

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 295 438

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998-4189  
(22) Přihlášeno: 17.06.1997  
(30) Právo přednosti: 27.06.1996 US 1996/673814  
(40) Zveřejněno: 14.07.1999  
(Věstník č. 07/1999)  
(47) Uděleno: 07.06.05  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 17.08.2005  
(Věstník č. 8/2005)  
(86) PCT číslo: PCT/US1997/010236  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1997/049416

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. ?

A 61 K 35/74 A 61 P 31/00  
A 61 K 39/02  
A 61 K 39/102  
C 12 N 15/00  
C 12 N 15/03  
C 12 N 15/11  
C 12 N 1/20  
C 12 N 1/21

(73) Majitel patentu:

VIRGINIA TECH INTELLECTUAL PROPERTIES,  
INC., Blacksburg, VA, US

(72) Původce:

Inzana Thomas J., Blacksburg, VA, US  
Ward Christine, Irving, TX, US

(74) Zástupce:

Marta Gabrielová, tř. Politických vězňů 7, Praha 1,  
11000

(54) Název vynálezu:

**Vakcína a způsob její výroby**

(57) Anotace:

Řešení se týká vakcíny proti nemocem způsobeným zapouzdřenými organismy sestávající z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, postrádající sekvence DNA kódující syntézu pouzdra. Tato vakcína proti nemocem způsobeným normálně zapouzdřenými organismy se připravuje genetickou modifikací těchto organismů delecí genů kódujících syntézu pouzdra nebo jeho části dostatečné k tvorbě nezapouzdřeného mutantu tohoto organismu. Živý, oslabený kmen *Actinobacillus pleuropneumoniae* geneticky modifikovaný velkou delecí v chromozomální oblasti DNA kódující syntézu pouzdra je bezpečnou a účinnou vakcínou proti prasečí pleuropneumonii.

CZ 295438 B6

## Vakcína a způsob její výroby

### Oblast techniky

5

Vynález se obecně týká vakcín používaných ve veterinárních aplikacích a obzvláště živých, rekombinantních, oslabených vakcín pro chorobné stavy, které jsou způsobované organismy, jež obsahují pouzdra, kde přítomnost pouzdra je vyžadována pro virulenci, avšak nikoli pro imunitní ochranu, a způsobu její výroby. Vynález má specifické aplikace pro rekombinantně produkovanou vakcínu, která byla připravena tak, že postrádá pouzdro.

10

### Dosavadní stav techniky

15 Vakcíny jsou přípravky používané k prevenci specifických nemocí u zvířat a lidí tím, že vyvolávají jejich imunitu. To se provádí tak, že pacient je vystaven antigenu konkrétní choroby, což vede k tomu, že imunitní systém pacienta produkuje velká množství protilátek. Přítomnost protilátek v pacientově krvi chrání pacienta před pozdějšími útoky agens, které způsobuje chorobu. Vakcíny mohou být buď složeny z podjednotek tohoto agens, nebo ze živého nebo usmrčeného  
20 agens samého. Tak například, proti poliomyelitidě, běžně označované jako „polio“, je běžnou obranou buď orální podání živé, oslabené vakcíny polioviru, což je běžná praxe pro ošetřování dětí, nebo podání usmrčené nebo inaktivované vakcíny polioviru, což je běžná praxe pro ošetřování dospělých, u kterých je obecně vyšší nebezpečí získání polio z živé vakcíny. Jestliže se má použít živá vakcína, její virulence se musí nějakým způsobem oslabit, jinak virus obsažený ve  
25 vakcíně způsobí nemoc, proti které by měl chránit.

Řada nemocí je způsobována zapouzdřenými bakteriemi, přičemž pouzdro, které představuje jakoby pryskyřičná vrstva polysacharidů nebo polypeptidů pokrývající vnější buněčné stěny těchto bakterií, je potřebné pro patogenezí. Jedním takovým příkladem je prasečí pleuropneumonie a virulentní faktory *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bakterie, která způsobuje nemoc, zahrnuje pouzdřový (kapsulární) polysacharid, endotoxin a proteinové exotoxiny. Prasečí pleuropneumonie, současný zánět pohrudnice a plic, je jednou z hlavních chorob dýchacích cest dopadajících na chov prasat na celém světě. Roční ztráty tohoto odvětví jen ve Spojených státech dosahují  
30 výše milionů dolarů.

35

US patent č. 5 429 818 (Inzana) uvádí, že nezapouzdřené mutanty *Actinobacillus pleuropneumoniae* jsou avirulentní a schopné poskytnout vynikající ochranu proti následné expozici virulentní bakterie. Nezapouzdřené mutanty popsané Inzanou byly připravené etylmetansulfonátovou mutagenezí. Avšak tyto postupy mají své nevýhody spočívající v tom, že některé spontánně nebo  
40 chemicky vytvářené mutanty nejsou stabilní a povaha mutace (mutací) není známá.

40

Cílem tohoto vynálezu je připravit bezpečnou a účinnou, živou, oslabenou rekombinantní vakcínu proti nemocím způsobeným bakteriemi a houbami, jež jsou obvykle zapouzdřené a kde pouzdro je potřebné pro virulenci, nikoli však pro imunitní ochranu.

45

Dalším cílem tohoto vynálezu je upravit genetickým inženýrstvím určité bakterie nebo houby takovým způsobem, aby jim chybělo pouzdro, takže budou avirulentní a bude známá genetická povaha mutace.

50

Hlavním cílem tohoto vynálezu je dále poskytnout bezpečnou, účinnou, živou, oslabenou rekombinantní vakcínu proti pleuropneumonii.

Podstata vynálezu

5 Předmětem předloženého vynálezu je vakcína, jejíž podstata spočívá v tom, že sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, postrádající DNA sekvence, kódující syntézu pouzdra.

10 Dalším význakem předmětného vynálezu je vakcína, jež sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, jež má DNA sekvence kódující syntézu pouzdra lokalizované před hybridizačním místem BamHI-XbaI fragmentu v pCW-1C, postrádající tyto sekvence.

15 Význakem předmětného vynálezu je dále vakcína jež sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, která má DNA sekvence kódující syntézu pouzdra lokalizované před genem na export pouzdra, postrádající tyto sekvence. Genem na export pouzdra je cpxD.

20 Předmětný vynález rovněž zahrnuje použití předmětné vakcíny pro imunizaci prasat proti pleuropneumonii. Imunizaci prasat proti pleuropneumonii vakcínou podle předmětného vynálezu lze provádět injekcí vakcíny nitrosvalově nebo podkožně.

25 Význakem vynálezu je dále způsob přípravy předmětné vakcíny k prevenci nemocí způsobených bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae*, jehož podstata spočívá v tom, že se provede nejprve identifikace genů kódujících syntézu pouzdra v uvedené bakterii, a poté delece genů kódujících syntézu pouzdra, za získání nezapouzdřeného mutantu uvedených bakterií.

30 Dalším význakem vynálezu je způsob přípravy vakcíny k prevenci nemocí způsobených bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae*, jehož podstata spočívá v tom, že se nejprve provede identifikace DNA sekvencí kódujících syntézu pouzdra v bakteriích, které jsou lokalizované před hybridizačním místem BamHI-XbaI fragmentu v pCW-1C, a poté delece uvedených DNA sekvencí kódujících syntézu pouzdra za získání nezapouzdřených mutantů uvedených bakterií.

35 Podle předmětného vynálezu byl vyprodukován rekombinantní, živý, oslabený kmen *Actinobacillus pleuropneumoniae*, který byl geneticky upraven tak, aby mu chybělo pouzdro. Protože pouzdro je potřebné pro virulenci, ale nikoli pro imunitní ochranu, kmen bude užitečný jako vakcína proti prasečí pleuropneumonii, současnému zánětu pohrudnice a plic. Vakcína byla produkována klonovaným plazmidovým vektorem, který se nemůže replikovat v *A. pleuropneumoniae*. Byly sekvencovány geny exportu pouzdra a jeho syntézy v *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5. U klonovaných genů syntézy pouzdra byla provedena značná delece určitých částí a  
40 geny kódující odolnost proti kanamycinu a citlivost vůči sacharóze byly potom klonovány na uvolněné místo tak, aby sloužily jako markerové geny. Tento suicidní vektor byl vložen do virulentního kmene *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5 za použití elektroporace tak, aby byla získaná homologická rekombinace dvojnásobným překřížením mezi homologickými regiony chromozomu a plazmidu. Byly získány čtyři izoláty, a každý postrádal iridescenci, což bylo  
45 znakem toho, že chybí pouzdro. To, že chybí pouzdro a deletovaný region (oblast) pouzdrního genu, bylo potvrzeno u jednoho kmene metodou dot blotting (tečková hybridizace), případně Southern blotting. Také byla potvrzena přítomnost markerových genů v rekombinantním kmenu. Nebylo možno zjistit žádné jiné změny jakýchkoli jiných fenotypových vlastností a markerové geny nebyly nalezeny ani v jiných oblastech chromozomu. Rekombinantní kmen, označovaný  
50 jako J45-100, byl velmi sérově senzitivní, měl sníženou virulenci pro prasata na jednu desetinu 50% smrtelné dávky pro mateřský kmen a měl by poskytovat ochranu prasatům proti pleuropneumonii.

55 Tento vynález bude užitečný pro výrobu vakcín proti všem zapouzdřeným organismům, které produkují toxiny nebo proti jiným virulentním faktorům, kde pouzdro je potřebné pro virulent-

nost, nikoli však pro imunitní ochranu. Všechno, co bude potřebné, bude klonovat geny kódující syntézu pouzdra organismu a pak odstranit a nahradit části klonovaného genu markerovým genem na suicidním vektoru a potom zavést vektor do žádaného organismu a vyšetřit, zda jde o geneticky modifikovaný organismus bez pouzdra. Vynález by měl být užitečný při výrobě vakcín  
 5 proti dalším infekčním bakteriím včetně, nikoliv však výhradně, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* a *Pseudomonas aeruginosa*, stejně tak jako houbám jako je *Cryptococcus neoformans*, který je patogenem spojeným se syndromem získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) u koček a lidí.

10

#### Přehled obrázků na výkresech

Výše uvedené význaky vynálezu a další záměry, hlediska a výhody budou lépe pochopitelné z následujícího podrobného popisu výhodných provedení vynálezu s odvoláním na výkresy, ve  
 15 kterých obr. 1 je fyzikální mapou pCW-11E klonované DNA z regionu syntézy pouzdra *A. pleuropneumoniae* J45. Umístění a směřování transkripce dvou kompletních ORF (otevřených čtecích rámců) (*cpsA* a *cpsB*, plně vyplnění) je naznačeno identifikací dideoxy sekvencováním. Rovněž je naznačeno umístění parciálního třetího potenciálního ORF (*cpsC*). Ukázáno je také umístění a směřování transkripce nekompletního genu exportu pouzdra *cpxD* umístěného na  
 20 tomto fragmentu parciálního třetího potenciálního ORF (*cpsC*). Ukázáno je také umístění a směřování transkripce nekompletního genu exportu pouzdra *cpxD* umístěného na tomto fragmentu DNA. Také je uveden 2,1 kb Bg/II-Stul fragment, používaný jako DNA sonda na obrázku 2. Tečkované vyplnění označuje nekompletní ORF.

