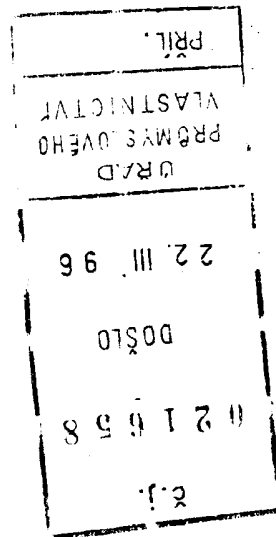


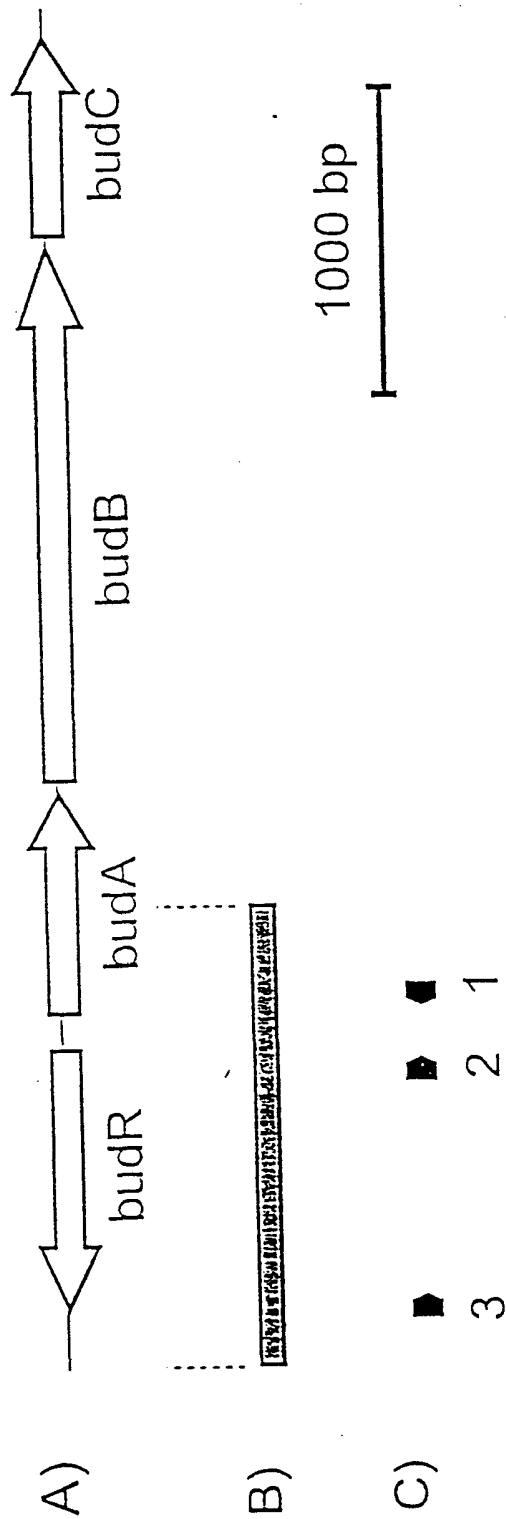
Obr. 5

2.1.	2 1 6 5 8	00810	22. III 96	URAD PRŮMYSLOVÉHO VÝSTAVIŠTĚ	FRIL.
------	-----------	-------	------------	------------------------------------	-------

