

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

270 751

(21) PV o83o2-87.N
(22) Přihlášeno 19 11 87

(40) Zveřejněno 13 12 89
(45) Vydáno o4 o7 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

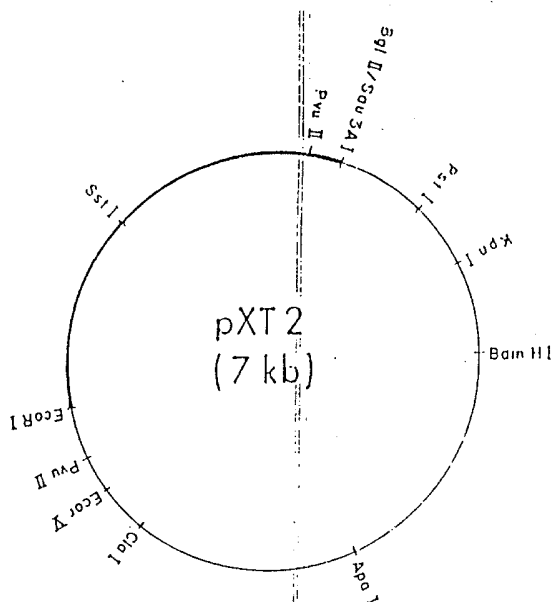
(75) Autor vynálezu

TICHÝ PAVEL RNDr. CSc., PRAHA (CS),
HOANG VIET RNDr., HANOI (VN),
PETŘÍČEK MIROSLAV ing.,
STAJNER KAREL RNDr., PRAHA (CS),
LIU XIAO TIE MUDr., BEIJING (CN),
HOŠTÁLEK ZDENĚK RNDr. DrSc.,
KRUMPHANZ VLADIMÍR člen korespondent ČSAV
PRAHA (CS)

(54)

Rekombinované plasmidy pSA2o a pXT2, kódující syntézu škrob ztekucující alfa amylázy ve streptomycetách

(57) Řešení se týká rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2 kódujících syntézu škrob ztekucující alfa amylázy ve streptomycetách, které jsou charakterizovány přítomností restrikčního fragmentu o velikosti 3,2 kb ve *Streptomyces limosus* pro plasmid pSA2o a přítomností jediného zásahového místa pro restrikční endonukleázu EcoRI vzniklého na základě vyštěpení EcoRI restrikčního fragmentu o velikosti 2 kb z plasmidu pSA2o a restrikčními mapami. Oba plasmidy byly připraveny technikou genové manipulace in vitro. Kromě produkce alfa amylázy kódují rekombinované plasmidy pSA2o a pXT2 resistenci streptomycetové bunky k antibiotiku thiostreptonu. Na základě restrikčních map těchto plasmidů je možné genetickou informaci pro syntézu alfa amylázy z rekombinovaných plasmidů vydělit a přenést i na jiné streptomycetové replikony. Plasmid pSA2o je uchováván v kmenu *Streptomyces lividans* AS2o, který je uložen v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4oo9. Plasmid pXT2, který je uchováván v kmenu *Streptomyces lividans* AS2, je uložen v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4ol2.



Vynález se týká rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2, kódujících syntézu škrob ztekucující α -amylázy ve streptomycetové buňce.

Streptomycety produkují řadu exoenzymů do okolního média. Je proto výhodné jich využít jako hostitelských buněk při klonování genetické informace kódující syntézu α -amylázy, která je průmyslově významným enzymem. Zdrojem genetické informace pro klonování funkčního α -amylázového genu ve streptomycetách byl, v doposud jediné úspěšné práci, chromosom kmene *Streptomyces hygroscopicus*. Klonování bylo provedeno v plasmidu pIJ7o2 (McKillop et al. FEMS Microbiol. Lett. 36:3, 1986). Vzniklý plasmid kódující syntézu α -amylázy, má velikost 8,6 kb a samotná velikost chromosomového insertu nesoucího α -amylázový gen je 2,8 kb.

Řešení podle vynálezu se týká rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2 kódujících syntézu škrob ztekucující alfa amylázy ve streptomycetách charakterizovaných přítomností restričního fragmentu o velikosti 3,2 kb ze *Streptomyces limosus* pro plasmid pSA2o a přítomností jediného zásahového místa pro restriční endonukleázu EcoRI vzniklého na základě vyštěpení EcoRI restričního fragmentu o velikosti 2 kb z plasmidu pSA2o.