25 Obr. 2 je analýzou typu Southern blot genomické BNA *A. pleuropneumoniae* hybridizované na digoxigeninem značený 2,1 kb Bg/II-Stul fragment pCW11E. BamHI-štěpená genomická DNA ze sérotypu 1 kmene 4074 (pruh 1), sérotypu 2 kmene 1536 (pruh 2), sérotypu 5a kmene J45 (pruh 3), sérotypu 5a kmene K17 (pruh 4), sérotypu 5 kmene 178 (pruh 5), sérotypu 7 kmene 29628 (pruh 6) a sérotypu 9 kmene 13261 (pruh 7) byly hybridizovány sondou podle následujícího  
 30 popisu. Molekulární hmotnost hybridizovaných pásů (v kb) je uvedena.

Na obr. 3a a 3b jsou prezentovány nukleotidové sekvence 3,2 kb HindIII-EcoRV fragmentu pCW-11E, obsahující sérotypově specifickou DNA J45 *A. pleuropneumoniae* (sekvence s identifikačním číslem 1). Dedukované sekvence aminokyselin dvou kompletních ORF zjištěné  
 35 v této sekvenci, *cpsA* (sekvence s id. č. 2) a *cpsB* (sekvence s id. č. 3), a pod nukleotidovou sekvencí jsou uvedeny dedukované N-terminálové sekvence třetího nekompletního ORF, *cpsC* (sekvence s id. č. 4). Předpokládaná vázací místa ribosomů předcházející každý ORF jsou značena tučně a předpokládané -10 a -35 promotorové sekvence směrem nahoru od *cpsA*.

40 Obr. 4 popisuje konstrukci suicidního vektoru obsahujícího deleční DNA syntézy pouzdra, pCW11 EΔ1 KS1 a produkci nezapouzdřeného mutantu *A. pleuropneumoniae* J45 alelickou výměnou. Plazmidový vektor pCW11 EΔ1 KS1 byl konstruován štěpením pCW-11E pomocí Bg/II a Stul, které působí, že konce jsou tupé zakončené a vázající velký fragment 6,4 kb na  
 45 3,8 kb BamHI fragment pKS (rovněž otupený), obsahující kartridž nptI-sacRB (Kan<sup>r</sup>Suc<sup>r</sup>). Restrikční místa v závorkách naznačují původní konce fragmentů navázaných na pCW11 EΔ1 KS1. Vektor pCW11 EΔ1 KS1 byl elektrotransformován do *A. pleuropneumoniae* a nezapouzdřené transformanty Kan<sup>r</sup> byly vyšetřeny zda chybí iridescence v prostředí obsahujícím 85 μg/ml kanamycinu.

50 Obr. 5 je Southern blot analýza genomické DNA izolované z *A. pleuropneumoniae* J45 (pruh 1) nebo J45-100 (pruh 2) s digoxigeninem značenými sondami specifickými pro nptI nebo části místa pro zapouzdření *A. pleuropneumoniae*. Genomická DNA *A. pleuropneumoniae* J45 (pruh 1) nebo J45-100 (pruh 2) byla štěpena pomocí XbaI (panely A a C) nebo BamHI (panel B) a hybridizována buď 1,24 kb PstI fragmentem pKS (nptI-specifický), panel A; 2,1 kb Bg/II-Stul

fragmentem pCW-11E (cpsaABC-specifický, viz obr. 1), panel B; nebo 2,1 kb C/al fragmentem pCW-1C (cpxCBA-specifický, viz obr. 3.2), panel C.

5 Obr. 6 je imunoblot kolonií *A. pleuropneumoniae* J45 a J45-100 zreagovaných s kapsulárním polysacharidově specifickým prasečím antisérem. Na nitrocelulózovou membránu bylo přeneseno přibližně  $5 \times 10^5$  (pruh 1) nebo  $5 \times 10^4$  (pruh 2) CFU/jamku. Membrána byla rozpuštěna v chloroformu a inkubována prasečím antisérem, které obsahovalo protilátky k sérotypu 5a kapsulárního polysacharidu, ale ne jiné povrchové protilátky *A. pleuropneumoniae*.

10 Obr. 7 ukazuje imunoblotty *A. pleuropneumoniae* J45 (pruh 1) a J45-100 (pruh 2) koncentrovaných supernatantů kultury obsahující převážné exotoxiny ApxI a ApxII. Na panel A bylo působeno monoklonální protilátkou ApxI-specifickou a na panel B monoklonální protilátkou ApxII-specifickou. Do panelu A byla zahrnuta koncentrovaná kultura supernatantu *A. pleuropneumoniae* sérotyp 2 kmen 1536 (pruh 3) jako negativní kontrola, protože tento sérotyp nesyntetizuje ApxI. Na blot na panelu A bylo působeno monoklonální protilátkou specifickou ApxI.

15 Obr. 8 ukazuje elektroforetické profily LPS izolované z *A. pleuropneumoniae* J45 (pruh 1) a rekombinantního nezapouzdřeného mutantu J45-100 (pruh 2). LPS byla podrobena elektroforeze přes 15% separační gel a zbarvena amoniakálním stříbrem.

20 Obr. 9 ukazuje baktericidní aktivitu prekolostrálního telecího séra pro *A. pleuropneumoniae* J45 a J45-100. Procento životnosti bakteriálních kmenů bylo vyhodnoceno po 60 minutách inkubace při 37 °C. Každý datový bod reprezentuje průměr ze tří separátních pokusů prováděných duplicitně. Chybové čáry představují standardní odchylku každého průměru. Maximální procento životnosti zaznamenané pro J45 bylo 100 %, třebaže tyto hodnoty byly obvykle vyšší, protože bakterie obvykle během pokusu rostla. Hodnoty větší než 100 % nebyly zaznamenávány, protože by nemohly být přesně stanovené.

25 Obr.10a, 10b představují nukleotidovou sekvenci 3,2 kb XbaI-ClaI fragmentu pCW-1C kódující geny DNA exportu pouzdra *A. pleuropneumoniae* J45 (sekvence s id. č. 5). Jsou prezentovány dedukované sekvence aminokyselin (sekvence s id. č. 6-8) proteinů zapojených do exportu pouzdrního polysacharidu *A. pleuropneumoniae* sérotyp 5a.

30 Obr. 11 je fyzikální mapou pCW-1C DNA z *A. pleuropneumoniae* J45.

35 Podrobný popis nejvýhodnějšího provedení vynálezu

Vynález předkládá použití živého, rekombinantně produkovaného avirulentního kmene mikroorganismu (to znamená bakterie nebo houby), který byl genetickým inženýrstvím upraven tak, aby byl nezapouzdřený, jako vakcíny proti nemocím způsobeným tímto mikroorganismem. Vynález bude mít použití pro prevenci nemoci, u kterých se pouzdro mikroorganismu vyžaduje pro virulentnost, nikoli však pro imunitní ochranu, a kde nemoc je způsobována toxiny nebo jinými virulentními faktory. Jako konkrétní příklad vynálezu byl produkován nezapouzdřený kmen *Actinobacillus pleuropneumoniae*, který by mohl být použit jako vakcína proti prasečí pleuropneumonii, tj. současnému zánětu pohrudnice a plic. Hlavním charakteristickým rysem vynálezu je genetická modifikace mikroorganismu, kterým je v konkrétním provedení *Actinobacillus pleuropneumoniae*, tak aby zahrnovala delecii jeho deoxyribonukleové kyseliny (DNA) v regionu (oblasti) kódujícím syntézu pouzdra. Pouze pro příklad se uvádí syntéza transformovaného mutantu *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotyp 5, ovšem je třeba si uvědomit, že ostatní sérotypy se dají připravit způsobem podobným tomu, který je popsán níže a budou užitečné ve vakcíně samé nebo v kombinaci s jedním nebo více rekombinantními mutanty různých sérotypů.

55 Níže popsáný kmen, současně s jinými kmeny nezapouzdřených, toxigenních bakterií nebo jiných mikroorganismů, vytvářených podle postupu popsáného níže, budou představovat vynikající vakcíny, protože jsou avirulentní, ale produkují všechny antigeny nezbytné pro hostitele, k

vytvoření imunitní odpovědi. Vakcíny se mohou podávat různými způsoby, ovšem intramuskulární nebo subkutánní injekce jsou nejvýhodnější. Výhodou těchto živých vakcín je, že toxiny, které v první řadě způsobují nemoc a další komponenty, které jsou produkovány pouze živými organismy nebo *in vivo*, budou produkovány v místě imunizace a hostitel takto získá imunitní reakci, která ho bude chránit před poškozeními vyvolanými toxiny. V důsledku toho se nemoc (akutní nebo chronická) neprojeví. Organismy se nemohou rozšiřovat, protože bez pouzdra jsou tyto organismy mimořádně sérově citlivé a okamžitě jsou vylučovány do krevního oběhu nebo dýchacího traktu. Navíc, jako živé vakcíny, buňkami zprostředkovaná imunitní odpověď bude větší a ochrana bude trvat déle než u usmrcených vakcín.

### Příklad provedení vynálezu

#### Příklad

Byl identifikován a charakterizován region DNA, který je zapojen do biosyntézy pouzdrového polysacharidu u *Actinobacillu pleuropneumoniae*. Sonda specifická pro gen *cpxD*, který je zapojen do exportu *A. pleuropneumoniae* sérotyp 5a J45 pouzdrového polysacharidu, byla použita k identifikaci a klonování sousední 5,8 kilobáze BamHI fragmetu genomické DNA J45. Southern blot analýzy demonstrovaly, že část DNA obsažená v tomto regionu, byla sérotypově specifická. Sekvenční analýza DNA demonstrovala, že tento region obsahoval dva kompletní otevřené čtecí rámce, *cpsA* a *cpsB* a nekompletní potenciální třetí otevřený čtecí rámec *cpsC*. Rámce *cpsA* a *cpsB* jsou do určité míry mírně homologické s glykosyltransferázami, které jsou zapojeny do biologické syntézy lipopolysacharidů *Escherichia coli* a případně pouzdrových polysacharidů *Haemophilu influenzae* typu b. Byla provedena delece 2,1 kilobáze, která překlenovala klonovaný *cpsABC* otevřeného čtecího rámce a rekombinována do chromozomu J45 alelickou výměnou, tak aby vznikl mutant J45-100. Tento mutant neprodukoval nitrobuněčné ani mimobuněčné pouzdrové polysacharidy, což naznačuje, že *cpsA*, *cpsB* a/nebo *cpsC* byly zapojeny do biosyntézy pouzdrových polysacharidů u *Actinobacillu pleuropneumoniae*. Toxin *Apx* a lipopolysacharidové profily J45-100 byly identické opouzdřenému mateřskému kmeni J45. Avšak J45-100 rostl *in vitro* rychleji než J45. J45-100 byl senzitivní na usmrcení v prekolostrálním telecím séru, zatímco J45 nebyl. J45-100 byl avirulentní když byl použit u vepřů intratracheálně v trojnásobku 50% smrtelné dávky kmene J45. Šestinásobná 50% smrtelná dávka J45 způsobila v případě J45-100 mírné až střední poškození plic, nikoli však smrt. Tyto výsledky demonstrovaly, že pouzdrové polysacharidy jsou hlavním determinantem sérové rezistence a virulence *Actinobacillu pleuropneumoniae*.

