

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 939

(21) PV 8305-87.T
(22) Přihlášeno 19 11 87

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 12 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

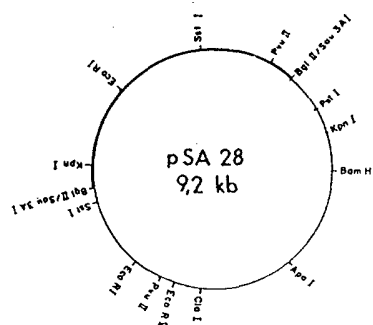
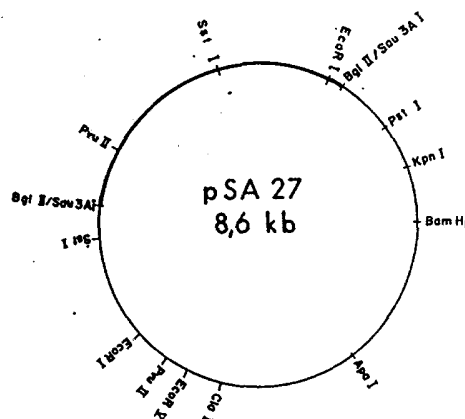
(75) Autor vynálezu

TICHÝ PAVEL RNDr. CSc., (CS),
HOANG VIET RNDr., HANOI (VN),
PETŘIČEK MIROSLAV ing.,
STAJNER KAREL RNDr.,
HOŠŤÁLEK ZDENĚK RNDr. DrSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR ing. DrSc.
člen korespondent, PRAHA (CS)

(54)

Rekombinované plasmidy pSA27 a pSA28 kódu-
jící syntézu alfa amylázy ve streptomycetách

(57) Řešení se týká rekombinovaných plasmidů pSA27 a pSA28 kódujících syntézu alfa amylázy ve streptomycetách. Jsou charakterizované přítomností restriktčního fragmentu chromosomové DNA z kmene *Streptomyces limosus* o velikosti 2,8 kb u pSA27 a 3,4 kb u pSA28 a restriktčními mapami. Oba plasmidy byly připraveny technikou genové manipulace in vitro. Kromě produkce alfa amylázy kódují rekombinované plasmidy pSA27 a pSA28 resistenci streptomycetové buňky k antibiotiku thiostreptonu. Na základě restriktčních map těchto plasmidů je možné genetickou informaci pro syntézu alfa amylázy z obou plasmidů vydělit a přenést ji i na jiné streptomycetové replikony. Plasmid pSA28 je uchováván v kmenu *Streptomyces lividans* AS28, který je uložen v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4011. Plasmid pSA27 je uchováván v kmenu *Streptomyces lividans* AS27, který je uložen v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4010.



Vynález se týká rekombinovaných plasmidů pSA27 a pSA28 kódujících syntézu alfa amylázy ve streptomycetách.

Genetická informace pro syntézu α -amylázy, nacházející se zpravidla v chromosomech producenta, byla přenesena na plasmidovou či fágovou molekulu v případě několika α -amylázových genů izolovaných z chromosomů bacilů a klonována v *Bacillus subtilis* (Yamane J. Agric. Chem. Jap. 54: 887, 1980; Gene 19: 81, 1982; Takeich et al. Agric. Biol. Chem. 47: 159, 1983; Joyet et al. FEMS Microbiol. Lett. 21: 358, 1984), v *E. coli* (Cornellis et al. Mol. Gen. Genet. 186: 507, 1982; Joet et al. FEMS Microbiol. Lett. 21: 353, 1984; Tsukagoshi et al. Mol. Gen. Genet. 193: 58, 1984), nebo *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux et al. FEMS Microbiol. Lett. 30: 203, 1985). Ve všech případech vyčlenění α -amylázového genu na vícekopiový vektor a jeho zavedení do bakteriálního hostitele vedlo ke zvýšení produkce α -amylázy ve srovnání s produkcí výchozích kmenů. U streptomycet byl doposud popsán pouze jeden úspěšný pokus o klonování α -amylázy. Gen z chromosomu *Streptomyces hygroscopicus* byl klonován v mnohokopiovém plasmidovém vektoru pU702 (McKillop et al. FEMS Microbiol. Lett. 36: 3, 1986). Vzniklý rekombinovaný plasmid pPOD 1039 po vstupu do hostitelské buňky *Streptomyces lividans* kódoval zvýšenou produkci α -amylázy hostitelskou buňkou.

