

K I V O N A T

Az rplK gént kódoló új nukleotid-szekvenciák

A találmány tárgyát olyan izolált polinukleotid képezi, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

c) polinukleotid, amely az a) vagy b) polinukleotidokkal komplementer és

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

Továbbá a találmány tárgyát képezi L-aminosavak fermentatív előállítása legyengített rplK gént hordozó *Coryneform glutamicum* baktériumokkal.

jellemző stb. 4

Revis



101

Az rplK gént kódoló új nukleotid-szekvenciák

A találmány tárgyát a coryneform baktériumokból származó rplK gént kódoló nukleotid-szekvenciák és az rplK gén legyengítésével aminosavak, különösen L-lizin fermentatív előállítására szolgáló eljárás képezi.

L-aminosavak, különösen L-lizin az állati takarmányozásban, a humán gyógyászatban és a gyógyszeriparban kerülnek felhasználásra.

Ismert, hogy ezeket az aminosavakat coryneform baktérium törzsek, különösen *Corynebacterium glutamicum* fermentációjával állítják elő. Nagy jelentősége miatt állandóan javítják az előállítási eljárásokat. E mikroorganizmusok belső teljesítmény sajátosságainak javítására a mutagenézis, szelekció és mutáns kiválasztás módszereit alkalmazzák. Ilyen módon antimetabolitokkal – például az S-(2-aminoetil)-cisztein lizin analóggal – szemben rezisztens vagy a szabályozás szempontjából fontos anyagcsere-termékekre nézve auxotróf törzseket kapnak, amelyek L-aminosavat termelnek.

Néhány éve a rekombináns DNS technika módszereit is alkalmazzák aminosavat termelő *Corynebacterium* törzsek javítására, ahol egyes aminosav bioszintézis géneket megsokszoroznak (amplifikálnak) és megvizsgálják az L-aminosav termelésre gyakorolt hatást. Erről áttekintő irodalom található többek között az alábbi publikációkban [Kinoshita, Glutamic Acid Bacteria, in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (eds.) Benjamin Cummings, London, UK, 115-142 (1985);

Hilliger, BioTec 2, 40-44 (1991); Eggeling, Amino Acids 6, 261-272 (1994); Jetten and Sinskey, Crit. Rev. Biotech. 15, 73-103 (1995) és Sahn et al., Ann. New York Acad. Sci. 782, 25-39 (1996)].

Az RplK fehérje (riboszómális nagy alegység fehérje K) egy először *Escherichia coli*-ban leírt, bakteriális riboszómának – a sejt transzlációs készülékének, a fehérje bioszintézis színterének – alkotórésze.

A riboszómák olyan sejt részecskék, amelyek három ribonukleinsav (RNS) molekulából és meghatározott mennyiségű fehérjéből állnak. A riboszómákat legtöbbször sejtkivonatokból nyerik ki ultracentrifugálással. Az egyéb sejtalkotórészeketől való további tisztítás szokás szerint szacharóz gradiensben ülepítéssel történik. A preparálásnak ez a technikája vezetett a riboszóma alkotórészek szokásos jelöléséhez, amely közvetlenül a szedimentációs sajátságokra vonatkozik. Egy funkcionális baktérium riboszómát ezen az alapon gyakran 70S-riboszómaként jelölnek, amely a 30S-kis alegységből és az 50S nagy alegységből áll. Az *E. coli* 30S kis alegység 21 különböző polipeptidből és a szakember számára 16S RNS-ként ismert, 1542 nukleotid hosszúságú RNS molekulából áll; az 50S alegység az RplK fehérje mellett tartalmaz még további 31 különböző polipeptidet, együtt két RNS molekulával, amelyek 120 illetve 2904 nukleotid hosszúságúak, az úgynevezett 5S illetve 23S rRNS molekulák. Időközben alkottak a riboszómális fehérjékre egy alternatív nevezéket. Ennek alapján a kis 30S alegység polipeptidjeit S1-S21-ig, a nagy 50S alegység polipeptidjeit L1-L32-ig jelölik. Az RplK fehérje a riboszómális

L11 fehérjének felel meg [Noller and Nomura, in: Neidhardt et al., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, American Society for Microbiology, Washington D.C. 167-186 (1996)]. Az utóbbi években más szervezetekben, mint például *Borrelia burgdorferi*-ben [Fraser et al., *Nature* 390, 580-586 (1997)], *Helicobacter pylori*-ban [Tomb et al., *Nature* 388, 539-547 (1997)], *Serratia marcescens*-ben [Sor and Nomura, *Mol. Gen. Genet.* 210, 52-59 (1987)], *Haemophilus influenzae*-ben [Fleischmann et al., *Science* 269, 496-512 (1995)] és a *Bacillus subtilis* Gram-pozitív baktériumban [Jeong et al., *Mol. Microbiol.* 10, 133-142 (1993)] is azonosítottak az L11-hez hasonló fehérjéket.

A riboszómán lejátszódó transzláció, tehát a matrica-RNS (mRNS) irányította polipeptid bioszintézis komplex folyamat. A riboszóma mellett további fehérjék nélkülözhetetlenek a transzlációs folyamathoz, amelyeket a szakemberek fehérje-szintézis faktoroknak neveznek [Noller, *Ann. Rev. Biochem.* 60, 191-227 (1991)]. Az L11 fehérje közvetíti a riboszóma és egyes fehérje-szintézis faktorok közötti kölcsönhatást; példaként megemlíthető itt a G elongációs faktor (EF-G) és az 1 terminációs faktor (TF-1). Az L11 fehérje hiánya az L11-mutáns *E. coli* riboszómájában tehát a transzláció sebességének csökkenését okozza [Xing and Draper, *Biochem.* 35, 1581-1588 (1996)].

Az L11 fehérje nélkülözhetetlen a riboszómán levő RelA fehérje kötődéséhez és aktivitásához is. RelA katalizálja aminosav hiány körülményei között a guanozin-tetrafoszfát

(ppGpp) szintézisét ATP-ről GDP-re történő pirofoszfát-csoport átvitelével. ppGpp *E. coli*-ban sok gén kifejeződését befolyásolja vagy negatív vagy pozitív vonatkozásban. A bioszintézis utakban hatékony géntermékek kifejeződését általában stimulálja. A katabolikusan hatékony géntermékeket a szabálynak megfelelően negatívan szabályozza. ppGpp-n keresztül *E. coli*-ban olyan gének és operonok nagy száma szabályozódik, amelyek az aminosav bioszintézisben központi szerepet játszanak. Az eddig ismert, *E. coli*-ban pozitívan befolyásolt gének közé tartoznak többek között az *argF*, *argI*, *argECBH* (arginin bioszintézis), *gltB*, *glnA*, *gdh* (glutamin/glutamát bioszintézis), *ilvB*, *ilvA* (izoleucin bioszintézis), *metC*, *metF*, *metK* (metionin bioszintézis), *thrA*, *thrB*, *thrC* (treonin bioszintézis), *lysA*, *lysC*, *dapB*, *asd* (lizin bioszintézis) [Cashel et al., in: Neidhardt et al., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1458-1496 (1996)]. ppGpp pozitív szabályozó szerepét az aminosav bioszintézisben időközben más baktériumokban is kimutatták, *Salmonella typhimurium*-ban [Rudd et al., *J. Bacteriol.* 163, 534-542 (1985)], *Vibrio* sp.-ben [Flärdh et al., *J. Bacteriol.* 176, 5949-5957 (1994)] és *B. subtilis*-ben [Wendrich and Marahiel, *Mol. Microbiol.* 26, 65-79 (1997)].

A szakma mai szintjén nyilvánvaló a törekvés annak kiderítésére, vajon a coryneform baktériumok *rplK* génje nukleotid-szekvenciájának ismerete hozzájárul-e ezen baktériumok aminosav termelésének javításához.

A feltalálók célja aminosavak, különösen L-lizin javított fermentációs előállítására vonatkozó új intézkedések nyilvánosságra hozatala.

Aminosavak, különösen L-lizin a humán gyógyászatban, a gyógyszeriparban és különösen az állati takarmányozásban kerülnek felhasználásra. Ezért általános az érdeklődés aminosavak, különösen L-lizin előállítására szolgáló új, javított eljárások közreadására.