#### Materiály a metody

##### Bakteriální kmeny, plazmidy a růstové podmínky

Bakteriální kmeny a plazmidy použité v této studii jsou popsány v tabulce 1. Pro extrakci genomické DNA a pro baktericidní zkoušky byly pěstovány kmeny *A. pleuropneumoniae* vytřepáváním při 37 °C v bujónu z mozku a srdce (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) obsahujícím 5 µg/ml dinukleotidu nikotinamid adeninu (NAD) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). Pro elektroporaci byly kmeny *A. pleuropneumoniae* pěstovány vytřepáváním při 37 °C v bujónu tryptické soji (Difco Laboratories) obsahujícím 0,6 % droždíového extraktu (Difco Laboratories) a 5 µg/ml NAD (TSY-N). Pro pokusy na prasatech byly kmeny *A. pleuropneumoniae* pěstovány vytřepáváním při 37 °C v kolumbijském bujónu (Difco Laboratories) obsahujícím 5 µg/ml NAD. Kmeny *Escherichia coli* byly pěstovány v bujónu Luria-Bertani (Sambrook a j., 1989) pro rutinní kultivaci nebo v Terrific bujónu (Tartof a Hobbes, 1387) pro extrakci plazmidů. Pro udržování plazmidu v *E. coli* byla v živném prostředí používána antibiotika v následujících koncentracích: ampicilin (Amp) 100 µg/ml a kanamycin (Kan) 50 µg/ml. Kanamycin byl používán v koncentraci 85 µg/ml pro selekci rekombinantních mutantů *A. pleuropneumoniae*.

Tabulka 1

POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY A PLAZMIDY	
<i>A. pleuropneumoniae</i> kmeny 4074	sérotyp 1; (ATCC 27088)
ATCC <sup>a</sup> 1536	sérotyp 2; (ATCC 27089)
ATCC <sup>a</sup> J45	sérotyp 5a
Fenwick a j., 1986a K17	sérotyp 5a
Nielsen, 1986a 178	sérotyp 5
M. Mulks 29628	sérotyp 7
L. Hoffman 13261	sérotyp 9
J. Nicolet J45-C	nezapouzdřený mutant izolovaný po etylmetansulfonátové mutagenezi kmene
J-45 Inzana a j., 1993a J-45-100	rekombinantní nezapouzdřený mutant derivovaný z kmene J45
E.coli kmeny XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 re/A1 lac(F <sup>+</sup> proAB lac1 <sup>q</sup> ZΔ M15 Tn 10); hostitelský organismus pro rekombinantní plazmidy
Stratagene, La Jolla, Kalifornie, plazmidy pGEM-3Z	klonovací vektor, 2,74 kb; Amp <sup>r</sup>
Promega pCW-1C	5,3 kb XbaI fragment J45 klonovaný do pGEM-3Z
pCW-11E	5,8 kb BamHI fragment J45 klonovaný do pGEM-3Z
pKS	3,8 kb BamHI fragment obsahující nptI <sup>b</sup> -sacRB kartridž <sup>c</sup> klonovaný do BamHI místa v pGEM-3Z; Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>
S.M. Boyle pCW11EA1KS1	pCW-11E s deletovaným fragmentem 2,1 kb Bg/II-StuI a s 3,8 kb BamHI nptI-sacRB kartridží z pKS vázanou v této kapitole
<sup>a</sup> American Type Culture Collection, Rockville, MD	
<sup>b</sup> Tento marker byl původně odvozen z Tn903 nptI genu pUC4K (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)	
<sup>c</sup> Tato kartridž byla již dříve popsána (Ried a Collmer, 1987)	

## 5 Kalkulace generační doby

Generační doba logaritmické fáze kmenů *A. pleuropneumoniae* pěstovaných v TSY-N se kalkulovala za použití rovnice:  $R = 1/g$ , kde R je průměrná rychlost bakteriálního růstu a g je generační doba bakteriální populace (Pelczar a j., 1993). Průměrná rychlost růstu R se kalkulovala za použití následující rovnice:  $R = 3,32 (\log_{10} N - \log_{10} N_0)/t$ , kde t = prošlá doba, N je počet bakterií v čase = t a N<sub>0</sub> je počáteční počet bakterií v čase = 0 (Pelczar a j., 1993).

## Hybridizační analýza DNA

- 15 Restrikční endonukleázou rozštěpená DNA (přibližně 5 μg na jeden pruh) byla podrobena elektroforéze přes 0,7% agarózový gel a přenesena kapilárním přenosem na nylonové membrány MagnaGraph (Micron Separation In., Westboro, Mass.) za použití 20X fyziologického roztoku s citranem sodným (20X fyziologického roztoku s citranem sodným [SSC] je 3 M NaCl, 300 mM citranu sodného, pH 7) jak již bylo dříve popsáno (Sambrook a j., 1939; Southern, 1975). DNA
- 20 byla kovalentně vázaná na nylonové membrány UV zářením za použití UV Stratalinkeru (Stratagene, La Jolla, Kalifornie). Digoxigeninem značené sondy pro hybridizaci DNA byly syntetizovány náhodnou primerovou metodou za použití neradioaktivního značení Genius System a detekční soupravy (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Ind.) podle pokynů výrobce. Hybridizace DNA se prováděla při 68 °C v roztocích obsahujících 5X SSC. Membrány byly
- 25 promývány a zpracovány podle pokynů Genius System pro kolorimetrickou detekci.

## Rekombinantní DNA metody a činidla

5 Genomická DNA byla izolována z buněk *A. pleuropneumoniae* pěstovaných v bujónu za použití metod popsaných S. Spinolou. Stručně, bakterie byly resuspendovány v 10 mM Tris-1 mM EDTA (pH 8) a inkubovány dodecylsulfátem sodným (0,66 %) a RNAázou (100 µg/ml) po dobu jedné hodiny při 37 °C. Ke konečné koncentraci 100 µg/ml byla přidána proteináza K a směs byla inkubována po dobu 1 hodiny při 59 °C. Směs byla potom jednou extrahována pufrovaným fenolem a čtyřikrát pufrovaným fenol-chloroformem (Amresco, Inc., Solon, Ohio) a genomická DNA byla vysrážena etylalkoholem a resuspendována v 10 mM tris-1 mM EDTA (pH 8). Plazmid DNA byl izolován rychlou metodou alkalolýzy (Ish-Horowicz a Burke, 1981). Restrikční fragmenty požadované pro klonování a syntézu sondy byly vymyty z agarózových gelů tak jak je popsáno (Zhen a Swank, 1993). Restrikční štěpení, elektroforéza na agarózovém gelu a ligace DNA byly provedeny tak jak bylo již popsáno (Sambrook a j., 1989). Konce restrikčních fragmentů byly tupě zakončeny vyplněním 5' převisu pomocí nukleotidů (dNTP) za použití Klenowova fragmentu DNA polymerázy I, jak již bylo dříve popsáno (Sambrook a j., 1989). Plazmid DNA byl transformován do kmenů *E. coli* elektroporací (Dower a j., 1988) za použití elektroporátoru BTX ECM 600 (BTX, Ing., San Diego, Kalifornie).

20 Restrikční endonukleázy a Klenowův fragment DNA polymerázy 1 byly získány od Promega Corporation (Madison, Wisconsin). T4 DNA ligáza byla získána od Gibco BRL (Gaithersburg, Md). Nukleotidy (dNTPs) pro naplňovací reakce byly získány od Boehringer Mannheim Corporation (Indianapolis, Indiana).

## 25 Sekvencování a analýza DNA

Nukleotidová sekvence obou řetězců 2,7 kilobáze (kb) XbaI-EcoRV DNA fragmentu pCW-11E byla stanovena dideoxy metodou ukončení řetězce (Sanger a j., 1977) za použití Sequenase verze 2.0 DNA sekvenovací soupravy (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio) s  $\alpha^{35}$ [S]dATP (DuPont/NEN Research Products, Boston, Mass.). Dvouřetězcové matrice DNA byly sekvenovány za použití běžných, oligonukleotidových primerů (DNAgency, Inc., Malverne, Pa.) tak, aby bylo možno pokračovat ve čtení podél každého řetězce.

35 Získaná nukleotidová sekvence byla kombinována s nukleotidovou sekvencí 4,6 kb XbaI-ClaI DNA fragmentu z pCW-1C kódujícího pro strukturální geny pouzdra směrem nahoru (obr. 10) a byla analyzována za použití analytického software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.). Hledání sekvenční podobnosti v EMBUGenBank/DDBJ databázi se prováděla za použití BLAST software (Altschul a j., 1990) v Národním středisku pro biotechnologické informace (Bethesda, Md.).

40 Zachované regiony *H. influenzae* typu b místa cap (capb) zapojené do exportu pouzdrového polysacharidu byly použity k identifikaci, klonování a charakterizaci části *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a. Prováděly se Southern blot analýzy genomické DNA *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a kmene J45 se sondami specifickými pro přilehlé regiony *H. influenzae* typu b místa kapsulace (capb). Tyto sondy za velmi přísných podmínek (68 °C, 5x SSC) nehybridizovaly ke genomické DNA *A. pleuropneumoniae*, ale hybridizovaly za podmínek středně přísných (55 °C, 5x SSC). Fragment 4,4 kb EcoRI *H. influenzae* místa capb z plazmidu pSKH1 obsahující region genu 1 bexD zapojený do exportu pouzdrového polysacharidu a dva regiony 2 otevřených čtecích rámců (ORF) zapojených do biosyntézy pouzdrového polysacharidu hybridizovaly k 1,2 kb HindIII a 5,3 kb XbaI fragmentům genomické DNA J45. Fragment 9,0 kb EcoRI *H. influenzae* místa capb z plazmidu pSKH<sub>2</sub>, obsahující region 1 genů bexCBA zapojených do exportu pouzdrového polysacharidu, poněkud necharakterizovaný region 3 DNA společný různým sérotypům *H. influenzae* a určitý region 2 DNA zapojený do biosyntézy pouzdrového polysacharidu hybridizovaly k 1,5 kb HindIII, 5,3 kb XbaI a 2,5 kb XhoI fragmentům genomické DNA J45. Tato data naznačovala, že *H. influenzae* typu b a *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a místa genu pouzdra

sdílejí homologické regiony. *H. influenzae* capb specifické sondy obsahovaly obě region 1 DNA zapojený do exportu pouzdrového polysacharidu, což naznačuje, že 5,3 XbaI fragment genomické DNA z J45, který hybridizoval k oběma sondám *H. influenzae* capb může obsahovat geny, které kódují proteiny zapojené do exportu kapsulárního polysacharidu *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a. Fragment 5,3 XbaI genomické DNA z J45, který hybridizoval ke dvěma sondám *H. influenzae* capb byl klonován na místo XbaI plazmidu pGEM-3Z (v obou orientacích) z XbaI-štěpených fragmentů genomické DNA J45 v rozsahu 4,8 až 6,0 kb, které byly elektrovytuhovány (po elektroforetické separaci) z agarózového gelu. Jeden z výsledných plazmidů byl označen pCW-1 G. Byla provedena Southern blot analýza k určení, zda *H. influenzae* typ b bexD, bexC, bexB a bexA hybridizovaly k přilehlým fragmentům pCW-1C ve stejném pořadí (bexDCBA) v jakém se tyto geny vyskytují v *H. influenzae*. Výsledky naznačují, že region DNA *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a potřebný pro export pouzdrového polysacharidu byl úspěšně klonován a že tento region byl organizován obdobným způsobem jako *H. influenzae* typu b místa bex.