Konstrukce rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2 kódujících syntézu α -amylázy

Pro konstrukci nové genetické informace kódující syntézu α -amylázy ve streptomycetové buňce bylo použito fragmentů chromosomu α -amylázy produkujícího kmene *Streptomyces limosus* a plasmidového vektoru pIJ622. Vzniklé rekombinované plasmidy pSA2o a pXT2 kódující syntézu škrob ztekucující α -amylázy mají velikost 9,0 kb a 7,0 kb. U obou popsaných včlenění α -amylázového genu do plasmidového vektoru vedlo ke zvýšení produkce α -amylázy na základě zvýšeného počtu α -amylázového genu v důsledku vysokého počtu kopií rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2 ve streptomycetovém hostiteli.

Vlastní konstrukce rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2

Sau3AI fragment o velikosti 3,2 kb, kódující syntézu α -amylázy, byl vličován do mnohokopiového plasmidového vektoru pIJ622 v jeho jediném BglIII místě. Vzniklý plasmid pSA2o transformovaný do streptomycetového hostitele, kmene *Streptomyces lividans* TK24, kóduje syntézu α -amylázy, která vede k nadprodukcí α -amylázy tímto kmenem v důsledku zvýšeného počtu kopií (40 - 60) amylázového genu. pSA2o má s dříve konstruovaným plasmidem pSA28 shodnou restriční mapu mezi restričními místy PvuII a KpnI situovanými v insertované chromosomové DNA, liší se však v koncových oblastech insertu.

Protože bylo zjištěno, že inserce do EcoRI místa situovaného v klonovaném fragmentu chromosomové DNA v rekombinovaném plasmidu pSA2o neovlivňuje syntézu α -amylázy kódované plasmidem, bylo provedeno zkrácení plasmidu pSA2o o 2,0 kb vyštěpením restričního fragmentu EcoRI-EcoRI a znovuzavřením zmenšeného plasmidu T4-DNA ligázou. Nově vzniklý plasmid pXT2 má velikost 7 kb a dosahuje v průměru počtu kopií v jedné streptomycetové buňce (měřeno na 1 chromosomový ekvivalent). Plasmid pXT2 vpravený do recipientních protoplastů *Streptomyces lividans* TK24 kóduje intenzivní syntézu α -amylázy streptomycetovým hostitelem. Stabilita plasmidu pXT2 v hostitelské buňce je shodná se stabilitou výchozího plasmidu pSA2o a dosahuje hodnoty -99 % v kultivacích bez selekčního tlaku.

Plasmidy pSA2o a pXT2 kódovaná α -amyláza má molekulovou hmotnost 48 kb a konečnými produkty štěpení škrobu tímto enzymem jsou oligosacharidy.

Znárodnění konstrukce rekombinovaných plasmidů pSA2o a pXT2 jsou na obr. 1 a 2, kde je silně vyznačen insert chromosomové DNA kmene *S. limosus*, kódující produkci α -amylázy a slabě DNA plasmidového vektoru.

Po vnesení plasmidu pSA2o do hostitelského kmene *Streptomyces lividans* TK24 byl vytvořen nový kmen *Streptomyces lividans* AS2o, vykazující jako nové vlastnosti přítomnost molekul DNA plasmidu pSA2o, schopnost syntézy alfa amylázy a resistenci buněk k thiostreptonu.

Kmen *lividans* AS2 vznikl přenesením plasmidu pXT2 do hostitelského kmene *Streptomyces lividans* TK24. Buňky kmene *S. lividans* AS2 obsahují plasmid pXT2, který má charakteristickou molekulovou hmotnost a kóduje v buňce hostitelského kmene syntézu alfa amylázy a rezistenci buňky k thiostreptonu.