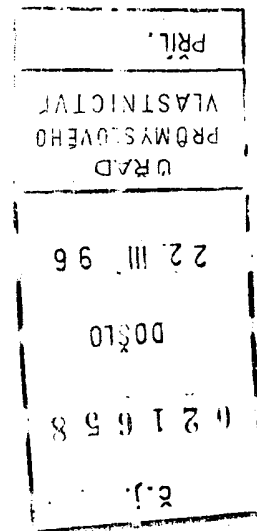


Obr. 6

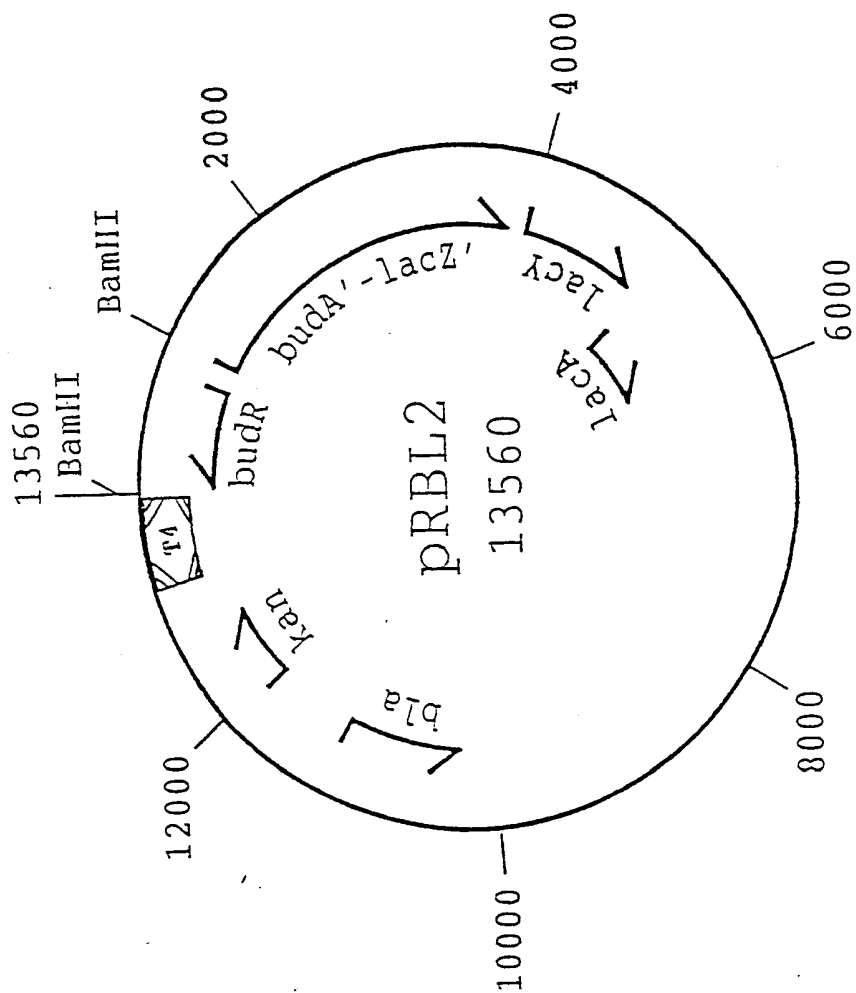




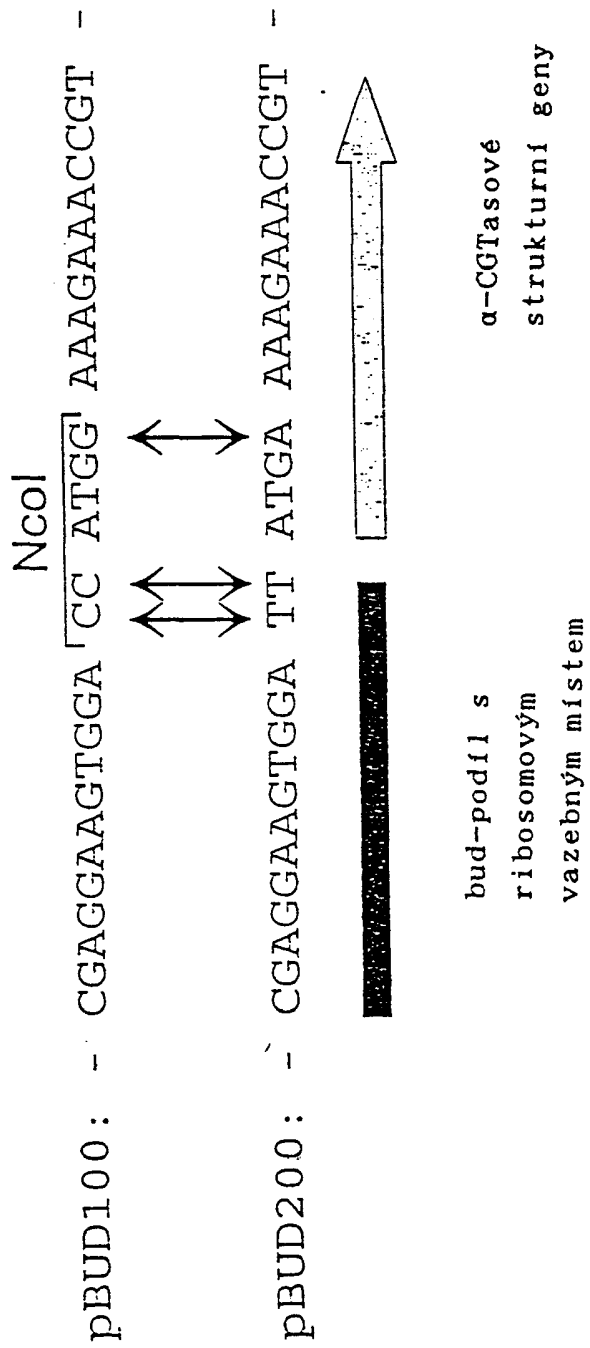
Obr . 7



PRIL.	
PRŮMYSLOVÉHO VLASTNÍCTVÍ	
URAD	
021658	22. III. 96
DOŠLO	
G.J.	



Obr. 8



Obr. 10

6.1.	021658	DOŠLO	22. III 96	GRAD PRŮMYŠLEHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.
------	--------	-------	------------	-----------------------------------	-------