Byla stanovena nukleotidová sekvence 4,6 kb XbaI-ClaI restričního fragmentu pCW-1C a restriční fragment 3,2 kb XbaI-ClaI je prezentován na obrázcích 10a-b (sekvence s id. č. 5). V těsné blízkosti stejného řetězce DNA byly odhaleny čtyři ORF (uvedeno na obr. 10a-b a na obr. 11) označené cpxDCBA (cpx se používá pro označování místa exportu pouzdrového polysacharidu). Iniciační kodon AUG z cpxC (sekvence s id. č. 7) byl o 26 nukleotidů níže od terminačního kodonu UAA z cpxD (sekvence s id. č. 6), zatímco iniciační kodon AUG z cpxB (sekvence s id. č. 8) přesahoval terminační kodon UAA z cpxC (sekvence s id. č. 7) a iniciační kodon AUG z cpxA přesahoval terminační kodon UGA z cpxB, který byl částečně přítomen (sekvence s id. č. 8). Shine-Dalgarnové ribosom vázající konvenční sekvence byly identifikovány v 17 bázích směrem vzhůru od každého iniciačního kodonu AUG a směrem nahoru byl identifikován domnělý promotor obsahující sekvence podobné *E. coli*  $\alpha^{70}$ -10(TATAAT) a -35(TTGACA) konvenční sekvence z cpxD (sekvence s id. č. 6). Směrem dolů z cpxA (neukázáno) byla identifikována palindromická sekvence, která může fungovat jako na ró-faktoru nezávislý transkripční terminační signál. Genetická organizace naznačuje, že cpxDCBA jsou přepisovány do jednoduché, polycistronické mRNA.

### Elektrotransformace *A. pleuropneumoniae*

*A. pleuropneumoniae* byla pěstována do střední logaritmické fáze v TSY-N, peletizována odstředěním při 7000 x g při 4 °C a promývána 4 x v chlazeném (4 °C) filtračně sterilizovaném pufru obsahujícím 272 mM mannitolu, 2,43 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,57 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 % glycerinu, pH 7,5. Tento pufr byl modifikován (aby obsahoval mannitol místo sacharózy) z dříve popsáno pufru používaného pro promývání buněk *A. pleuropneumoniae* před elektroporací (Lalonde a j., 1989b). Buňky byly potom jednou promyty v chlazeném, filtrovaném a sterilizovaném 15% glycerinu a resuspendovány přibližně do 10<sup>10</sup> CFU/ml v 15% glycerinu. Alikvotní podíly této suspenze (90  $\mu$ l) byly smíchány s 1,5-2,0  $\mu$ g plazmidu DNA (v 1,5  $\mu$ l destilované vody), který byl vyčištěn hustotním gradientem cesium chloridu ultracentrifugací (Sambrook a j., 1989), umístěny do chlazených elektroporačních kyvet (BTX, Inc.) s 2 mm spárou a zpracovány elektroporací za použití BTX ECM 600 elektroporátoru (BTX, Inc.) nastaveného na nabíjecí napětí 2,5 kV a s nastaveným odporem R7 (246 ohmů). Generovaný skutečný pulz činil 2,39 kV poskytovaných během 10,7 milisekund. Po elektroporaci byly buňky získány zpět v 1 ml TSY-N obsahujícího 5 mM MgCl<sub>2</sub> jemným třepáním po dobu 3,5 hodiny při 37 °C. Po znovuzískání byly tyto buňky kultivovány na TSY-N agaru obsahujícím 85  $\mu$ g kanamycinu na 1 ml a byly inkubovány při 37 °C.

Imunoblotování. Pro imunoblotty kolonií *A. pleuropneumoniae* byly celé buňky, které vyrostly přes noc na agarových deskách TSY-N seškrábnuty do fosfátového pufru fyziologického roztoku (PBS) a upraveny na 10<sup>9</sup> CFU/ml, tak jak bylo stanoveno spektrofotometricky. Na nitrocelulózuovou membránu (NitroBind; Micron Separations Inc.) bylo aplikováno přibližně 5 x 10<sup>4</sup> nebo 5 x 10<sup>5</sup> CFU na dávku s použitím Bio-Dot přístroje (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornie). Membrány byly umístěny do chloroformu na 15 minut při teplotě místnosti pro

uskutečnění lyze bakteriálních buněk na membráně. Membrána byla úplně vysušena na vzduchu a inkubována jednu hodinu při teplotě místnosti ve fyziologickém roztoku Tris-puftru, pH 7,5 (TBS) obsahujícím 2 % odstředěného mléka pro blokování nespecifických vazacích míst na membráně. Membrána byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti v zředění 1:200 (v 2% mléčném-TBS) adsorbovaného prasečího antiséra, které obsahovalo protilátky k sérotypu 5a pouzdrového polysacharidu, avšak nikoli jiné povrchové protilátky *A. pleuropneumoniae*. Toto pouzdrovým polysacharidem obohacené antisérum bylo připraveno adsorpcí hyperimunního prasečího antiséra k *A. pleuropneumoniae* K17 se spontánním nezapouzdřeným mutantem K17-C (Inzana a Mathison, 1987), jak již bylo dříve popsáno (Inzana, 1995). Membrána byla promyta TBS obsahujícím 0,05 % Tweenu 20, potom inkubována 1 hodinu při teplotě místnosti ve zředění 1:1000 králíčího antiprasečího imunoglobulinu konjugovaného k peroxidáze selského křenu (těžké a lehké řetězce; Cappel, Durham, N.C.). Membrána byla promyta v TBS, potom zpracována 4-chlor-1-naftolem (Bio-Rad Laboratories) v TBS obsahujícím 0,02 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Imunoblotace *A. pleuropneumoniae* koncentrovaných kultur supernatantů se prováděla tak jak již bylo dříve popsáno (Ma a Inzana, 1990). Stručně, přibližně 15 µg celkového proteinu kultury supernatantu bylo separováno diskontinuitním postupem SDS-PAGE (Laemmli, 1970) přes 8% separační gel. Proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (NitroBind; Micron Separations Inc.) metodou vypracovanou Towbinem a j. (1979). Membrána byla inkubována v TBS obsahujícím 2 % hovězího sérového albuminu pro blokování nespecifických vazeb a byla rozřezána na proužky. Proužky byly inkubovány přes noc při 4 °C buď s monoklonální protilátkou specifickou pro toxin Ap<sub>xll</sub> (Ma a Inzana, 1990), nebo monoklonální protilátkou specifickou pro toxin Ap<sub>xl</sub> (Devendish a j., 1989; Frey a j., 1999) a omyty v TBS. Blot reagující s monoklonální protilátkou specifickou pro Ap<sub>xll</sub> byl inkubován s 1:2000 zředěním kozího protimyšního imunoglobulinu konjugovaného k peroxidáze polního křenu (Cappel), promyt v TBS a zpracován jak popsáno výše. Blot reagující s monoklonální protilátkou specifickou pro Ap<sub>xl</sub> byl inkubován 1:2000 zředěním kozího protimyšního imunoglobulinu konjugovaného na alkalickou fosfatázu a zpracován jak bylo již dříve popsáno (Fey a j., 1992).

#### 30 Extrakce a elektroforéza LPS

LPS byl izolován z *A. pleuropneumoniae* za použití mikroextrakční metody horkou fenolovou vodou, jak již bylo dříve popsáno (Inzana, 1983). Čištěný LPS byl podroben elektroforéze přes 15% polyakrylamidový separační gel obsahující močovinu, jak již bylo popsáno (Inzana a j., 1988). Elektroforetické profily LPS byly vizualizovány zbarvením gelu amoniakálním stříbrem (Tsai a Frasch, 1982).

#### Sérová baktericidní zkouška

40 Byla stanovována citlivost *A. pleuropneumoniae* na baktericidní aktivitu prekolostrálního telecího séra. Procento životnosti bakteriálních kmenů v 5, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 % prekolostrálního telecího séra byla vyhodnocována po 60minutové inkubaci při 37 °C.

#### Studie virulence

45 7 až 9 týdenní prasata byla získána z místních dvou stád prostých infekce *A. pleuropneumoniae* a byla rozdělena námtkově do skupin. Skupiny prasat byly ustájeny v separátních stáních, kde nedocházelo k přímému fyzickému kontaktu mezi jednotlivými skupinami. Živočišná zařízení na Virginském polytechnickém institutu a Státní univerzity jsou provozována a udržována v souladu s požadavky Americké asociace pro akreditaci laboratoří pro živočišnou péči. Kmeny potřebné pro nálezový experiment s *A. pleuropneumoniae* byly pěstovány za třepání v Kolumbijském bujónu (Difco Laboratories) doplněném 5 µg/ml NAD při 7000 x g a resuspendovány na přibližně 10<sup>9</sup> CFU/ml ve fosfátovém pufru fyziologického roztoku (PBS). Prasata byla nakažena intratracheálně 10 ml roztoku této suspenze po mírném uklidnění Stresnilem (Pittman-Moore, Inc., Washington Crossing, N.J.). Prasata byla pitvána co možná nejdříve hned po uhynutí, při-

padně bezprostředně po utracení pomocí pentobarbitalu sodného. Poškození plic zjišťoval veterinární patolog podle následujících kritérií: 0, nepozorovatelné poškození plic (bez větších poškození); 1+, 1 až 10 % plicní tkáně ovlivněno určitou kombinací kongesce, edému, krvácení, konsolidace a/nebo pleuritidy; 2+, 11 až 49 % plicní tkáně zasaženo; 3+, ovlivněno 50 až 74 % plicní tkáně; 4+, 75 % nebo větší část plic. Plicní vzorky byly odebrány při pitvě z pravé kraniální dorzální strany kaudálního laloku a pěstovány v mozkově srdečním infuzním médiu obsahujícím NAD k zjištění přítomnosti *A. pleuropneumoniae*.

## Výsledky

### Identifikace a klonování sérotypově specifického regionu DNA *A. pleuropneumoniae*

Pro identifikaci a klonování DNA *A. pleuropneumoniae* J45 zapojené do biosyntézy pouzdrového polysacharidu byly prováděny analýzy postupem Southern blot a identifikován přilehlý region DNA směrem nahoru (ve směru 5') z genového klastru cpxDCBA zapojeného do exportu pouzdrového polysacharidu tak jak bylo popsáno výše (obrázky 10a-b a 11). Očekávalo se, že tento region DNA směrem vzhůru by mohl kódovat sérotypově specifické geny zapojené do biosyntézy pouzdrového polysacharidu, protože umístění genu pro pouzdření *A. pleuropneumoniae* (cap) se zdálo být organizováno stejným způsobem jako místo pro zapouzdření Haemophilu influenzae typu b a Neisseria meningitidis skupiny B. Genomická DNA *A. pleuropneumoniae* J45 štěpená BamHI byla hybridizována pomocí digoxigeninem značeného fragmentu 1,2 kb BamHI-XbaI z pCW-1C, který obsahoval část genu cpxD. Tato pro cpxD specifická sonda byla hybridizována na jednoduchý, přibližně 5,8 kb BamHI J45 fragment genomové DNA (data se neuvádějí). Tento fragment 5,8 kb BamHI byl klonován do místa BamHI na pGEM-3Z z genomových fragmentů DNA J45 štěpených BamHI v rozsahu 5,0 - 6,5 kb, které byly elektroeluvovány (po elektroforetické separaci) z agarového gelu. Výsledný plazmid byl označen pCW-11E a byl restriktivně mapován (obr. 1). Část inzertu DNA pCW-11E (1,2 kb BamHI-XbaI fragment) překrýval DNA přítomnou na inzertu z pCW-1C.