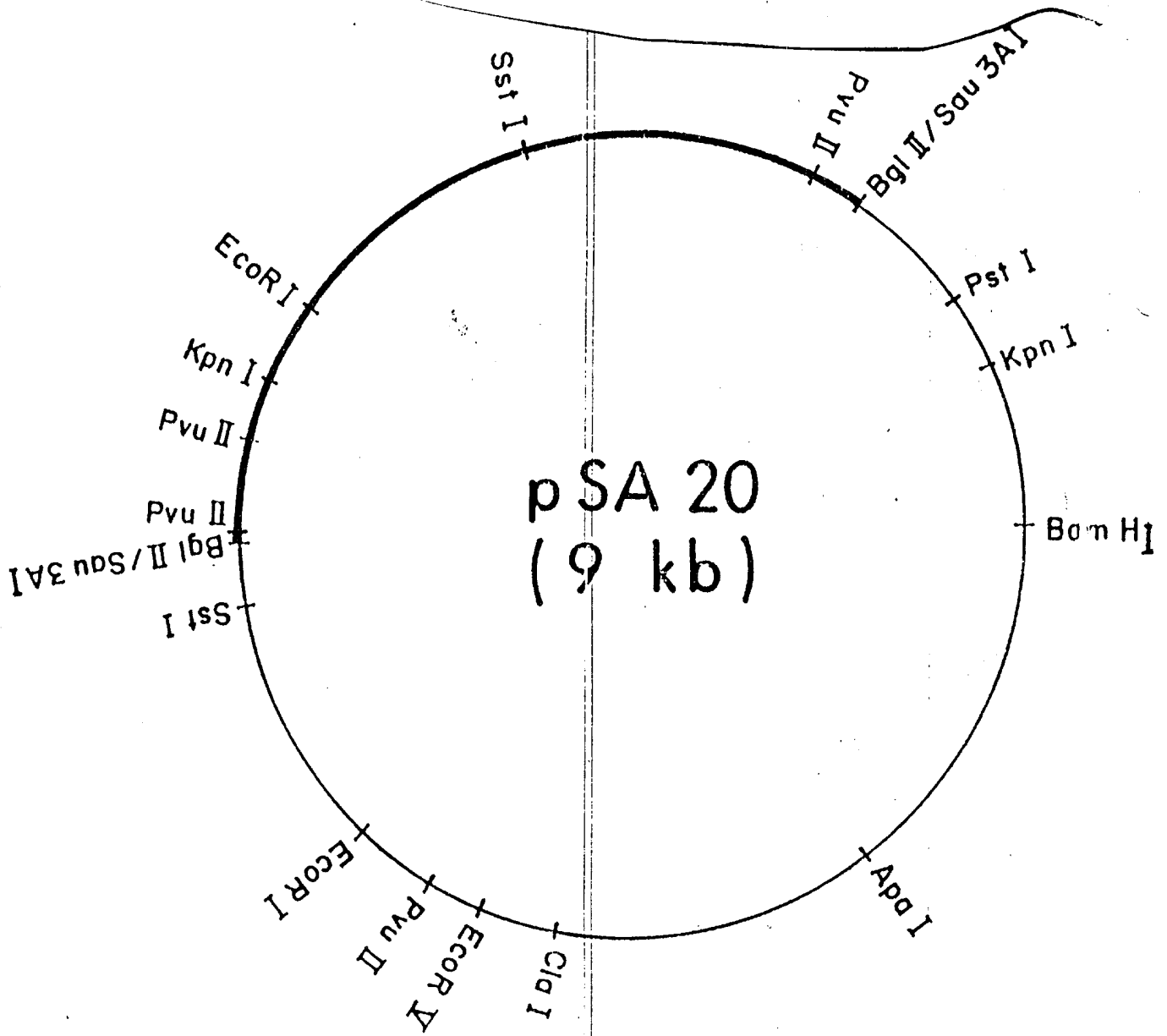
Oba plasmidy pSA2o a pXT2 jsou uchovávány v kmenech *Streptomyces lividans* AS2o a AS2 uložených v československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod čísly CCM 4009 a CCM 4012.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