Rekombinované plasmidy pSA27 a pSA28 podle vynálezu kódují syntézu alfa amylázy ve streptomycetách a jsou charakterizované přítomností restrikčního fragmentu chromosomové DNA z kmene *Streptomyces limosus* o velikosti 2,8 kb u pSA27 a 3,4 kb u pSA28 a dále restrikční mapou znázorněnou na obr. 1 a obr. 2.

Postup přípravy rekombinovaných plasmidů pSA27 a pSA28

Postup přípravy rekombinovaných plasmidů pSA27 a pSA28 měl 4 základní kroky:

Vyhledání a izolace fragmentů chromosomové DNA obsahujících gen kódující syntézu α -amylázy.

α -amylázový gen byl získán z chromosomu *S. limosus*. Tento kmen při kultivaci na škrobových médiích produkuje v nízkém množství α -amylázu, jejíž konečným produktem jsou oligosacharidy složené ze 2 - 5 jednotek glukosy.

Buňky *S. limosus* byly lyzovány lysozymem a SDS a chromosomová DNA byla připravena izolační metodou dle Hopwooda a spol., 1985. Pro zvýšení čistoty chromosomové DNA byla tato čištěna na konci separační procedury centrifugací v CaCl gradientu. Takto připravená chromosomová DNA byla částečně štěpena restrikční endonukleázou Sau3AI nebo MboI a v sacharosovém gradientu byly odděleny fragmenty o velikosti 2 až 4 kb. Velikost fragmentů byla kontrolována elektroforeticky, elektroforézou restrikčních fragmentů v agarosovém gelu.

Včlenění genu pro syntézu α -amylázy do mnohokopiového plasmidového vektoru.

Restrikční fragmenty o velikosti 2 až 4 kb získané parciálním štěpením chromosomové DNA restrikčními endonukleázami Sau3AI a/ nebo MboI byly ligovány in vitro enzymem T4 ligázou do molekuly DNA plasmidového vektoru pU622 v jeho jediném zásahovém místě pro restrikční endonukleázu BglII.

Selekce rekombinovaných plasmidů kódujících α -amylázu z transformované populace streptomycetového recipienta.

Rekombinované molekuly plasmidového vektoru pU622 a fragmenty chromosomové DNA *S. limosus* byly vpraveny transformací do recipientních protoplastů kmene *Streptomyces lividans* TK24 a buňky obsahující rekombinovaný plasmid, kódující syntézu α -amylázy byly selektovány jako alfa amylázu produkující, thiostrepton rezistentní kolonie. K ověření přítomnosti α -amylázu kódujícího genu v rekombinovaných plasmidech byly z transformantů *S. lividans* produkujících α -amylázu izolovány plasmidové DNA a retransformovány do protoplastů kmene *S. lividans* TK24.

Restrikční analýza rekombinovaných plasmidů pSA27 a pSA28 kódujících syntézu α -amylázy.

Z transformantů *S. lividans* TK24 produkujících α -amylázu byly izolovány plasmidové

DNA o velikosti 9,2 kb (pSA28) a 8,6 kb (pSA27).

Restrikční analýza pSA27 a pSA28 prokázala, že rekombinované plasmidy obsahují restrikční fragmenty chromosomové DNA *S. limosus* nestejné délky pSA27–2,8 kb a pSA28–3,4 kb a že restrikční fragmenty kódující produkci α -amylázy jsou v plasmidech pSA27 a pSA28 v opačné orientaci. To přináší důkaz, že gen pro produkci α -amylázy získaný z chromosomu *Streptomyces limosus* byl klonován v plasmidech pSA27 a pSA28 i s jeho regulační oblastí. Inertované fragmenty kódující syntézu α -amylázy v rekombinovaných molekulách plasmidů pSA27 a pSA28 jsou restrikčně charakterizovány přítomností jediných restrikčních míst pro restrikční endonukleázy PvuII, SstII a EcoRI. Vzdálenost mezi PvuII a SstII restrikčními místy je 1,0 kb a vzdálenost mezi SstII a EcoRI restrikčními místy má délku rovněž 1,0 kb. Bylo prokázáno, že zásahová sekvence pro SstI restrikční endonukleázu leží v oblasti DNA kódující syntézu α -amylázy.

Počet kopií plasmidů pSA28 a pSA27 v hostitelské buňce *S. lividans* TK24 se pohybuje v rozmezí 20 až 40 kopií v závislosti na kultivačních podmínkách. Vysoký počet kopií zajišťuje vysokou stabilitu plasmidů pSA27 a pSA28 v hostitelské streptomycetové buňce.