Genomová DNA štěpená BamHI z několika různých sérotypů *A. pleuropneumoniae* byla hybridizována pomocí 2,1 kb Bg/II-StuI fragmentu pCW-11E (obrázek 1) k určení sérotypové specifčnosti tohoto regionu DNA (obrázek 2). 2,1 kb Bg/II-StuI fragment DNA hybridizoval na 5,8 kb BamHI fragmentu genomové DNA za tří testovaných kmenů *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5, nikoli však na genomovou DNA ze sérotypu 1, 2, 7 a 9 (obrázek 2). V důsledku toho DNA *A. pleuropneumoniae* v pCW-11E obsahovala DNA, která byla specifická pro kmeny sérotypu 6. Protože tato DNA byla sérotypově specifická, bylo pravděpodobné, že je zapojena do biosyntézy pouzdrového polysacharidu.

### Nukleotidová sekvence a analýza sérotypově specifického regionu DNA *A. pleuropneumoniae*

Byla stanovena nukleotidová sekvence 2,7 kb XbaI-EcoRV fragmentu DNA z pCW-11E. Tato nukleotidová sekvence byla kombinována s nukleotidovou sekvencí 4,6 kb ClaI-XbaI fragmentu pCW-1C a byla vyšetřována na přítomnost otevřených čtecích rámců (ORF), které nebyly dříve identifikovány. Nukleotidová sekvence 3,2 kb HindIII-EcoRV fragmentu pCW-11E obsahující nově identifikované ORF je na obrázku 3. Směrem vzhůru byly identifikovány dva kompletní ORF označené cpsA a cpsB (cps zde znamená syntáza polysacharidového pouzdra), a na protilehlém řetězci genu cpxD zapojeného do exportu pouzdrového polysacharidu *A. pleuropneumoniae* (obrázek 1 a obrázek 3). Iniciační kodon AUG z cpsB se nacházel 3 nukleotidy směrem dolů od terminačního kodonu UAA z cpsA. Iniciační kodon AUG třetího potenciálního ORF, a sice cpsC, byl zjištěn 15 bází směrem dolů od terminačního kodonu UAA cpsB. Shine-Dalgarno ribosomové-vázací konvenční sekvence (Shine a Dalgarno, 1974), byly zjištěné v rozsahu 13 bází směrem nahoru od iniciačního kodonu AUG cpsA, cpsB a cpsC (obrázek 3). Předpokládaný promotor obsahující sekvence podobné k *E. coli*<sup>70</sup> -10(TATAAT) a -35(TTGACA) konvenčním sekvencím (Hewley a McClure, 1986), byly zjištěny směrem nahoru od cpsA (obrázek 3). Těsná blízkost cpsABC a identifikace předpokládaného promotoru smě-

rem nahoru naznačovaly, že tyto ORF by mohly být ko-transkribovány: Obsah G+C pro region DNA kódující cpsABC činil 28 %.

5 Předpovídané polypeptidy a cpsA a cpsB sestávaly z 321 (CpsA) a 526 (CpsB) aminokyselin (obrázek 3). Předpovídané molekulární hmotnosti CpsA a CpsB byly 36,9 a 61,7 kiloDaltonů (kDa). Hydropatické diagramy demonstrovaly, že CpsA a CpsB jsou relativně hydrofilní proteiny, což naznačuje, že tyto proteiny mohou být spojeny s cytoplazmickým úsekem *A. pleuropneumoniae* (data neuváděna). Vyhledávání BLAST (Altschul a j., 1990) kombinovaného, neredundantního nukleotidu a proteinových databází v Národním středisku pro biotechnologické informace nezjistila žádnou podstatnou homologii mezi cpsABC na nukleotidové nebo aminokyselinové úrovni s jiným sekvencemi v databázích (data neuváděna). Avšak byla pozorována nízká úroveň homologie (15 % podobnosti) mezi CpsA a proteinem E. coli Rfb, O-antigenová glykosyltransferáza zapojená do biosyntézy LPS (Cheah a Manning, 1993). Nízká úroveň homologie (přibližně 14 % podobnosti) byla zjištěna mezi CpsB a regionem 2 ORF 3 předpověděného proteinového produktu místa zapouzdření *H. influenzae* typu b. Předpovídaný protein ORF 3 je zapojen do biosyntézy polyribosylribitol fosfátového pouzdrového polysacharidu *H. influenzae* typu b (Van Eldere a j., 1995). Nebyla pozorována žádná významnější homologie mezi N-terminálem 83 aminokyselin CpsC a žádnými proteiny v databázích.

20 Produkce nezapouzdřených transformantů *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a rezistentních vůči kanamycinu

Na obrázku 4 jsou schematicky naznačené postupy použité k přípravě rekombinantních, nezapouzdřených *A. pleuropneumoniae* J45 mutantů homologickou rekombinací a alelickou výměnou. Jako první byl konstruován vektor pCW1 1EΔ1 KS1 k použití jako nereplikační, suicidní vektor na podporu výměny DNA pouzdra divokého typu *A. pleuropneumoniae* s geneticky změněnou DNA pouzdra *A. pleuropneumoniae* dvojitou homologickou rekombinací (crossing-over). Vektor pCW1 1EΔ1 KS1 byl konstruován nejdříve štěpením pCW-11E pomocí Bg/II a Stul k vytvoření velké delece v pouzdrové DNA u sérotypově specifického *A. pleuropneumoniae*. 30 Konce této rozštěpené DNA byly tupě zakončeny a velký fragment 6,4 kb byl navázán na 3,8 kb BamHI fragment pKS (rovněž tupě ukončený), obsahující kartridž nptI-sacR-samB. Tato kartridž obsahuje Tn903 nptI gen, o kterém je známo, že dodává rezistenci vůči kanamycinu (Kan<sup>r</sup>) na *A. pleuropneumoniae* (Tascon a j., 1994) a sekvence sacRB, které dodávají citlivost na sacharózu (Suc<sup>r</sup>) mnoha gram-negativním bakteriím (Gay a j., 1983; Ried a Collmer, 1987). Delece vytvořená v pCW1 1EΔ1 KS1 překlenuje cpsABC (obr. 1, obr. 4) a proto pravděpodobně mohla ovlivnit proteinové produkty těchto ORF.

Vektor pCW1 1EΔ1 KS1 se nereplikoval do *A. pleuropneumoniae* a proto fungoval jako suicidální vektor. Poté co pCW1 1EΔ1 KS1 byl elektroporován do *A. pleuropneumoniae* J45 bylo, po inkubaci znovuzískaných směsí při 37 °C po dobu 2 dní, získáno sedm vůči kanamycinu rezistentních transformantů.

40 Čtyři z těchto J45 transformantů odolných proti kanamycinu nebyly iridescentní při vizualizaci na deskách běžně pronikajícím světelným zdrojem, což předpovídá, že tyto transformanty nebyly zapouzdřené (data nejsou uváděna). Médium používané pro pěstování *A. pleuropneumoniae* před elektroporací s pCW1 1EΔ1 KS1 bylo faktor, protože nezapouzdřené transformanty odolné proti kanamycinu nebyly nikdy získány, když byl *A. pleuropneumoniae* pěstován v mozkově srdečním nálevu doplněném NAD.

Genotypová charakteristika transformantů *A. pleuropneumoniae* odolných proti kanamycinu

50 Předběžné koloniové hybridizační analýzy sedmi transformantů odolných vůči kanamycinu odhalily, že čtyři transformanty, které se jeví jako nezapouzdřené (vizuální prohlídkou) hybridizovaly s nptI specifickou sondou DNA (1,24 kb PstI fragmentem z pKS), ale nikoli se sondami specifickými pro pGEM-3Z (1,1 kb Bg/II fragment pGEM-3Z) nebo se sérotypově specifickým 2,1 kb Bg/II-Stul fragmentem pCW-11E (údaje nejsou uváděny). Tyto výsledky naznačují, že u každého z těchto čtyř transformantů odolných proti kanamycinu došlo ke dvojitě rekombinaci.

Naopak, kolonie dalších tří transformantů rezistentních proti kanamycinu hybridizovaly k sondám specifickým pro gen *nptI*, pGEM-3Z a 2,1 kb Bg/II-StuI fragmentu pCW-11E, což naznačuje, že došlo k jednomu prostému překřížení a celý suicidální vektor pCW1 1EΔ1 KS1 se integroval do chromozomu těchto transformantů (data neuváděna). Southern blot analýzy genomické DNA vyčištěné ze čtyř potenciálně nezapouzdřených transformantů odolných vůči kanamycinu (za použití výše popsaných sond) byly identické, což naznačuje, že u každého z těchto transformantů došlo ke stejné dvojité rekombinační události. Jeden z těchto transformantů byl náhodně vybrán k dalšímu studiu a byl označen jako J45-100.

Byly provedeny Southern blot analýzy genomové DNA izolované z J45 a J45-100 se sondami DNA specifickými pro gen *nptI*, 2,1 kb Bg/II-StuI fragment z pCW-11E a 2,1 kb fragment ClaI z pCW-1C (obr. 5). *nptI*-specifická DNA sonda hybridizovala k 5,0 kb fragmentu z XbaI štěpené DNA J45-100, ale ne k DNA J45, čímž se ověřilo, že marker *nptI* byl v chromozomu J45-100 (obr. 5A). Hybridizace sondy *nptI* k 5,0 kb XbaI fragmentu genomové DNA J45-100 byla konzistentní s velikostí tohoto fragmentu XbaI v suicidálním vektoru pCW1 1EΔ1 KS1 použitému k produkci J45-100. 2,1 kb Bg/II-StuI fragment z pCW-11E hybridizoval k 5,8 kb fragmentu BamHI-štěpeného J45, nikoli však k DNA z J45-100, což ověřilo, že tento fragment byl vynechán (deletován) v J45-100 (obr. 5B). Sonda specifická pro geny *cpxCBA* (2,1 kb fragment ClaI z pCW-1C) zapojené do exportu pouzdrového polysacharidu hybridizovala k 5,3 kb fragmentu XbaI jak J45 tak i J45-100 (obr. 5C). Tento výsledek prokázal, že tato část místa zapouzdření *A. pleuropneumoniae* byla nedotčena dvojitou rekombinační událostí, ke které došlo v přilehajícím regionu DNA. Sonda specifická pro pGEM-3Z nehybridizovala ke genomické DNA ani z J45 ani J45-100, čímž se ověřilo, že v genomu J45-100 nebyl obsažen žádný vektor DNA. Souhrnně, tyto hybridizační výsledky DNA naznačují, že u J45-100 došlo k žádané dvojité rekombinaci a alelické výměně.

#### Fenotypová charakterizace J45-100 - transformantu *A. pleuropneumoniae* odolné proti kanamycinu

J45-100 byl vyhodnocován z hlediska produkce pouzdrového polysacharidu hybridizačními koloniemi (koloniovým imunoblotováním) a latexovou aglutinací. Antisérum obsahující protilátky specifické pro pouzdrový polysacharid *A. pleuropneumoniae* sérotyp 5a, ne však žádné další povrchové bakteriální složky, reagovalo s J45, nereagovalo však s J45-100 (obr. 6). Protože bakteriální kolonie na membráně byly lyzovány v chloroformu, tyto výsledky naznačují, že J45-100 neprodukuje nitrobuněčné nebo mimobuněčné pouzdrové polysacharidy. Celý nebo ultrazvukově upravený J45-100 neaglutinoval latexové částice, které byly kovalentně spojeny k vyčištěné protilátce pouzdrového polysacharidu *A. pleuropneumoniae* sérotypu 5a (Inzana, 1995), zatímco celé buňky J45 a ultrazvukově upravené buňky J45-C silně aglutinovaly latexové činidlo (data nejsou uváděna). Tyto výsledky ověřily, že delece zavedená do místa *cap* *A. pleuropneumoniae* J45-100 měla za následek ztrátu biosyntézy pouzdrového polysacharidu. Dále, tyto výsledky naznačily, že nezapouzdřený mutant J45 izolovaný po etylmetansulfonátové mutagenézi (Inzana a j., 1993a), J45-C, produkoval sice nitrobuněčný, avšak nikoli mimobuněčný pouzdrový polysacharid.