A találmány tárgyát olyan izolált polinukleotid képezi, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

c) polinukleotid, amely az a) vagy b) polinukleotidokkal komplementer és

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

Szintén a találmány tárgyát képezi az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amelyben előnyösen olyan replikációra képes DNS-ről van szó, amely

i) az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát, vagy

ii) legalább egy, az i) szekvenciának a genetikai kód

degeneráltságán belül megfelelő szekvenciát, vagy

iii) legalább egy, az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciával hibridizáló szekvenciát, és adott esetben

iv) i)-ben működésre semleges szenz mutációkat tartalmaz.

A találmány további tárgyát képezi

a 4. igénypont szerinti polinukleotid, amely az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát tartalmazza,

a 2. igénypont szerinti polinukleotid, amely a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol,

az 1. igénypont, különösen a d) pont szerinti polinukleotid, amely a 3. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát tartalmazza,

az 1. igénypont, különösen a d) pont szerinti polinukleotid, amely a 4. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol,

az 1. igénypont d) pontja szerinti, a 3. számú szekvenciában és az 1. ábrán ($\Delta = \text{deHa}$) bemutatott mutáns polinukleotidot tartalmazó vektor, amelyet a budapesti szerződésnek megfelelően *E. coli* DH5 α /p Δ rplK törzsben, DSM 13158 számon helyeztünk letétbe, és

gazdaszervezetként szolgáló olyan coryneform baktériumok, amelyek az rplK génben inszerciót vagy deléciót tartalmaznak.

Szintén a találmány tárgyát képezik lényegében olyan polinukleotid-szekvenciából álló polinukleotidok, amelyek megfelelő génbank hibridizációs screenelésével kaphatók, amelyek az 1. számú szekvenciának megfelelő polinukleotid-szekvenciát

tartalmazó teljes gént vagy annak részeit olyan szondával tartalmazzák, amely a nevezett, 1. számú szekvencia szerinti polinukleotid szekvenciáját vagy annak fragmentumát tartalmazza és a nevezett DNS szekvencia izolálása.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmasak RNS, cDNS és DNS hibridizációs szondaként a riboszómális L11 fehérjét kódoló teljes hosszúságú cDNS izolálására és olyan cDNS vagy gén izolálására, amely az rplK gén szekvenciájával nagymértékű hasonlóságot mutat.

A találmány szerinti polinukleotid-szekvenciák alkalmasak továbbá primerként, amelyeknek a segítségével polimeráz láncreakcióval (PCR = polymerase chain reaction) génekből előállítható az rplK génterméket illetve a riboszómális L11 fehérjét kódoló DNS.

Az ilyen, szondaként vagy primerként szolgáló oligonukleotidok legalább 30, előnyösen legalább 20, különösen előnyösen legalább 15 egymást követő nukleotidot tartalmaznak. Ugyanígy alkalmasak legalább 40 vagy 50 nukleotid hosszúságú oligonukleotidok.

„Izolált” azt jelenti, hogy természetes környezetétől elválasztott.

„Polinukleotid” általában olyan poliribonukleotidokra és polidezoxiribonukleotidokra vonatkozik, ahol egyaránt lehet szó nem módosított RNS-ről és DNS-ről vagy módosított RNS-ről és DNS-ről.

„Polipeptidek” alatt olyan peptideket vagy fehérjéket értünk, amelyek peptidkötéssel kapcsolódó két vagy több aminosavat tartalmaznak.

A találmány szerinti polipeptidek magukban foglalják a 2. számú szekvencia szerinti polipeptideket, különösen olyanokat, amelyek az rplK gén termékének biológiai aktivitásával rendelkeznek és olyanokat is, amelyek legalább 70%-ban, előnyösen legalább 80%-ban és különösen olyanokat, amelyek legalább 90-95%-ban azonosak a 2. számú szekvencia szerinti polipeptiddel és rendelkeznek a nevezett aktivitással.

A találmány oltalmi körébe tartozik továbbá aminosavak, különösen L-lizin előállítására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan coryneform baktériumokat alkalmaz, amelyek már termelik az L-aminosavat és amelyekben az rplK gént kódoló nukleotid-szekvenciát legyengítjük.

A „legyengítés” fogalma ebben az összefüggésben egy mikroorganizmusban egy vagy több, a megfelelő DNS által kódolt enzim illetve fehérje intracelluláris aktivitásának csökkentését vagy kikapcsolását jelenti azáltal, hogy például egy gyenge promótert vagy olyan gént illetve allélt alkalmazunk, amely egy megfelelő enzimet illetve fehérjét alacsonyabb aktivitással kódol illetve a megfelelő enzimet illetve fehérjét inaktiválja és adott esetben ezeket az intézkedéseket kombinálja.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok képesek aminosavak, különösen lizin előállítására glükózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszból, keményítőből, cellulózból vagy glicerinnél és etanolból.

Coryneform baktériumok képviselői közül főleg a *Corynebacterium* nemzetség jöhet szóba. A *Corynebacterium* nemzetségen belül különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj említésre méltó, amelynek L-aminosavakat termelő képessége ismert a szakmában.

A *Corynebacterium* nemzetség, különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj alkalmas törzsei például az ismert vad törzsek

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 és

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

és ezekből előállított, L-aminosavakat termelő mutánsok illetve törzsek, mint például a következő, L-lizint termelő törzsek

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463

Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 és

Corynebacterium glutamicum DSM 5715

A feltalálónak sikerült az új *rplK* gént izolálni *Corynebacterium glutamicum*-ból.

Az *rplK* gén *C. glutamicum*-ból történő izolálásához először egy génbankot készítünk *Corynebacterium glutamicum*-ból. Génbankok létesítését általánosan ismert tankönyvek és



kézikönyvek írják le. Példaként megemlíthető a következő tankönyv [Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland (199)] és kézikönyv [Sambrook et al., Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))]. Nagyon ismert génbank az *E. coli* K-12 W3110 törzsé, amelyet Kohara és munkatársai [Cell 50, 495-508 (1987)] λ -vektorokban hoztak létre. Bathe és munkatársai [Mol. Gen. Genetics 252, 255-265 (1996)] *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot írnak le, amelyet a SuperCos I kozmidvektor [Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 2160-2164 (1987)] segítségével *E. coli* K-12 NM554 törzsben [Raleigh et al., Nucl. Acid Res. 16, 1563-1575 (1988)] létesítettek. Másrészt Börman és munkatársai [Mol. Microbiol. 6(3), 317-326] leírnak egy *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot a pHc79 kozmid [Hohn and Collins, Gene 11, 291-298 (1980)] alkalmazásával.

C. glutamicum génbank létrehozásához *E. coli*-ban plazmidok, például pBR322 [Bolivar, Life Sci. 25, 807-818 (1979)] vagy pUC9 [Vieira et al., Gene 19, 259-268 (1982)] is felhasználhatók. Gazdaszervezetként különösen megfelelőek restrikció- és rekombináció-hibás *E. coli* törzsek. Erre példa a DH5 α MCR törzs, amelyet Grant és munkatársai írtak le [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)].

A kozmidok segítségével klónozott hosszú DNS fragmentumok ezután újból szokásos, a szekvenáláshoz alkalmas vektorokba szubklónoozhatók.

Módszereket írnak le DNS szekvenálásra többek között például Sanger és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)].

Ily módon kaptuk meg az új, az rplK gént kódoló DNS szekvenciát *C. glutamicum*-ból, amely 1. számú szekvenciaként a találmány részét képezi. Továbbá a szóban forgó DNS szekvenciából a fent leírt módszerek segítségével levezetjük a megfelelő fehérje aminosav-szekvenciáját. Az rplK géntermék illetve az L11 fehérje így adódó aminosav-szekvenciáját a 2. számú szekvenciában mutatjuk be.

Az 1. számú szekvenciából a genetikai kód degeneráltsága révén adódó kódoló DNS szekvenciák szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Ugyanígy a találmány részét képezik olyan DNS szekvenciák, amelyek az 1. számú szekvenciával vagy annak részeivel hibridizálnak. A 2. számú szekvenciából megfelelő módon adódó aminosav-szekvenciák szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A feltalálók kiderítették, hogy coryneform baktériumok az rplK gén legyengítése után jobban termelnek L-aminosavakat, különösen L-lizint.

A legyengítés elérése céljából vagy az rplK gén kifejeződése vagy a fehérje funkcionális tulajdonságai csökkenthetők. Adott esetben a kettő kombinálható egymással.