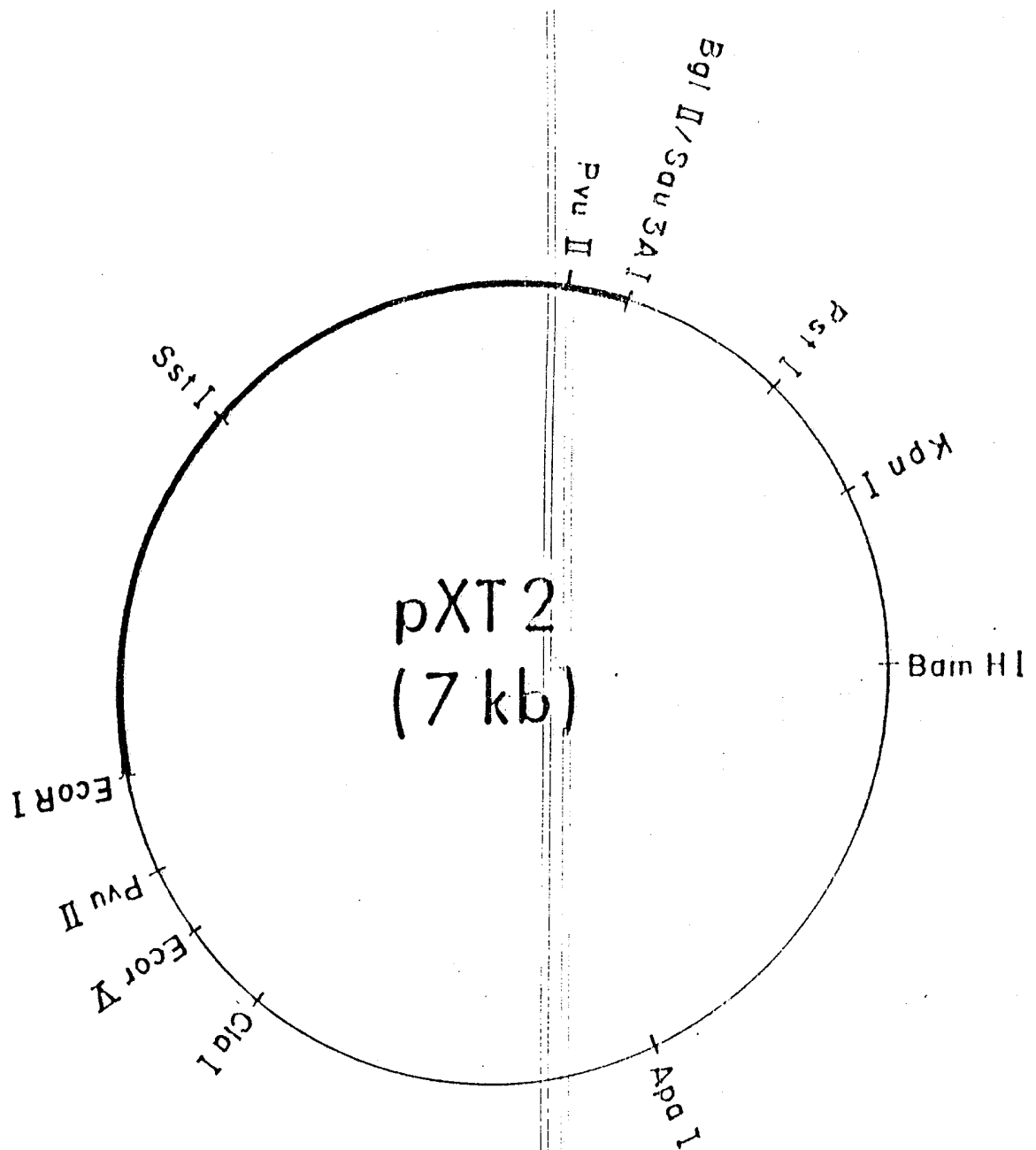
Rekombinované plasmidy pSA2o a pXT2, kódující syntézu škrob ztekucující alfa amylázy ve streptomycetách, charakterizované přítomností restrikčního fragmentu o velikosti 3,2 kb ze *Streptomyces limosus* pro plasmid pSA2o a přítomností jediného zásahového místa pro restrikční endonukleázu EcoRI, vzniklého na základě vyštěpení EcoRI restrikčního fragmentu o velikosti 2 kb z plasmidu pSA2o a restrikčními mapami a uchovávané v kmenech *Streptomyces lividans* AS2o CCM 4009 a *Streptomyces lividans* CCM 4012.

2 výkresy

CS 270751 B1



Obv. 1



Obr. 2