Expresí apx toxinu a elektroforetické profily LPS J45 a J45-100 byly porovnány, aby se určilo, zda mutace zavedená do místa *cap* J45-100 ovlivnila tyto důležité determinanty virulence. Nebyl zjištěn rozdíl ve vylučování 105 kDa ApxI a ApxII toxinových proteinů do kultury supernatantu mezi J45 a J45-100 (obr. 7). Navíc, nebyla zjištěna žádná diference v elektroforetických profilech LPS u J45 a J45-100 (obr. 8).

Prošetřoval se růst J45 a J45-100 v TSY-N a citlivost J45 s J45-100 na baktericidní aktivitu prekolostriálního telecího séra, aby se stanovil dopad ztráty zapouzdření na tyto fenotypové vlastnosti. Růstové křivky J45 a J45-100 v TSY-N byly podobné, nikoli však identické (data se neuvádějí). Ovšem proveditelné sčítání životaschopnosti na deskách demonstrovalo, že během logaritmické fáze růstu rostl J45-100 rychleji (generační doba asi 23 minut) než mateřský zapouz-

dřený kmen J45 (generační doba asi 28 minut) (data se neuvádějí). Rekombinantní nezapouzdřený mutant J45-100 byl během 60 minut v 10 až 50% prekolostrálním telecím séru jako komplementárním zdroji efektivně usmrčen, zatímco opouzdřený mateřský kmen J45 usmrčen nebyl (obr. 9).

5

Citlivost J45-100 na sacharózu se prošetřovala proto, aby se určilo, zda by sekvence sacRB mohly fungovat jako kontraselektivní marker u *A. pleuropneumoniae* a následně indukovat excisi kartridže nptl-sacRB z chromozomu J45-100. V bujónu pěstovaný J45-100 silně rostl, jestliže byl dáván přímo na desky nebo když byl zředěn a potom dáván na desky TSY-N nebo na médium Luria-Bertani obsahující 5 % nebo 8 % sacharózy (ke kterému bylo přidáno 5 µg/ml NAD). Přítomnost sacRB sekvencí v chromozomu J45-100 byla ověřena metodou Southern blotting. Tyto výsledky naznačují, že buď marker sacRB nebyl v *A. pleuropneumoniae* exprimován nebo je možné, že fruktosanový produkt vytvořený sacRB fruktosansacharózou za přítomnosti sacharózy nebyl toxický pro J45-100.

15

Intratracheální nákaza prasat rekombinantním nezapouzdřeným mutantem *A. pleuropneumoniae* J45-100.

20

Rekombinantní nezapouzdřený mutant J40-100 podávaný v dávkách 3 x a 6 x ( $1,45 \times 10^7$  CFU a  $2,95 \times 10^7$  CFU) 50 % smrtelné dávky ( $LD_{50}$ ) zapouzdřeného mateřského kmene J45 ( $5 \times 10^6$  CFU) (Inzana a j., 1999a) (tabulka 2) nezpůsoboval úmrtnost prasat. Na rozdíl od toho se u tří prasat nakažených 6,5 násobkem  $LD_{50}$  J45 rozvinulo vážné poškození plic a uhynula (tabulka 2).

Tabulka 2

25

VIRULENCE <i>A. pleuropneumoniae</i> J45 A J40-100 PRO PRASATA				
Nákazový kmen	Nákazová dávka	Počet pozitivních/celkový počet zkoušených		
		Průměrný stav poškození plic	Úmrtnost	Znovuzískání <sup>a</sup>
J45	$1,6-3,3 \times 10^7$ CFU <sup>b</sup>	4+	3/4 <sup>c</sup>	4/4
J45-100	$1,5 \times 10^7$ CFU	0	0/5	0/5
J45-100	$3,0 \times 10^7$ CFU	1+	0/5	2/5 <sup>d</sup>
J45-100	$8,4 \times 10^7$ CFU	1+	1/4 <sup>e</sup>	4/4 <sup>d</sup>
J45-100	$1,8 \times 10^8$ CFU	2+	0/4	4/4 <sup>d</sup>
J45-C <sup>f</sup>	$1,7 \times 10^8$ CFU	1+	0/2	2/2 <sup>d</sup>
<sup>a</sup> Znovuzískání nákazového kmene ze vzorku plic odebraného při pitvě. Prasata byla nakažena J45-100, a byla pitvána 4 dny po nákaze.				
<sup>b</sup> Tato dávka je 6,6 násobkem 50% smrtelné dávky ( $5 \times 10^8$ CFU), uváděné v předcházející studii (Inzana a j., 1993a).				
<sup>c</sup> Všechna prasata v této skupině uhynula během 36 hodin po nákaze.				
<sup>d</sup> <i>A. pleuropneumoniae</i> byl znovu získán z plic a nedostatkem iridescence a neschopností aglutinovat senzitivované latexové částice specifické pro sérotyp 5 bylo potvrzeno, že není zapouzdřen.				
<sup>e</sup> Pitva jednoho uhynulého prasete naznačila, že smrt byla následkem špatného podání nákazové dávky.				
<sup>f</sup> J45-G je chemicky indukovaný, nezapouzdřený mutant, který byl již dříve charakterizován.				

30

Pět prasat nakažených nižší dávkou J45-100 ( $1,45 \times 10^7$  CFU) nevykazovalo žádné klinické symptomy charakteristické pro prasečí pleuropneumonii tj. současný zánět pohrudnice a plic, a nedošlo u nich vůbec k poškození plic. Dále, *A. pleuropneumoniae* nebyl kultivován z plicních vzorků odebraných při pitvě čtyři dny po nákaze. Dvě z pěti prasat nakažených vyšší dávkou J45-100 ( $2,97 \times 10^7$  CFU) byla klinicky normální a při pitvě nebylo pozorováno žádné poškození plic. Jedno prase z této skupiny nakažené vyšší dávkou J45-100 vykazovalo střední dušnost a při pitvě bylo pozorováno určité překrvení plic a mírné krvácení (hodnocení poškození plic = 1+).

Zbývající dvě prasata v této skupině vykazovala mírnou dušnost a při pitvě byla pozorována jistá pleuritida a zhojení (poškození plic = 2+). *A. pleuropneumoniae* J45-100 byl kultivován pouze z těchto dvou prasat s nejzávažnějším poškozením plic. Bakterie získané z těchto prasat nesrážely latexové části aglutinačního činidla sérotypu 5a. V důsledku toho takto získané bakterie byly stále nezapouzdřené, což naznačuje, že J45-100 se in vivo nezměnil zpět na zapouzdřený fenotyp.

Třebaže geny nptI (dává rezistenci vůči kanamycinu) a SacB/SacR (dává citlivost vůči sacharóze) byly klonovány do delečního místa, tyto geny byly zamýšleny pouze k tomu, aby byly použity jako markerové geny. Je možné použít i alternativní markerové geny. Může být také výhodné vyhnout se použití markeru rezistentního proti antibiotikům, jako je nptI z důvodů zdravotních a bezpečnostních, nebo získat mechanismus pro konzervování nebo inaktivaci antibiotického markeru. Vhodné neantibiotické markery by mohly zahrnovat odolnost vůči rtuti.

Nezapouzdřený kmen *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotyp B produkováný podle výše uvedených postupů produkuje pouze dva ze tří toxinů produkovaných *Actinobacillem pleuropneumoniae*. Třebaže modifikovaný *Actinobacillus pleuropneumoniae* je ochranný a imunogenní, může být také užitečný pro klonování třetího genu toxinu RTX do delečního místa. To se může provést klonováním genu toxinu RTX do kazety genu kanamycinu kmene J45-100, a takto inaktivovat kanamycinový gen.

Vakcína by měla být přednostně poskytována formou podobnou ostatním vakcínám, která je v oboru běžně známá. Je výhodné, aby vakcína byla v lahvičkách jako lyofilizovaná směs a může obsahovat jeden nebo více sérotypů mutantních kmenů. Aby se uchovala životnost, měla by obsahovat také látky jako Columbijský bujón, trehalózu nebo albumin, glycerin nebo některá jiná činidla. Obsah lyofilizované směsi by bylo pouze třeba znovu hydratovat sterilní vodou nebo fyziologickým roztokem a aplikovat injekcí (intramuskulárně, nitrožilně, intraperitoneálně, subkutánně atd.). Vakcína by mohla být také formulována pro jiné způsoby podávání (například orálně, transdermálně, pod jazykem atd.) za použití vhodné nosné matrice, například škrob, polysacharidy, oleje, liposomy, pryskyřice atd.

Dávka vakcíny podávaná zvířeti bude záviset na takových faktorech, jako je stáří nebo pohlaví zvířete a na způsobu podání. Ve všech případech by mělo být poskytnuto dostačující množství živého, avirulentního, nezapouzdřeného *Actinobacillu pleuropneumoniae* tak, aby se zvýšila imunitní reakce vakcinovaného zvířete. Úspěšné výsledky byly získány dvěma imunizacemi v rozpětí 2 až 3 týdnů v množství 10<sup>9</sup> kolonií vytvářejících jednotek (CFU).

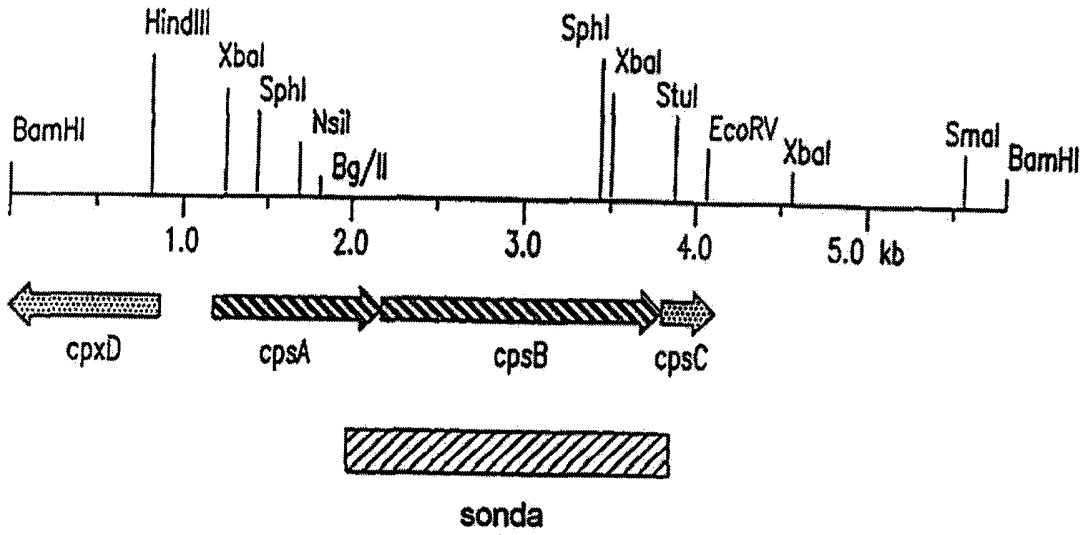
Třebaže vynález byl popisován z hlediska jeho nejvýhodnějšího provedení, ti, kdo jsou zběhlí v oboru, rozeznají, že vynález může být dále modifikován v duchu a rozsahu připojených nároků.