A génkifejeződés csökkentése elérhető a tenyésztés megfelelő vezetésével vagy a génkifejeződés szignál struktúrájának genetikai megváltoztatásával (mutációval). A génkifejeződés szignál struktúrái például a represszor gének, aktivátor gének,

operátorok, promóterek, attenuátorok, riboszómakötő-helyek, a start kódon és terminátorok. Ezekhez leírást talál a szakember például a WO 96/15246 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentésben és az alábbi hivatkozásokban [Boyd and Murphy, J. Bacteriol. 170, 5949 (1988); Voskuil and Chambliss, Nucl. Acids Res. 26, 3548 (1998); Jensen and Hammer, Biotechnol. Bioeng. 58, 191 (1998); Patek et al., Microbiol. 142, 1297 (1996)] és ismert genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben, mint például Knippers, Molekulare Genetik 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland (1995) vagy Winnacker, Gene und Klone, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland (1990).

Olyan mutációk, amelyek a fehérjék funkcionális tulajdonságainak megváltozásához illetve csökkenéséhez vezetnek, ismertek a szakmában; példaként megemlíthetők az alábbiak munkái [Qiu és Goodman, J. Biol. Chem. 272, 8611-8617 (1997); Sugimoto et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1760-1762 (1997) és Möckel, Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Deutschland (1994)]. Összefoglaló ismertetések hozzáférhetők ismert genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben, mint például Hagemann, Allgemeine Genetik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986).

Mutációként tranzíciók, transzverziók, inszerciók és deléciók jönnek számításba. Az aminosav cseréknek az enzimaktivitásra gyakorolt hatásával összefüggésben mis-szenz mutációkról vagy nem szenz mutációkról beszélünk. Egy génben legalább egy bázis-pár inszerciója vagy deléciója keret eltolásos mutációhoz (frame

shift mutation) vezet, amelynek következtében rossz aminosav épül be vagy a transzláció idő előtt megszakad. Ilyen típusú mutációk létrehozására szolgáló leírások ismertek a szakmában és genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben hozzáférhetők [Knippers, Molekulare Genetik 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland (1995); Winnacker, Gene und Klone, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland (1990) vagy Hagemann, Allgemeine Genetik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1986)]. Módszereket PCR segítségével létrehozott mutációkra az alábbi publikációban találhatunk [Newton C.R., Graham A. PCR 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1997)].

Egy példa olyan plazmidra, amelynek segítségével végrehajtható az *rplK* gén deléciós mutagenezise, az 1. ábrán bemutatott $p\Delta rplK$ plazmid.

A $p\Delta rplK$ plazmid a Jäger és munkatársai által leírt [J. Bacteriol. 174, 5462-5465 (1992)] *pK18mobsacB* plazmidból áll, amelybe az *rplK* gén egy alléljét - 3. számú szekvencia - építettük be. A $\Delta rplK$ jelű allél 12 bp hosszúságú deléciót tartalmaz a gén 5'-területén. Az L11 fehérje $\Delta rplK$ allél által kódolt változatát a 4. számú szekvenciában mutatjuk be. Az L11 fehérje bemutatott változata a „prolin-alanin-leucin-glicin” tetrapeptid hiányában tér el az L11 fehérje vad típusú formájától, amely a 2. számú szekvencia 30-33. pozícióinak felel meg. A $p\Delta rplK$ plazmid homológ rekombinációja a kromoszómális *rplK* gén $\Delta rplK$ allélre történő kicserélődéséhez vezet. Az inszerciós mutagenezisre leírásokat és magyarázatokat találunk például az alábbi hivatkozásokban [Schwarzer and Pühler,

Bio/Technol. 9, 84-87 (1991) vagy Fitzpatrick et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 575-580 (1994)].

L-aminosavak, különösen L-lizin termeléséhez kiegészítésként előnyös lehet még az rplK gén legyengítése mellett a mindenkori bioszintézis útvonal egy vagy több enzimjének felerősítése, különösen túlzott kifejezése.

Így például L-lizin előállításához előnyös lehet egyidejűleg

- a dihidro-dipikolinát szintetázt kódoló dapA gént (EP-B 0 197 335),
- egy feed back rezisztens aszpartát kinázt kódoló lysC gént [Kalinowski et al., Mol. Gen. Genet. 224, 317-324 (1990)],
- a piruvát-karboxilázt kódoló pyc gént [Eikmanns, J. Bacteriol. 174, 6076-6086 (1992)]
- a malát-kinon oxidoreduktázt kódoló mqo gént [Molenaar et al., Eur. J. Biochem. 254, 395-403 (1998)],
- a lizin kivített kódoló lysE gént (DE-A-195 48 222),
- a zwal gént (DE 199 59 328.0; DSM 13115)

tartalmazó csoportból kiválasztott egy vagy több gén felerősítése, főleg túlzott kifejezése.

Továbbá L-aminosavak termeléséhez az rplK gén legyengítése mellett előnyös lehet egyidejűleg

- a foszfoenolpiruvát-karboxikinázt kódoló pck gént (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- a glükóz-6-foszfát izomerázt kódoló pgi gént (US 09/396,478; DSM 12969),
- a piruvát-oxidázt kódoló poxB gént (DE 199 51 975.7; DSM 13114),



- a *zwa2* gént (DE 199 59 327.2; DSM 13113),
- a PPGPP-szintetáz I-et kódoló *relA* gént (EC 2.7.6.5)

tartalmazó csoportból kiválasztott egy vagy több gén legyengítése.

Továbbá L-aminosavak termeléséhez a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz gén túlzott kifejezése mellett előnyös lehet nemkívánatos mellékreakciók kikapcsolása [Nakayama, *Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms*, in: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK (1982)].

Az 1. igénypont d) pontja szerinti mutáns polinukleotidot tartalmazó mikroorganizmusok szintén a találmány tárgyát képezik és L-aminosavak, különösen L-lizin termeltetése céljából szaporíthatók folyamatosan vagy szakaszosan batch fermentációs eljárással (Satzkultivierung) vagy fed batch eljárással (Zulaufverfahren) vagy ismételt fed batch eljárással (repetitives Zulaufverfahren). Ismert tenyésztési eljárásokról összefoglalás található az alábbi tankönyvekben [Chmiel, *Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991) vagy Storhas, *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)].

Az alkalmazott tápoldatnak a mindenkori törzs igényeit kell alkalmas módon kielégítenie. Különböző mikroorganizmusok számára szaporító tápoldatok leírását tartalmazza az alábbi kézikönyv [Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA (1981)]. Szénforrásként alkalmazható cukor és szénhidrát, mint például glükóz,



szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz, olajok és zsírok, mint például szójaolaj, napraforgóolaj, földimogyoró-olaj és kókuszszsír, zsírsavak, mint például palmitinsav, sztearinsav és linolsav, alkoholok, mint például glicerin és etanol és szerves savak, mint például ecetsav. Ezek az anyagok felhasználhatók egyedül vagy keverék formájában. Nitrogénforrásként felhasználhatók szerves nitrogént tartalmazó vegyületek, mint pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukoricalekvár, szójaliszt és karbamid vagy szervetlen vegyületek, mint ammónium-szulfát, ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrások felhasználhatók egyedül vagy keverék formájában. Foszforforrásként alkalmazható foszforsav, kálium-dihidrogénfoszfát vagy dikálium-hidrogénfoszfát vagy a megfelelő nátrium tartalmú sók. A tápoldatnak tartalmaznia kell továbbá fémsókat, mint például magnézium-szulfátot vagy vas-szulfátot, amelyek szükségesek a növekedéshez. Végül a fent nevezett anyagok kiegészíthetők létfontosságú növekedést serkentő anyagokkal, mint aminosavakkal és vitaminokkal. A tápoldathoz ezenfelül megfelelő oltóanyagot adhatunk. A nevezett kiegészítő anyagok hozzáadhatók a tenyészethez egyszeri adagban vagy a szaporítás során megfelelően adagolva.

A tenyészet pH kontrolljához alkalmas módon adagolhatók bázikus vegyületek, mint nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia illetve ammónium-hidroxid vagy savas vegyületek, mint foszforsav vagy kénsav. A habképződés kontrollja céljából adagolható habzásgátló, mint például zsírsav-poliglikolészter.