Po vnesení plasmidů pSA28 do hostitelského kmene *Streptomyces lividans* TK24 byl vytvořen nový kmen *Streptomyces lividans* AS28, vykazující jako nové vlastnosti přítomnost molekul DNA plasmidu pSA28, schopnost syntézy alfa amylázy a resistenci buněk k thiostreptonu.

Kmen *Streptomyces lividans* AS27, který vznikl přenesením plasmidu pSA27 do hostitelského kmene *Streptomyces lividans* TK24, se liší od kmene *Streptomyces lividans* AS28 přítomností DNA plasmidu pSA27, ve kterém je gen pro syntézu alfa amylázy klonován v obrácené poloze ve srovnání s plasmidem pSA28.

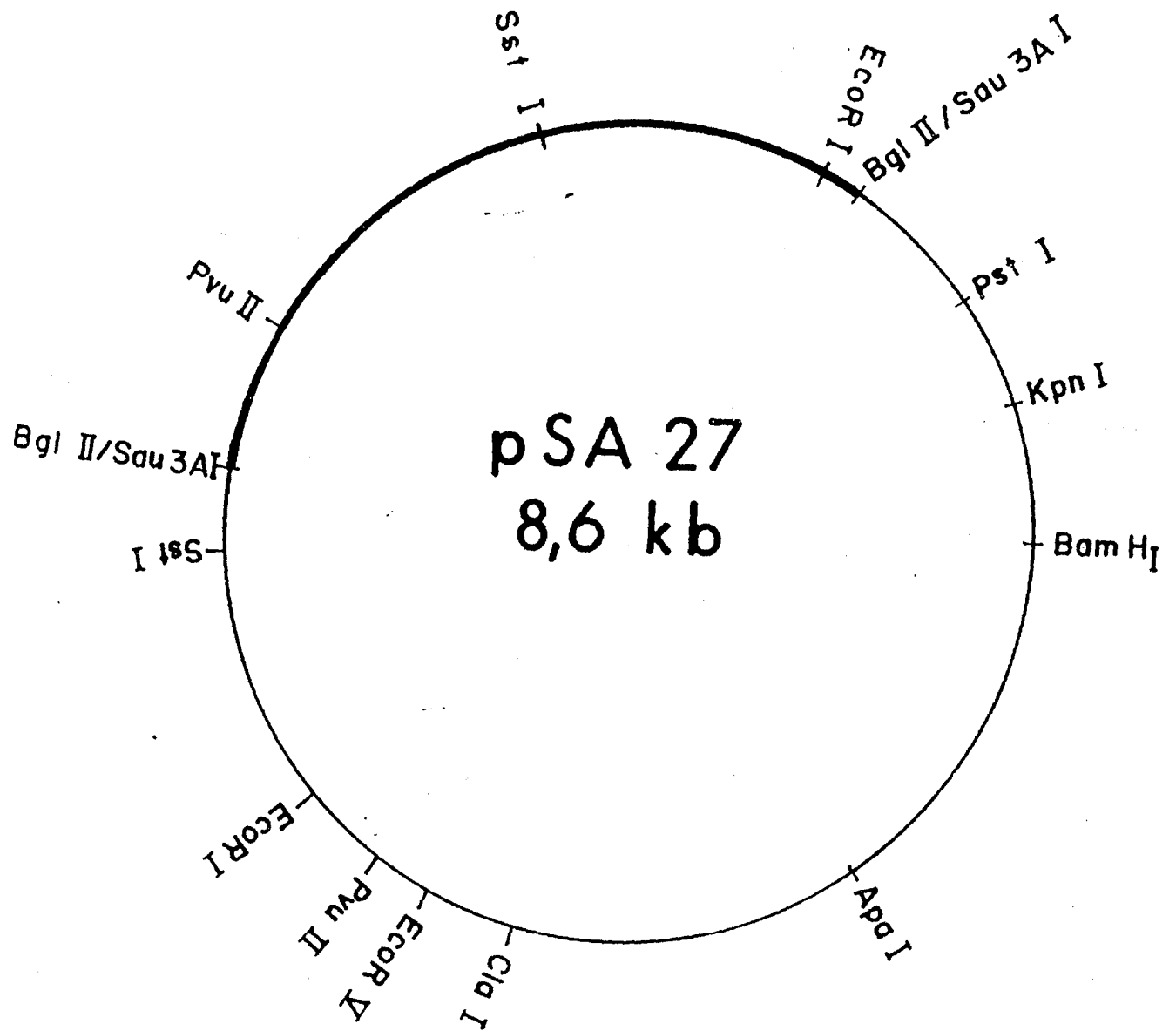
Rekombinované plasmidy pSA27 a pSA28 jsou uchovávány v kmenech *Streptomyces lividans* AS27 a AS28, které jsou uloženy v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod čísly CCM 4011 a CCM 4010.