## PATENTOVÉ NÁROKY

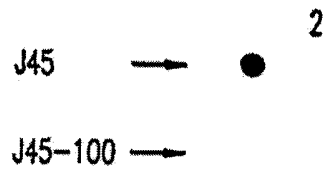
- 5
1. Vakcína, **v y z n a ě n á t í m**, že sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, postrádající DNA sekvence, kódující syntézu pouzdra.
- 10 2. Vakcína podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, která má DNA sekvence kódující syntézu pouzdra lokalizované před hybridizačním místem *BamHI-XbaI* fragmentu v pCW-1C, postrádající tyto sekvence.
- 15 3. Vakcína podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že sestává z avirulentní nezapouzdřené, geneticky modifikované bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, která má DNA sekvence kódující syntézu pouzdra lokalizované před genem na export pouzdra, postrádající tyto sekvence.
- 20 4. Vakcína podle nároku 3, **v y z n a ě n á t í m**, že genem na export pouzdra je *cpxD*.
5. Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, pro imunizaci prasat proti pleuropneumonii.
6. Vakcína podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, pro imunizaci prasat proti pleuropneumonii injekcí vakcíny nitrosvalově nebo podkožně.
- 25 7. Způsob přípravy vakcíny k prevenci nemocí způsobených bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae* podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se provede nejprve identifikace genů kódujících syntézu pouzdra v uvedené bakterii a poté delece genů kódujících syntézu pouzdra, za získání nezapouzdřeného mutantu uvedených bakterií.
- 30 8. Způsob přípravy vakcíny k prevenci nemocí způsobených bakterií *Actinobacillus pleuropneumoniae* podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se nejprve provede identifikace DNA sekvencí kódujících syntézu pouzdra v bakteriích, které jsou lokalizované před hybridizačním místem *BamHI-XbaI* fragmentu v pCW-1C, a poté delece uvedených DNA sekvencí kódujících syntézu pouzdra za získání nezapouzdřených mutantů uvedených bakterií.
- 35

40

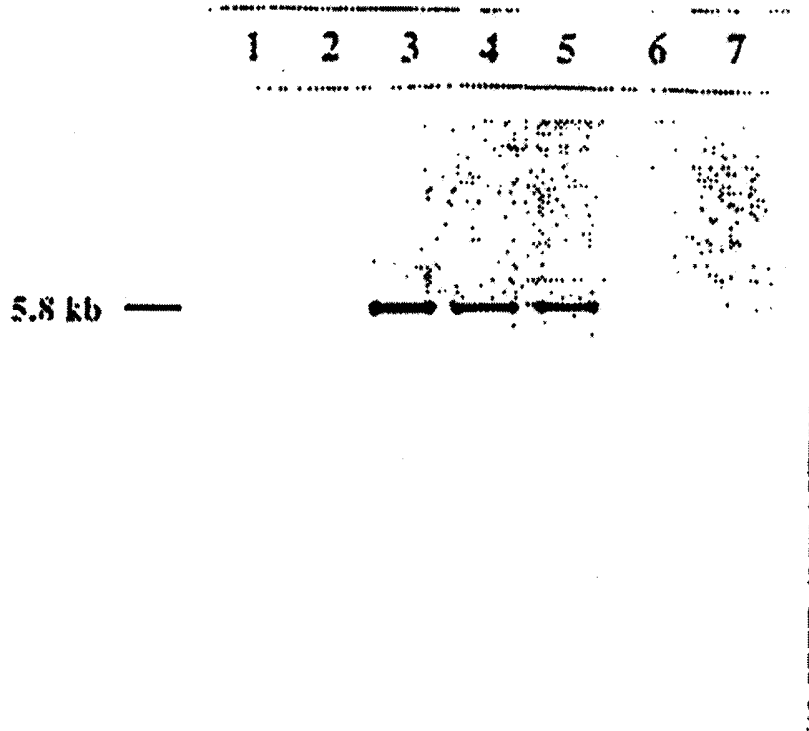
10 výkresů



Obr. 1



Obr. 6



Obr.2

AAGCTTGACCAGGCAGCCAACTAGCAACCAGCCCAAGAAAGGAGTAATCTAAGTTGATGAGTTTCATCTAATTTCTCTCAATATATAAGCAATAACAC 105  
TATATAGGTATGTCTTAAATCCACATAAAGATTGATTTAATAAGTTACCTAATCAAGAGAAATTAATATAAGAAATTTACAACAATTAATAATGTATTT 210  
TTTTAAAAAAGTAATCAAGAGGGCGTTATACAGATAACATTATAATTTAAAGCCATATAAAATACGGAGTTTCCCCTAGATAGTTGATAAATTTCTCA 315  
TTATATTATCAAATCCGATGAAAAATTTATCAACTATCTAGGGTAACGCCATAACGTTTCGTATTCAGGAGTATTTTAAATGTCTAGCATAATGACTCGT 420  
CCTATAATTAATCATGTAATGTCTAGAGATATTCAAAGTGGCATAATTAAGTCTATTTTGAATATTTTACTGATTTGGTTCCAATGAATTTCAACATATTGC 525  
P I I N H Y W S R D I Q S G I F S S I L E Y F T D F G S W E F Q H I Y  
AGTGTATCTCCAATACCTGAAGCTAAAGTTTATCACTATCACCGTCCACACCTAGAGAAAAATTAACCTAATTCGTTGTACAGTACATCATGACCTCAAT 630  
S Y S P I P E A K V Y N Y H R P H L E E K L L P H S Y C T V H H D L N  
GATCCAGATCCTGGCATGCTAAGTATAGATTATTCCTAGATATATGGAAGCTGGGGCTATAATTTGTTAAATTACACTCAAAAAGAAATTTAATATCTCAG 735  
D P D P W H A K Y R F I P R Y W E A G A I I C L N Y T Q K E I L I S Q  
CGACTCCGGACATAAGTATTTGTGATTCCTCAGGATATAATCAAAAAGTATATTTCCTAAGAAATTAAGAATATCAAGTACAGATAAAATACCTTA 840  
G L P E H K L F Y I P H G Y W Q X V L F P X X I X E I S S T D K I J L  
CGAATTCCTTACCGAGATATGCTAGAAGGTAAGGAGATGCATATTTATTGATTAGCAAAAAGATTAATCCAGACCATTTTAAATTTATTTTGTGGT 945  
G I A S R R Y G R R Y K G D A Y L F E L A K R L H P D H F K F I F Y G  
AAAGATAGACATATAGTGCCTAGAATGCAAGATCTAGGATTTGAAGCTCAAGTATATGAAGATTGCCATATAGAAATGTTTCAAGTTTTATATAATATT 1050  
K O R Q Y S A L E W Q D L G F E A Q V Y E R I P Y R V F Q S F Y W H I  
GATGTACTACTTATGTGTAGTATCATGAAGGTGGACCTGCAATATCCCGAAGCATTAGTACTGGACACCTATATTTTCACTAACATAGGTATAACCTAAG 1155  
D Y L L W C S S H E G G P A N I P E A L A T G T P I F S S H I G I P K  
GATGTTGTTATTATAAAGATGGGTGATTCTAACCTTAGATCCAGATATAGATGCTGAACAGATTAATTTTATTTGCTTGA AAAACCAATATATTGAA 1260  
D Y V I N Y K H G L I L T L D P D I D A E Q I N F I C L E X P H I F E  
AATATATTAGATTTTCACTAAAACAGTCTCCAGTTTAGCAATTTCTGGGAGAAATGATTCAACAAAATATTTAGTTTATAAAAAAATAAATAGCGTTAA 1365  
K I L O F S L X Q S P S L A I S W E X C I Q Q H I L Y Y K K I I K G  
TTATGTCATTCTATTCTAGTACCTGATCTTTACACATTAACAAAAGAACTTAGTTCATTCTTCAGTTGGATTGAGAAAAATAAATAAATATCCATTTG 1470  
CpsB →  
W S I S I L Y P D S L H I N K R N F S S F F S W I E X N K I N I H F  
AAAAATAAATAAGATTGATTCATTATATGGTTTTACGATTCAAAATGGGTATTCTATATGAGAAATAGATATTCTACTAAGATTGAAGAGGAAT 1575  
E K N N K D W I S L Y G F Y D S K L G I L Y E K I D I L T I E E E E

Obr. 3a

TATTGCTTTTGTGTTATGATCTAAATATTTTCAATATTTCTAGAGCTCAATTATATCTTTAGTAGCCACAAGACCCGAATGGTATATGAGATTATCCTA 1680

L F A F C Y Y D L N I F N I C R A E L L S L Y A T R P E W Y H E D Y P  
ATAACTTAAGAGAAATATACAAAACTCTATACTAATAATCGAAGTGAATTATTGCAAAACATCGCTGCTTGGTATTGGSTTGATTCTGCAAAAAACGCC 1785

N N L R E I Y K K L Y T H N R S E L L Q N W A A A W Y V Y D F W X K R  
TATCTGAGTTAAACAATTCTCTCATTGTGTGATTTCAGGAGGTTAATTATCAAAAATCTTTGATTGAGTTATAAAATATACTCCAACTAAAGTATGG 1890

L S E L X O F S H C C Y F S G G L I Y Q X S L I E L L X Y T P T K Y W  
TTATGGAAGCCTATTACAGAAACGAATATTATTGAGGAACTTATCATCAATTGCTAATAATAGCCATTATAACATTAGCTATTTTAACTCTTATA 1995

Y W E S L F T G H E Y Y C E E R Y S S I A N N S D I X H L A I F N S Y  
AAAAACATTACTCAAAAAGTGAATATGATAAGGAACGAATCAAGCTATAAAGTTCTTATAATGAAAATAAGATGCCAACCACTACTGATCTG 2100

K K T F S S K S E Y O K E R M X A I N K F L L M K N K K V Q O P T D S  
AAATATTAGTATTTAAACAACAAAACCAATTAATTACTATTATTGGACAAGTGATAAATGATTTTTCAGTCTAGAAATAAAGGAGAGGACTATCAACAATTA 2205

E I L Y F K Q Q K P I I T I I G Q V I N D F S V L E Y K G R G L S T I  
AAATCTAAGAAGACTTATATCTAAACTATCAGAGAAATGGATTTAATGTAGTATTAAAAACCTCACCCCTGGGAAGAGAAAAAATAATATCCGTACATCTTTAA 2310

K I Y K E L I S K L S E N G F N V Y L K T H P W E E K X N H I R T S L  
CTAAAAATATAAGAGAATTTCTAAAAATCTAACTGAGATCAACAAGATGTATAAAAATAGTTGATCACTATTCAATAAGAAATATTATTAACAATCTG 2415

T X N I I E E F L K N L T E N Q Q E C I X I V D H Y S I X K L F K Q S  
ATTTATATTAGTTAAATTTCTCAAGCCCTCTTGAAGCTGCAATTTGATGTTATAAAACCTATACAGTTAGGTAATGCTTTTATGGAAAAAGGATTCAGCT 2520

D F I I S L W S O G L L E A A F D G I K P I Q L G N A F Y G K K G F T  
ACGATATGACTTTTTAGATATTGATCAATTTGGTAATGACTTAGTAGTAATAAATCTACTCCAACTATCTTTAGAGAGTTTGATTGTTCCGAGAGTTCA 2625

Y D Y D F L D I D Q L Y N D L V Y N K L T P T L S L E E F D L F E E F  
TTAGTATATTATACAAAAGCATGCTGTTCTATTACGGCTCTGGCGTAAGTGTTTATCTAGAAATTTAATTTACTACTATTATACCATTAGTACAAATG 2730