Plazmidok stabilitásának fenntartásához megfelelő szelektíven ható anyagok, például antibiotikumok adagolhatók a tápoldathoz. Az aerob viszonyok fenntartásához oxigént vagy oxigént tartalmazó gázkeveréket, mint például levegőt vezetünk a tenyészethez. A tenyészet hőmérséklete normális körülmények között 20-45 °C között, előnyösen 25-40 °C között van. A tenyésztést annyi ideig folytatjuk, amíg a kívánt L-aminosav maximuma megtermelődik. Ezt a célt normális esetben 10-160 óra között érjük el.

L-aminosavak meghatározására szolgáló módszerek ismertek a szakmában. Az analízis történhet Spackman és munkatársai [Anal. Chem. 30, 1190 (1958)] leírása szerint anioncserés kromatográfiával és azt követő ninhidrines származékképzéssel, vagy reverz fázisú HPLC segítségével a Lindroth és munkatársai által leírtak szerint [Anal. Chem. 51, 1167-1174 (1979)].

A következő mikroorganizmust helyeztük letétbe a budapesti szerződésnek megfelelően a német mikroorganizmusok és sejtkultúrák gyűjteményében (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen = DSMZ, Braunschweig, Deutschland) a DSM 13158 letéti számon:

- *Escherichia coli* DH5 α /pArp1K

Példák

A találmányt a következő kiviteli példákkal világítjuk meg közelebbről.

1. példa

Genomiális kozmid génbank előállítására *Corynebacterium*



glutamicum ATCC 13032 törzsből

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 törzsből kromoszómális DNS-t izoláltunk Tauch és munkatársai leírása szerint [Plasmid 33, 168-179 (1995)] és *Sau3AI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0913-02) részlegesen hasítottuk. A DNS fragmentumokat garnélarák alkalikus foszfatázzal (shrimp alkalischer Phosphatase = SAP) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland; kódszám: 1758250) defoszforileztük. A SuperCos1 kozmidvektor DNS-ét [Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2160-2164 (1987)] (Stratagene, La Jolla, USA; SuperCos1 kozmidvektor kit, kódszám: 251301) *XbaI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0948-02) hasítottuk és szintén garnélarák alkalikus foszfatázzal defoszforileztük. Ezután a kozmid DNS-t *BamHI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0868-04) hasítottuk. Az ily módon kezelt kozmid DNS-t összekevertük a kezelt ATCC 13032 DNS-sel és az összetételt T4 DNS ligázzal (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0870-04) kezeltük. A ligációs keveréket ezután a Gigapack II XL Packing Extract (Stratagene, La Jolla, USA; kódszám: 200217) segítségével fágokba vittük be. Az *E. coli* NM 554 törzs [Raleigh et al., Nucl. Acid Res. 16, 1563-1575 (1988)] megfertőzéséhez a sejteket felvettük 10 mM $MgSO_4$ -ban és összekevertük a fáguszuszpenzió egy részletével. A fertőzést és a kozmidbank titerének meghatározását a Sambrook és munkatársai által leírtak [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)] szerint végeztük, ahol a



sejteket 100 mg/l ampicillint tartalmazó LB agarra [Lennox, Virol. 1, 190 (1955)] szélesztettük. Egy éjszakán át 37 °C-on történő inkubációt követően rekombináns egyedi klónokat szelektáltunk.

2. példa

A *zwa1* gén izolálása és szekvenálása

Egy egyedi klón kozmid DNS-ét izoláltuk a Qiaprep Spin Mini-prep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland; kódszám: 27106) segítségével a gyártó utasításai szerint és részlegesen hasítottuk *Sau3AI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0913-02). A DNS fragmentumokat garnélarák alkalikus foszfáttal (shrimp alkalischer Phosphatase = SAP) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland; kódszám: 1758250) defoszforileztük. Gélelektroforézissel történt felbontás után következett az 1500-2000 bp nagyságrendbe tartozó kozmid fragmentumok izolálása a QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland; kódszám: 20021) segítségével. Az Invitrogen cégtől beszerzett pZero-1 szekvenáló vektor (Groningen, Niederlande; Zero Background Cloning Kit, kódszám: K2500-01) DNS-ét *BamHI* restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland; kódszám: 27-0868-04) hasítottuk. A kozmid fragmentumok ligációját a pZero-1 szekvenáló vektorba a Sambrook és munkatársai által leírtak [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)] szerint végeztük, ahol a DNS keveréket T4 ligázzal (Pharmacia, Biotech, Freiburg, Deutschland) egy éjszakán át inkubáltuk. Ezt a ligációs keveréket



azután *E. coli* DH5 α MCR törzsbe [Grant, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)] juttattuk be elektroporációval [Tauch et al., FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] és 50 mg/l zeocint tartalmazó LB agarra [Lennox, Virol. 1, 190 (1955)] szélesztettük. A rekombináns klónok plazmid preparációja Biorobot 9600 (Qiagen, Hilden, Deutschland; kódszám: 900200) segítségével történt. A szekvenálást a Sanger és munkatársai által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)] didezoxi lánchasító módszer módosított változatával [Zimmermann et al., Nucl. Acid. Res. 18, 1067 (1990)] végeztük. Az RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit-et alkalmaztuk (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland; kódszám: 403044). A gélelektroforézises felbontás és a szekvenáló reakció analízise Rothiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) gélben (Roth, Karlsruhe, Deutschland; kódszám: A124.1) és az ABI Prism 377 szekvenáló berendezésben (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) történt.

A kapott nyers szekvencia adatokat azután a Staden programcsomag [Nucl. Acid. Res. 14, 217-231 (1986)] 97-0 verziójának alkalmazásával dolgoztuk fel. A pZero-1 származékok egyedi szekvenciáit összefüggő szakasszá (contig) állítottuk össze. A kódoló terület számítógépes analízisét az XNIP program [Staden, Nucl. Acid Res. 14, 217-231 (1986)] segítségével fejeztük be. További analíziseket végeztünk a BLAST kutató program [Altschul et al., Nucl. Acid Res. 25, 3389-3402 (1997)] alkalmazásával az NCBI (National Center for Biotechnology



Information, Bethesda, MD, USA) nem-redundáns adatbankjával szemben.

Az rplK gén így kapott nukleotid-szekvenciáját az 1. számú szekvenciában mutatjuk be. A nukleotid-szekvencia analízisének eredménye egy 438 bázispárból álló nyílt leolvasási keret, amelyet rplK génként jelöltünk meg. Az rplK gén 145 aminosavból álló polipeptidet kódol, amelyet a 2. számú szekvenciában mutatunk be.

3. példa

Az rplK gén egy másolatát tartalmazó vektor előállítás

C. glutamicum rplK génjét tartalmazó, 1200 bp kromoszómális DNS fragmentumot klónoztunk PCR segítségével.

Ehhez a *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 törzsből kromoszómális DNS-t izoláltunk Tauch és munkatársainak leírása szerint [Plasmid 33, 168-179 (1995)]. Polimeráz láncreakció segítségével az rplK gént tartalmazó 1200 bp nagyságú DNS fragmentumot megsokszoroztuk. Ehhez az 1. számú szekvencia alapján a következő primereket vezettük le.

P1-felfelé irányuló (lásd még az 5. számú szekvenciát):

5' -AGG AGC AGG CTG TTG TCA CC-3'

P2-lefelé irányuló (lásd a 6. számú szekvenciát):

5' -GCG GAT AGC TAC GTC GAT GG-3'

A bemutatott oligonukleotidokat az ARK Scientific cég (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany) szintetizálta és a PCR-t a Pfu-DNS polimeráz (Stratagene, La Jolla, USA) és a PTC 100-Thermocyclers (MJ Research Inc., Waltham, USA) alkalmazásával végeztük el.



A PCR-nél egy hődenaturálásból (94 °C, 90 másodperc), annealing-ből (58 °C, 90 másodperc) és polimeráz reakcióból (72 °C, 90 másodperc) álló ciklust 35-ször ismételtünk. Az így kapott 1200 bp DNS fragmentumot ezt követően Qiagen PCR Purification Spin Kits (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk meg.