Restrikční mapy rekombinovaných plasmidů jsou uvedeny na obr. 1 a 2, silně je vyznačen inzert chromosomové DNA kmene *S. limosus* kódující produkci α -amylázy, slabě je vyznačena DNA plasmidového vektoru pJ622.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

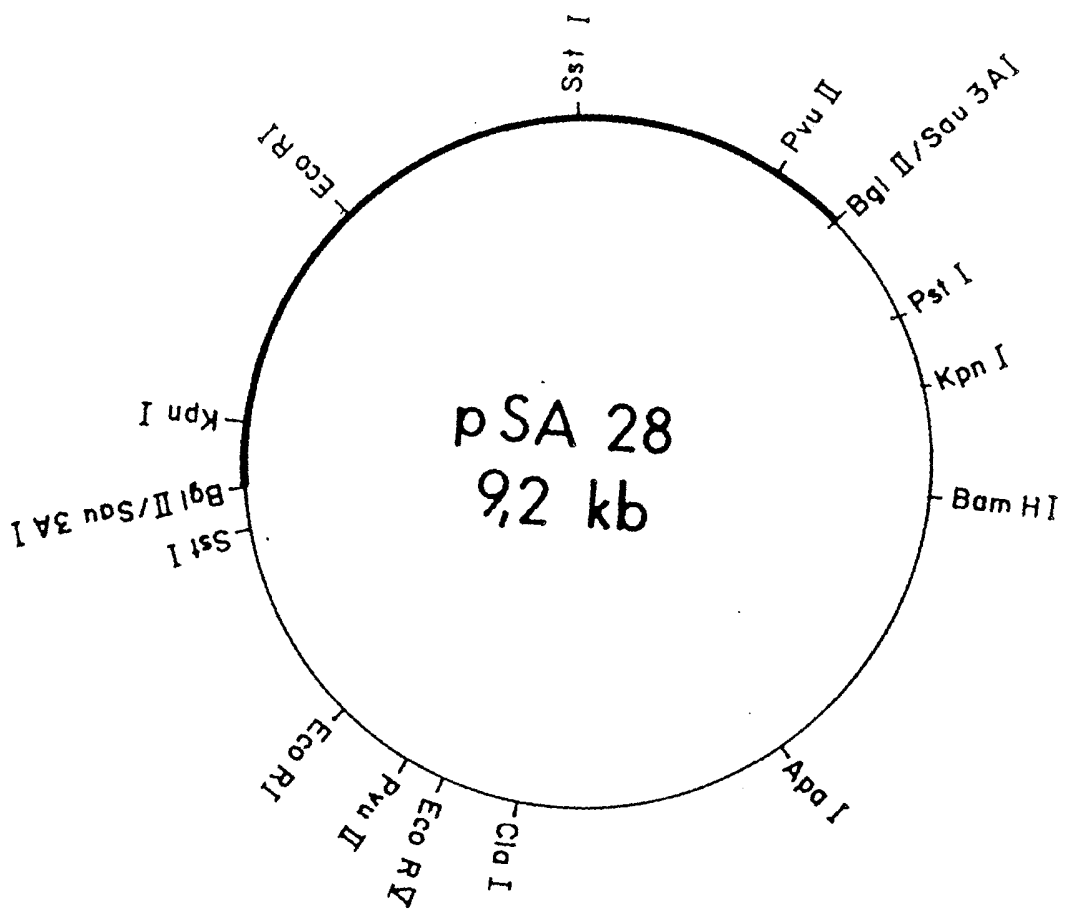
Rekombinované plasmidy pSA27 a pSA28, kódující syntézu alfa amylázy ve streptomycetách charakterizované přítomností restrikčního fragmentu chromosomové DNA z kmene *Streptomyces limosus* o velikosti 2,8 kb u pSA27 a 3,4 kb u pSA28 a restrikční mapou, uchovávané v kmenech *Streptomyces lividans* AS27 CCM 4011 a AS28 CCM 4010.

CS 269939 B1



Obr. 1

CS 269939 B1



Obr. 2