Az rplK gént tartalmazó DNS amplifikátumoknak *C. glutamicum*-ban replikációra képes plazmidra történő klónozásához előállítottuk a pECM3 plazmidot, amely a Tauch és munkatársai által leírt pECM2 plazmid [FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] származéka. Ehhez a pECM2 plazmidot *Bam*HI és *Bgl*II restriktációs enzimekkel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) hasítottuk és T4 ligázzal (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) kezeltük Sambrook és munkatársai módszere szerint [Molecular cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))], amelynek eredményeképpen megkaptuk a pECM3 plazmidot. Az *Escherichia coli* DH5 α MCR törzs [Grant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)] transzformációját a pECM3 plazmiddal Tauch és munkatársai leírása szerint [FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] végeztük. A transzformátumokat klóramfenikolt (Merck, Darmstadt, Germany) tartalmazó (50 mg/l) LBG agaron (10 g tripton, 5 g élesztőkivonat, 5 g NaCl, 2 g glükóz, literenként 15 g agar) válogattuk ki.

Végül az rplK gént tartalmazó 1200 bp DNS amplifikátumot a pECM3 plazmiddal, amelyet előzőleg *Sma*I restriktációs enzimmel (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) linearizáltunk, összekevertük és T4 ligázzal (Amersham Pharmacia, Freiburg,



Germany) kezeltük, amelynek eredményeképpen megkaptuk a prp1K plazmidot. Az *Escherichia coli* DH5 α MCR törzs transzformációja a prp1K plazmiddal Tauch és munkatársai leírása [FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] alapján történt és a transzformátumokat klóramfenikolt (Merck, Darmstadt, Germany) tartalmazó (50 mg/l) LBG agaron válogattuk ki. A prp1K plazmid tehát hordozza a *C. glutamicum* teljes rplK génjét és képes mind *E. coli*-ban, mind *C. glutamicum*-ban autonóm módon replikálódni.

4. példa

Deléció beépítése az rplK génbe

PCR technikával előállítottuk az rplK génnek egy Δ rplK jelzéssel ellátott allélját, amely 12 bp hosszúságú deléciót tartalmaz. Az rplK génben létrehozott 12 bp hosszúságú deléció a *C. glutamicum* L11 fehérje N-terminális területén a „prolin-alanin-leucin-glicin” tetrapeptid hiányához vezet.

Az rplK deléciós allél létrehozásához primerként a 3. példában leírt P1-fel és P2-le primerek mellett a következőkben leírt, az ARK Scientific cég (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany) által gyártott oligonukleotidokat használtuk.

P1-lefelé irányuló (lásd még a 7. számú szekvenciát):

5' -extenzió-CGC CGT GAG C-5' -oldal-GCC AAC TGG AGG AGC AGG GT-3'

P2-felfelé irányuló (lásd a 8. számú szekvenciát):

5' -extenzió-TCC AGT TGG C-5' -oldal-GCT CAC GGC GTC AAC ATC AG-3'

A PCR-hez alkalmazott primereket az ismert DNS szekvenciából vezettük le. Ezeknek mindegyike tartalmaz egy 10 bp hosszúságú 5' -extenziót, amely pontosan komplementer a P1-fel és P2-le



primerek 5'-részével. A *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsből kivontuk a kromoszómális DNS-t és azzal mint mátrixszal a megadott oligonukleotidok – P1-le, P2-fel és P2-le –, a Pfu-DNS polimeráz (Stratagene, La Jolla, USA) és a PTC 100-Thermocyclers (MJ Research Inc., Waltham, USA) alkalmazása mellett, egymástól elkülönített PCR reakciókban két 600 bp hosszúságú DNS fragmentumot hoztunk létre. Ezeknél a PCR reakciónál egy hődenaturálásból (94 °C, 90 másodperc), annealing-ből (58 °C, 90 másodperc) és polimeráz reakcióból (72 °C, 90 másodperc) álló ciklust 35-ször ismételtünk.

Az első 600 bp DNS amplifikátumot, amelyet rplK-1.rész-nek jelölünk, a P1-fel és P1-le oligonukleotidokkal kaptuk. Ez tartalmazza az rplK gén 5'-területét (1-87. nukleotidok) és még a P1-le oligonukleotidból származó 10 bp extenziót, amely megfelel az rplK gén 100-109. nukleotidjainak (1. számú szekvencia). Tehát ez a megsokszorozot rplK génterület az alkalmazott kromoszómális DNS templáthoz viszonyítva 12 bp hézagot tartalmaz. A második 600 bp DNS fragmentumot, rplK-2.részt, a P2-le és P2-fel oligonukleotidokkal kaptuk és tartalmazza az rplK gén 3'-területét (78-435. nukleotidok) hordozza az azonos hézagot (88-99. nukleotidok) a megsokszorozott rplK génterületen belül. Ennek következtében a két 600 bp DNS amplifikátum felmutat egy 20 bp hosszúságú, egymással átlapoló DNS területet. Mindkét 600 bp hosszúságú PCR terméket, rplK-1.részt és rplK-2.részt felhasználtuk egy további PCR reakcióban együttesen DNS templátként, ahol az rplK-1.rész „irányba mutató” szála és az rplK-2.rész „visszafelé mutató”



szála egymással átlapoló, komplementer DNS területeinek köszönhetően össze tudott kapcsolódni. Ennek az egymással átlapoló DNS területnek az extenziója illetve a P1-fel és P2-le oligonukleotidok hozzáadása egy 1200 bp hosszúságú PCR amplifikátum létrehozásához vezetett, amely a *C. glutamicum* rplK gén 12 bp deléciót hordozó származéka. Ezeknél a PCR reakciónál egy hődenaturálásból (94 °C, 90 másodperc), annealing-ből (58 °C, 90 másodperc) és polimeráz reakcióból (72 °C, 90 másodperc) álló ciklust 35-ször ismételtünk.

A Δ rplK allél nukleotid-szekvenciája a 3. számú szekvencia és ezen allél kódolta L11 fehérje változat szekvenciája a 4. számú szekvencia. Ebből az L11 fehérje változathoz hiányzik a „prolin-alanin-leucin-glicin” tetrapeptid, amely a 2. számú szekvenciában bemutatott L11 fehérje vad típusában a 30-33. aminosav pozícióknak felel meg.

5. példa

A Δ rplK allél beépítése a kromoszómába

Az rplK génben 12 bp deléciót tartalmazó Δ rplK allélt integrációs mutagenézissel, a Schäfer és munkatársai által leírt sacB rendszer [Gene 14, 69-73 (1994)] segítségével építettük be *C. glutamicum* kromoszómájába. Ez a rendszer lehetővé teszi a szakember számára homológ rekombinációval végbemenő allél kicserélődések azonosítását illetve szelekcióját.

1. A p Δ rplK csere vektor összeállítása

A 4. példában kapott Δ rplK, 1200 bp rplK-deléciós allélt a Qiagen PCR Purification Spin Kits (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével megtisztítottuk és a Schäfer és munkatársai által

leírt pK18mobsacB [Gene 14, 69-73 (1994)] mobilizálható klónozó vektorral ligációhoz készítettük elő. Ez utóbbit előzőleg a *Sma*I restrikciós enzimmal (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) linearizáltuk, összekevertük az rplK-deléciós alléllal és T4-DNS ligázzal (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) kezeltük. Ennek eredménye lett a p Δ rplK plazmid.

Az *E. coli* DH5 α törzs transzformációját a p Δ rplK plazmiddal Tauch és munkatársai leírása [FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347 (1994)] alapján végeztük el. A transzformátumokat kanamicint (Merck, Darmstadt, Germany) tartalmazó (50 mg/l) LBG agaron válogattuk ki. Ily módon jött létre a DH5 α /p Δ rplK törzs.

Kiválasztottunk egy klónt, amelyet ATCC13032 Δ rplK jelöléssel láttunk el.

2. Az allél-csere kivitelezése

C. glutamicum rplK génjében kromoszómális 12 bp deléciót hajtottunk végre a Schäfer és munkatársai által leírt sacB rendszer [Gene 14, 69-73 (1994)] segítségével történt integrációs mutagenézissel. Ez a rendszer lehetővé teszi a szakember számára homológ rekombinációval végbemenő allél kicserélődések azonosítását illetve szelekcióját.

A mobilizálható p Δ rplK plazmidot az *E. coli* S17-1 donor törzsből [Simon et al., Bio/Technol. 1, 784-794 (1993)] kiindulva a Schäfer és munkatársai által leírt [J. Bacteriol. 172, 1663-1666 (1990)] konjugációs módszerrel a *C. glutamicum* ATCC 13032 törzsbe mint recipiensbe vittük át. Mivel a p Δ rplK plazmid *C. glutamicum*-ban nem képes replikálódni, telepítése *C. glutamicum* kromoszómájába csak a plazmid kódolta rplK deléciós fragmentum

és az azonos, kromoszómális *rplK* génterület közé, homológ rekombináció útján történő integrációval lehetséges. A transz-konjugátumokat kanamicinnel (25 mg/l) (Merck, Darmstadt, Germany) és nalidixsavval (50 mg/l) (Merck, Darmstadt, Germany) kiegészített LBG agaron válogattuk ki.

A $p\Delta rplK$ plazmid ezt követő kivágására a *sacB* rendszer segítségével csak *rplK* egy vad típusú allélje jelenlétében lehetett válogatást végezni. Ehhez a 3. példában összeállított, a teljes *rplK* gént hordozó *prplK* plazmidot vittük át az integrációs törzsbe elektroporációval Liebl és munkatársai módszere [FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-304 (1989)] szerint. A törzs szelekciója kanamicinnel (25 mg/l) (Merck, Darmstadt, Germany) és klóramfenikollal (10 mg/l) (Merck, Darmstadt, Germany) kiegészített LBG agaron történt.

Egy kiválasztott transzformált telepet 100 ml LBG folyékony tápoldatba (250 ml-es Erlenmeyer lombikba) oltottuk át és 24 órán keresztül 30 °C-on 300 fordulat/perc rázatással inkubáltuk. Végül ebből a 2×10^6 sejt/ml koncentrációjú folyékony tenyészetből 10% szacharózt tartalmazó LBG agarra (Merck, Darmstadt, Germany) szélesztettünk és 48 órán keresztül 30 °C-on inkubáltuk. Azok a *C. glutamicum* sejtek, amelyek képesek voltak ezen a táptalajon növekedni, a beépült $p\Delta rplK$ plazmidot elveszítették az *rplK* deléció allél és a természetes *rplK* régió között bekövetkezett második rekombinációs esemény következtében. Ez a második rekombinációs esemény vagy a természetes kromoszómális *rplK* gén elrendezés visszallításához vezet, vagy olyan *C. glutamicum* $\Delta rplK$ mutánst eredményez, amely elvesztette a 12 bp

N-terminális DNS fragmentumot. Kiválasztott „szacharóz rezisztens” és potenciális p Δ rplK hordozó *C. glutamicum* sejtekből kivontuk a kromoszómális DNS-t. Ez szolgált mátrixként, amellyel az rplK szekvencia felhasználásával a Pdel-fel és Pdel-le irányuló oligonukleotidokat (ARK Scientific GmbH Biosystems, Darmstadt, Germany) levezettük. A primerekkel, a Pfu-DNS polimeráz (Stratagene, La Jolla, USA) és a PTC 100-Thermocyclers (MJ Research Inc., Waltham, USA) alkalmazásával elvégeztük a PCR kísérleteket. A PCR-nél egy hődenaturálásból (94 °C, 90 másodperc), annealing-ből (58 °C, 90 másodperc) és polimeráz reakcióból (72 °C, 90 másodperc) álló ciklust 35-ször ismételtünk. Végül az így kapott megsokszorozott DNS-t (DNS amplifikátumot) Qiagen PCR Purification Spin Kits (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk meg.

A megtisztított DNS amplifikátumok nukleotid-szekvenciájának analízise, amelyet a korábban leírtak szerint végeztük el, azt mutatta, hogy az esetek 43%-ában olyan DNS amplifikátum jött létre, amelyből hiányzott a 12 bp DNS terület. Ennek következtében a hozzájuk tartozó, p Δ rplK plazmidot hordozó transzkonjugátumokban a második rekombinációs esemény az rplK génben kromoszómális 12 bp delécióhoz vezetett.

Végül egy kiválasztott, deléciót hordozó transzkonjugátumból a Schäfer és munkatársai által leírt „Plasmid-Curings” módszer [*J. Bacteriol.* 176, 7309-7319 (1994)] szerint eltávolítottuk a prplK plazmidot. Az így kapott *C. glutamicum* ATCC13032 Δ rplK törzs tehát egy kromoszómális 12 bp deléciót hordoz az rplK

géneken belül, amely az L11 fehérje „prolin-alanin-leucin-glicin” tetrapeptidjének elvesztését eredményezi.

Az 5. példában kapott *C. glutamicum* ATCC13032 Δ rplK törzset lizin termeléséhez alkalmas tápoldatban szaporítottuk és meghatároztuk a tenyészet felülúszójának lizintartalmát.

6. példa

Lizin előállítás

Ehhez a törzset először agarlemezen (agy-szív agar) inkubáltuk 33 °C-on 24 órán keresztül. Ebből az agarlemez tenyészetből kiindulva inokulumot oltottunk be (10 ml tápoldat 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban). Az inokulum tápközegeként a CgIII teljes táptalajt (10 g/l Bacto pepton, 10 g/l élesztőkivonat, 2,5 g/l NaCl, 20 g/l glükóz, pH 7,4) használtuk. Az inokulumot 48 órán át 33 °C-on 240 rpm mellett rázógépen inkubáltuk. Ezzel az inokulummal oltottuk be a fő tenyészetet oly módon, hogy a kezdeti OD érték (660 nm-en) 0,1 legyen. A fő tenyészethez MM tápközeget használtunk.

Az MM tápoldat összetétele:

CSL (corn steep liquor = kukoricalékvár)	5 g/l
MOPS (morfolino-propánszulfonsav)	20 g/l
glükóz (lebontott, autoklávozott)	50 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0,1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l

MnSO ₄ x H ₂ O	5,0 mg/l
biotin (sterilre szűrt)	0,3 mg/l
tiamin x HCl (sterilre szűrt)	0,2 mg/l
CaCO ₃	25 g/l

A CSL, MOPS és a sóoldat pH-ját ammóniával 7-re állítottuk és autoklávoztuk. Ezután hozzáadtuk a steril szubsztrát és vitamin oldatokat, valamint a szárazon sterilezett CaCO₃-ot.

A tenyésztés 10 ml térfogatban, 100 ml-es Erlenmeyer lombikokban rázatással történt. A tenyésztést 33 °C-on 80%-os páratartalomnál végeztük.

48 óra elteltével 660 nm-en megmértük az optikai denzitást (OD) Biomek 1000 készülékkel (Beckmann Instruments GmbH, München). A képződött lizin mennyiségét aminosav analízátorral (Eppendorf-BioTronik, Hamburg, Deutschland) mértük ioncserés kromatográfiát követő ninhidrines származékképzéssel.

Az 1. táblázat mutatja a kísérleti eredményeket.

1. táblázat

Törzs	OD (660 nm)	Lizin-HCL (g/l)
ATCC13032 Δ rp1K	13,0	0,98
ATCC13032	13,8	0,0

Az ábrák leírása

1. ábra: a p Δ rp1K plazmid restrikciós térképe

Az alkalmazott rövidítések és jelölések jelentése:

pdeltarp1K: p Δ rp1K

sacB: a leván-szacharáz enzimet kódoló sacB gén *Bacillus subtilis*-ből

lacZ-alpha: a β -galaktozidáz gén 5' végének része

ori V: V replikációs origó

KmR: kanamicin rezisztencia

RP4 mob: az RP4 plazmid mob-régiója

BamHI: a BamHI restrikciós enzim hasítási helye

EcoRI: az EcoRI restrikciós enzim hasítási helye

Δ rp1K: rp1K allél 12 bp delécióval az N-terminális területen

Szekvenciák jegyzéke

AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZ: 835 bázispár
 (B) TÍPUS: DNS
- (vi) EREDETI FORRÁS:
 (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*
- (ix) JELLEMZŐK:
 (A) NÉV/KULCS: CDS
 (B) ELHELYEZKEDÉS: 201..635
 (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: rplK gén
- (xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

```

ttgctgttag ggtagacaat cgcgtgtttt ttaagcatgc tcaaatcat tcatccccgg 60
tggccccggtt acgtaaagat cagcaaagat gatcaactaa agcgatcatc tgaagttgta 120
30 gcgggaccga gcatccggac ggttactagt ggggtttcat cgtcccagtt gtggccggta 180
acaaggaagc aggtttaacg atg gct cct aag aag aag aag aag gtc act ggc 233
35 Met Ala Pro Lys Lys Lys Lys Lys Val Thr Gly
      1                    5                    10

ctc atc aag ctc cag atc cag gca gga cag gca aac cct gct cct cca 281
Leu Ile Lys Leu Gln Ile Gln Ala Gly Gln Ala Asn Pro Ala Pro Pro
      15                    20                    25

40 gtt ggc cca gca ctt ggt gct cac ggc gtc aac atc atg gaa ttc tgc 329
Val Gly Pro Ala Leu Gly Ala His Gly Val Asn Ile Met Glu Phe Cys
      30                    35                    40

45 aag gct tac aac gct gcg act gaa aac cag cgc ggc aac gtt gtt cct 377
Lys Ala Tyr Asn Ala Ala Thr Glu Asn Gln Arg Gly Asn Val Val Pro
      45                    50                    55

50 gtt gag atc acc gtt tac gaa gac cgt tca ttc gac ttc aag ctg aag 425
Val Glu Ile Thr Val Tyr Glu Asp Arg Ser Phe Asp Phe Lys Leu Lys
      60                    65                    70                    75

act cct cca gct gca aag ctt ctt ctg aag gct gct ggc ctg cag aag 473
Thr Pro Pro Ala Ala Lys Leu Leu Leu Lys Ala Ala Gly Leu Gln Lys
55      80                    85                    90

ggc tcc ggc gtt cct cac acc cag aag gtc ggc aag gtt tcc atg gct 521
Gly Ser Gly Val Pro His Thr Gln Lys Val Gly Lys Val Ser Met Ala
      95                    100                    105

60 cag gtt cgt gag atc gct gag acc aag aag gaa gac ctg aac gct cgc 569
Gln Val Arg Glu Ile Ala Glu Thr Lys Lys Glu Asp Leu Asn Ala Arg
      110                    115                    120

```

gat atc gac gct gct gcg aag atc atc gct ggt acc gct cgt tcc atg 617
 Asp Ile Asp Ala Ala Ala Lys Ile Ile Ala Gly Thr Ala Arg Ser Met
 125 130 135

5 ggc atc acc gtc gaa ggc taaaagcttt cacaccggtt agtggctcat 665
 Gly Ile Thr Val Glu Gly
 140 145

10 tcaaaatgaa tggccaccaa ccaattttca ccaaagtttt atgtggcagg gccagctccg 725
 gcccgtaaaa ccacagaatt ccatgaaagg gaatttctaa tgagcaagaa ctctaaggcg 785
 taccgcgagg ccgctgagaa gatcgacgct ggtcgcacatc actccccact 835

A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 145 aminosav

(B) TÍPUS: fehérje

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Ala Pro Lys Lys Lys Lys Lys Val Thr Gly Leu Ile Lys Leu Gln
 1 5 10 15

25 Ile Gln Ala Gly Gln Ala Asn Pro Ala Pro Pro Val Gly Pro Ala Leu
 20 25 30

Gly Ala His Gly Val Asn Ile Met Glu Phe Cys Lys Ala Tyr Asn Ala
 35 40 45

30 Ala Thr Glu Asn Gln Arg Gly Asn Val Val Pro Val Glu Ile Thr Val
 50 55 60

35 Tyr Glu Asp Arg Ser Phe Asp Phe Lys Leu Lys Thr Pro Pro Ala Ala
 65 70 75 80

Lys Leu Leu Leu Lys Ala Ala Gly Leu Gln Lys Gly Ser Gly Val Pro
 85 90 95

40 His Thr Gln Lys Val Gly Lys Val Ser Met Ala Gln Val Arg Glu Ile
 100 105 110

Ala Glu Thr Lys Lys Glu Asp Leu Asn Ala Arg Asp Ile Asp Ala Ala
 115 120 125

45 Ala Lys Ile Ile Ala Gly Thr Ala Arg Ser Met Gly Ile Thr Val Glu
 130 135 140

50 Gly
 145

A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 825 bázispár

(B) TÍPUS: DNS

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(ix) JELLEMZŐK:

(A) NÉV/KULCS: CDS

(B) ELHELYEZKEDÉS: 200..622

(D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: Δ rp1K

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

65 tgcgtgtagg gtagacaatc gcgtgttttt taagcatgct caaatcatt catccccggt 60
ggccccggtta cgtaaagatc agcaaagatg atcaactaaa gcgatcatct gaagttgtag 120
cgggaccgag catccggacg gttactagtg gggtttcate gtcccagttg tggccggtaa 180

5 caaggaagca ggtttaacg atg gct cct aag aag aag aag aag gtc act ggc 232
Met Ala Pro Lys Lys Lys Lys Lys Val Thr Gly
1 5 10

10 ctc atc aag ctc cag atc cag gca. gga cag gca aac cct gct cct cca 280
Leu Ile Lys Leu Gln Ile Gln Ala Gly Gln Ala Asn Pro Ala Pro Pro
15 20 25

gtt ggc gct cac ggc gtc aac atc atg gaa ttc tgc aag gct tac aac 328
Val Gly Ala His Gly Val Asn Ile Met Glu Phe Cys Lys Ala Tyr Asn
15 30 35 40

gct gcg act gaa aac cag cgc ggc aac gtt gtt cct gtt gag atc acc 376
Ala Ala Thr Glu Asn Gln Arg Gly Asn Val Val Pro Val Glu Ile Thr
20 45 50 55

gtt tac gaa gac cgt tca ttc gac ttc aag ctg aag act cct cca gct 424
Val Tyr Glu Asp Arg Ser Phe Asp Phe Lys Leu Lys Thr Pro Pro Ala
60 65 70 75

25 gca aag ctt ctt ctg aag gct gct ggc ctg cag aag ggc tcc ggc gtt 472
Ala Lys Leu Leu Leu Lys Ala Ala Gly Leu Gln Lys Gly Ser Gly Val
80 85 90

30 cct cac acc cag aag gtc ggc aag gtt tcc atg gct cag gtt cgt gag 520
Pro His Thr Gln Lys Val Gly Lys Val Ser Met Ala Gln Val Arg Glu
95 100 105

35 atc gct gag acc aag aag gaa gac ctg aac gct cgc gat atc gac gct 568
Ile Ala Glu Thr Lys Lys Glu Asp Leu Asn Ala Arg Asp Ile Asp Ala
110 115 120

gct gcg aag atc atc gct ggt acc gct cgt tcc atg ggc atc acc gtc 616
Ala Ala Lys Ile Ile Ala Gly Thr Ala Arg Ser Met Gly Ile Thr Val
125 130 135

40 gaa ggc taaaagcttt cacaccggtt agtggctcat tcaaatgaa tggccaccaa 672
Glu Gly
140

45 ccaattttca ccaagtttt atgtggcagg gccagctccg gcccgtaaa ccacagaatt 732
 ccatgaaag gaatttctaa tgagcaagaa ctctaaggcg taccgagagg ccgctgagaa 792
 50 gatcgagct ggtcgcacatct actccccact cga 825

A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 141 aminosav

(B) TÍPUS: fehérje

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

	Met	Ala	Pro	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Thr	Gly	Leu	Ile	Lys	Leu	Gln
	1				5					10					15	
60	Ile	Gln	Ala	Gly	Gln	Ala	Asn	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Gly	Ala	His	Gly
				20					25					30		
	Val	Asn	Ile	Met	Glu	Phe	Cys	Lys	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ala	Thr	Glu	Asn
65			35					40					45			
	Gln	Arg	Gly	Asn	Val	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Thr	Val	Tyr	Glu	Asp	Arg
			50				55					60				
5	Ser	Phe	Asp	Phe	Lys	Leu	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu
	65					70					75					80
	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Gln	Lys	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	His	Thr	Gln	Lys
					85					90					95	
10	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Met	Ala	Gln	Val	Arg	Glu	Ile	Ala	Glu	Thr	Lys
				100					105					110		
	Lys	Glu	Asp	Leu	Asn	Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Ala	Ala	Ala	Lys	Ile	Ile
			115					120					125			
15	Ala	Gly	Thr	Ala	Arg	Ser	Met	Gly	Ile	Thr	Val	Glu	Gly			
		130					135					140				

AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZ: 20 bázispár
 - (B) TÍPUS: DNS
- (vi) EREDETI FORRÁS:
 - (A) mesterséges szekvencia
- (ix) JELLEMZŐK:
 - (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: primer P1-fel
- (xi) AZ 5. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
 - aggagcaggc tgttgcacc

A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZ: 20 bázispár
 - (B) TÍPUS: DNS
- (vi) EREDETI FORRÁS:
 - (A) mesterséges szekvencia
- (ix) JELLEMZŐK:
 - (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: primer P2-le
- (xi) A 6. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
 - gcggatagct acgtcgatgg

A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZ: 30 bázispár
 - (B) TÍPUS: DNS
- (vi) EREDETI FORRÁS:
 - (A) mesterséges szekvencia
- (ix) JELLEMZŐK:
 - (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: primer P1-le
- (xi) A 7. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
 - cgccgtgagc gcccaactgga ggagcagggt

A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZ: 30 bázispár
 - (B) TÍPUS: DNS

- (vi) EREDETI FORRÁS:
 - (A) mesterséges szekvencia

- (ix) JELLEMZŐK:
 - (D) EGYÉB INFORMÁCIÓ: primer P2-fel

- (xi) A 8. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

tccagttggc gctcacggcg tcaacatcag

Szabadalmi igénypontok

1. Coryneform baktériumokból izolált polinukleotid, amely a következőket tartalmazó csoportból választott polinukleotid-szekvenciát tartalmaz:

a) polinukleotid, amely legalább 70%-ban azonos a 2. számú szekvenciában található aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódoló polinukleotiddal;

b) polinukleotid, amely a 2. számú aminosav-szekvenciával legalább 70%-ban azonos aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptidet kódol;

c) polinukleotid, amely az a) vagy b) polinukleotidokkal komplementer és

d) polinukleotid, amely az a), b) vagy c) polinukleotid-szekvenciának legalább 15 egymást követő bázisát tartalmazza.

2. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amelynél a polinukleotid replikációra képes, előnyösen rekombináns DNS.

3. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid, amelynél a polinukleotid RNS.

4. A 2. igénypont szerinti polinukleotid, amely az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleinsav-szekvenciát tartalmazza.

5. A 2. igénypont szerinti polinukleotid-szekvencia, amely a 2. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol.

6. Az 1. igénypont, különösen a d) pont szerinti polinukleotid, amely a 3. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát tartalmazza.

7. Az 1. igénypont, különösen a d) pont szerinti polinukleotid, amely a 4. számú szekvenciában bemutatott aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet kódol.

8. A 2. igénypont szerinti replikációra képes DNS, amely

i) az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvenciát, vagy

ii) legalább egy, az i) szekvenciának a genetikai kód degeneráltságán belül megfelelő szekvenciát, vagy

iii) legalább egy, az i) vagy ii) szekvenciával komplementer szekvenciával hibridizáló szekvenciát, és adott esetben

iv) i)-ben működésre semleges szenz mutációkat tartalmaz.

9. Az 1. igénypont szerinti polinukleotidot tartalmazó vektor, amelyet *E. coli* DH5 α /p Δ rplK törzsben, DSM 13158 letéti számon helyeztünk el és amelyet a 3. számú szekvenciában és az 1. ábrán mutatunk be.

10. Gazdaszervezetként szolgáló coryneform baktériumok, amelyek az rplK génben deléciót vagy inszerciót tartalmaznak.

11. Eljárás L-aminosavak, különösen L-lizin előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket végezzük,

a) a kívánt L-aminosavat termelő olyan baktériumok fermentációját, amelyekben legalább az rplK gént legyengítettük,

b) a kívánt L-aminosav feldúsítását a tápoldatban vagy a baktériumok sejtjeiben, és

c) az L-aminosav izolálását.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben kiegészítésként

felerősítjük a kívánt L-aminosav bioszintézis útvonalának további génjeit.

13. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a kívánt L-aminosav képződését csökkentő anyagcsere-útvonalakat legalább részben kikapcsoljuk.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont - különösen 1.a)-1.d)- szerinti polinukleotid kifejeződését csökkentjük.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont - különösen 1.a)-1.d)- szerinti polinukleotid által kódolt polipeptidek (enzimfehérjék) katalitikus tulajdonságait csökkentjük.

16. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a legyengítéshez a p Δ rp1K plazmid - 1. ábra, DSM 13158 - alkalmazásával inszerciós mutagenezist hozunk létre.

17. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy L-aminosavak, különösen L-lizin előállításához olyan baktériumokat fermentálunk, amelyekben egyidejűleg

17.1 a dihidro-dipikolinát szintetázt kódoló dapA gént,

17.2 egy feed back rezisztens aszpartát kinázt kódoló gént,

17.3 az S-(2-aminoetil)-cisztein rezisztenciát közvetítő DNS fragmentumot,

17.4 a piruvát karboxilázt kódoló pyc gént,

17.5 a pyc gént [Eikmanns, J. Bacteriol. (1992)],

17.6 a malát:kinon oxidoreduktázt kódoló mqo gént,

17.7 a lizin kivített kódoló lysE gént,

17.8 a zwa1 gént

tartalmazó csoportból választott egy vagy több gént túlzottan kifejezünk.

18. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy L-aminosavak, különösen L-lizin előállításához olyan baktériumokat fermentálunk, amelyekben egyidejűleg

18.1 a foszfoenolpiruvát-karboxikinázt kódoló pck gént,

18.2 a glükóz-6-foszfát izomerázt kódoló pgi gént,

18.3 a piruvát-oxidázt kódoló poxB gént,

18.4 a zwa2 gént,

18.5 a PPGPP-szintetáz I-et kódoló relA gént

tartalmazó csoportból kiválasztott egy vagy több gént legyengítünk.

19. Az előző igénypontok közül egynek vagy többnek megfelelő eljárás, azzal jellemezve, hogy *Coryneform glutamicum* fajba tartozó mikroorganizmusokat használunk.

20. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid-szekvenciák felhasználása primerként olyan gének DNS-ének polimeráz láncreakcióval történő előállítására, amelyek az rplK génnek megfelelő hatást fejtenek ki.

21. Az 1. igénypont szerinti polinukleotid-szekvenciák felhasználása hibridizációs szondaként.

A meghatalmazott:

Parragh Gábor
Parragh Gáborné dr.
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja

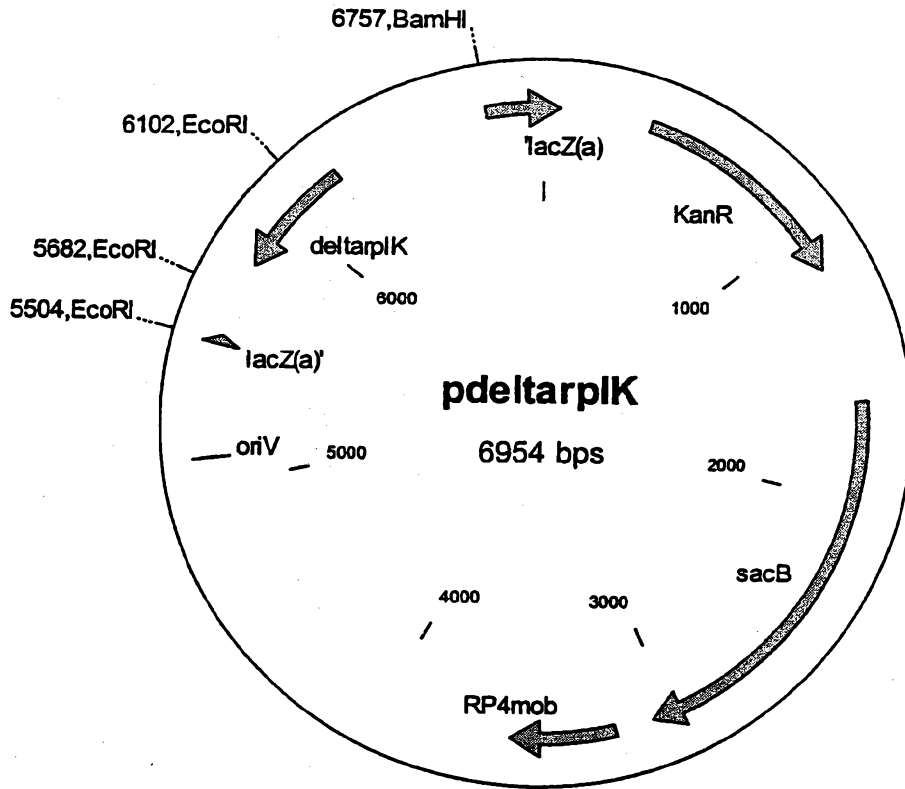
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

41 oldal

1 d l e oldal

42 oldal

F. E. E. E. E.



1. ábra