I T I L L Q X H A V S I H A S C V S Y L S R I F N L P T I I P L V E N  
TCCCTAAGGAGAAGTCTAAACAACTACTACTCAAAAAGATGTGGTAAAAAGGAAAATACACAATTGTTAATATGTTGAGTTACCTAAAGTAGTCCAC 2835

Y P K E K S K T T L P T Q K D Y Y K K E N T T I Y W W V E L P X V Y P  
AAAGTATAAGAAATAGGAATATCAAAAATTTAGAAACAATCTCGACAATCTTTGCAGATCTAGGAATCCAGTTATTAGAAGTTAATGATTTTCCCTT 2940

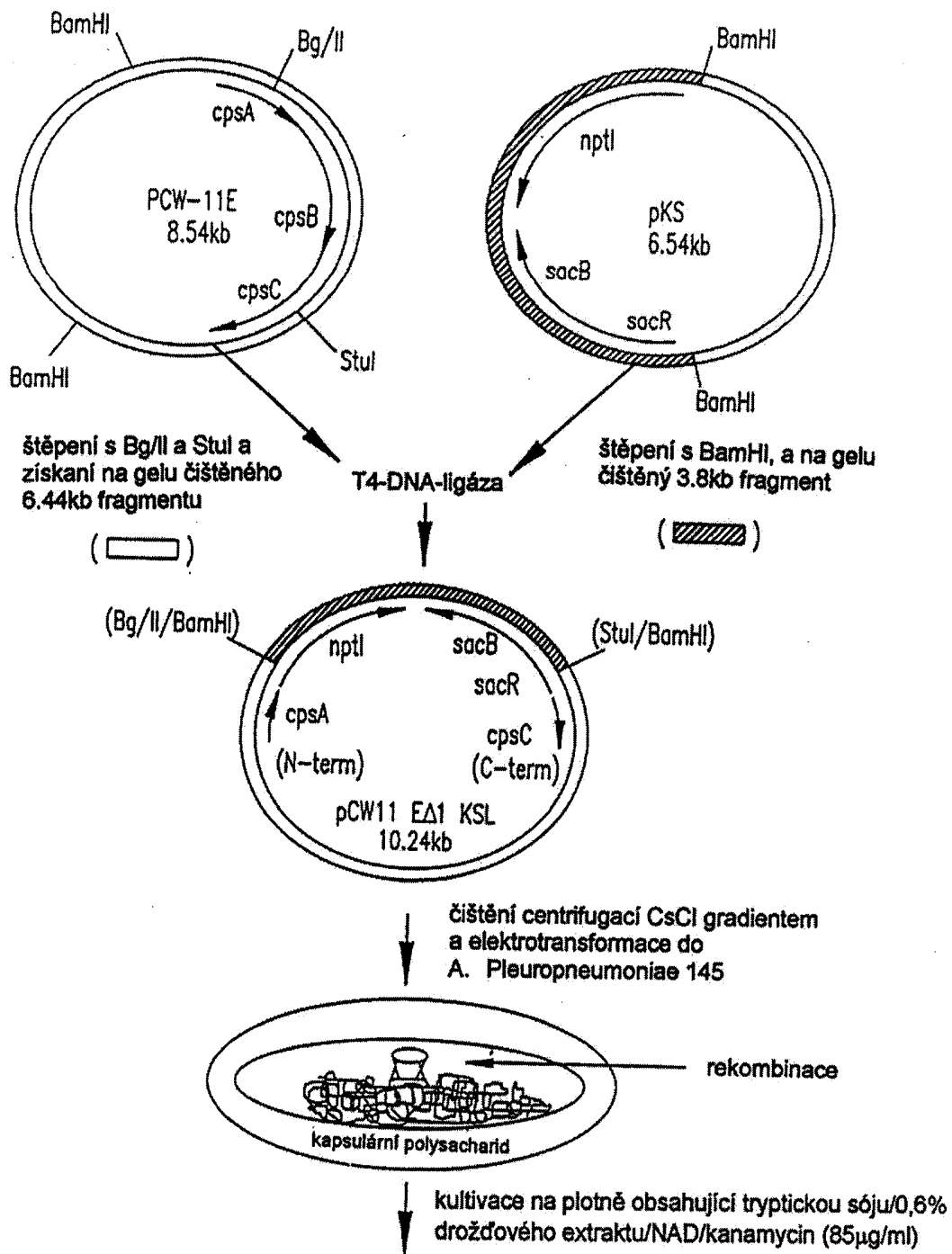
Q S D K N R K Y Q K F R N K P R Q F F A D S R N P Y I R S L W Y F F P  
ATAAATAATAGGTTAATTTATGTTAAAAAATATCAGCCCTTTGATTAAGAAAAATAAATGAAGCCACTCTAGTAAAGTAAAGTATTTTACATTCTGA 3045

Y X . CpsC → M L K K Y Q P F D L R K I H E G H S S N A K L Y L H S E  
GGCCTGTAATATAGCTCTAAAATCTCTAAGTTTTCTGTCCACAAGATGACATTAAATTTAGAAAATTTATTGCAACATTTACTGATAACTATAAGCACCAGA 3150

A C N I D A K I S K F F C S Q D D I N L E N F I A T F T D K Y K A P E  
AGTATATACGGCGATTTTAAAGAATGTGTATTACACCTAGACACCTAAGCTACCAAGAT 3212

V Y T A I L K N C C I T P R A P K L P R

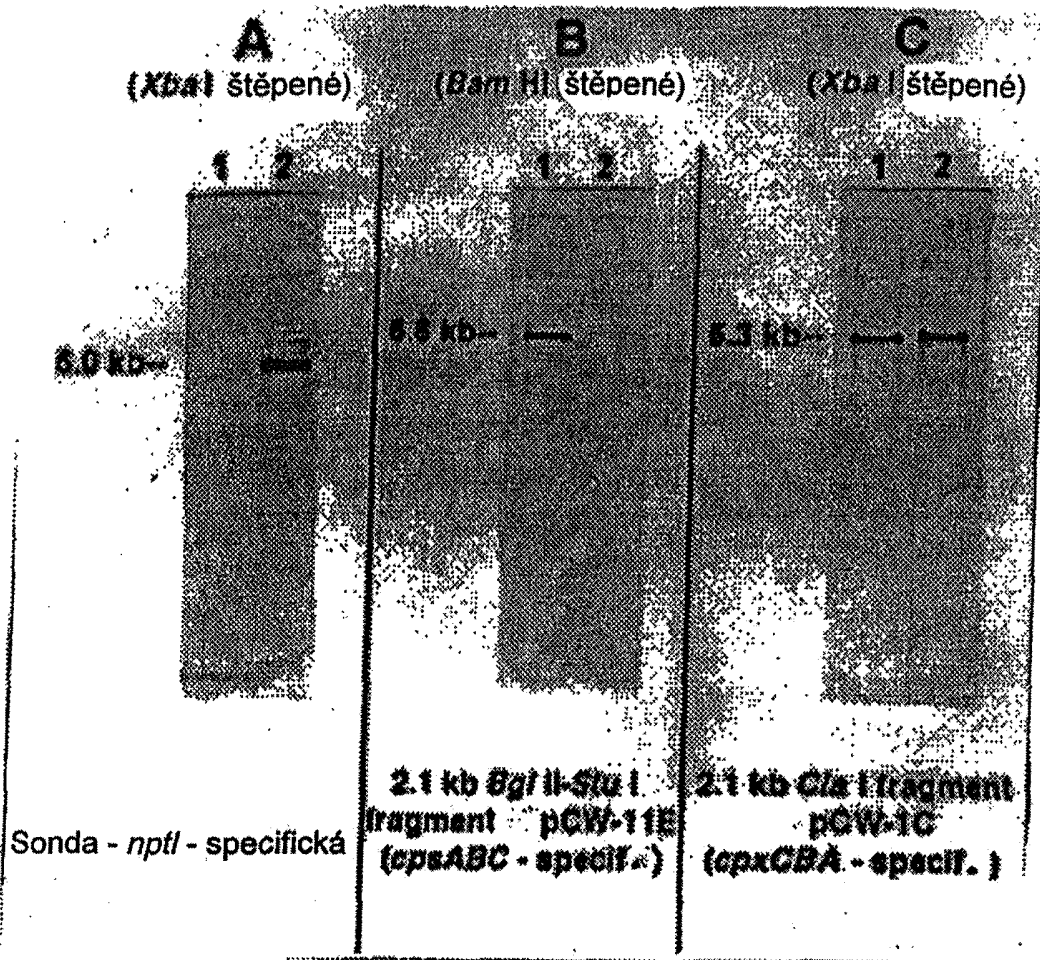
Obr. 3b



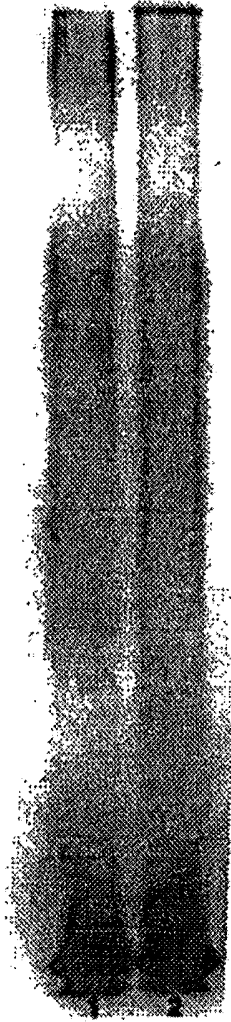
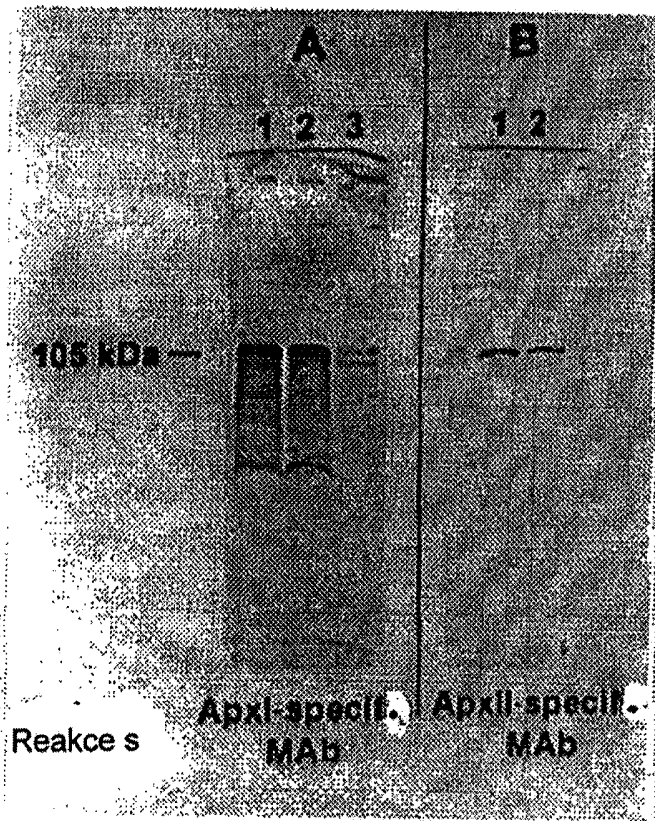
Vyšetření Kan<sup>r</sup> transformantů na:

- 1) nepřítomnost produkce kapsulárního polysacharidu (imunoblotting)
- 2) přítomnost nptI a sac-RB markerů (Southernův přenos)
- 3) absenci 2.1kb Bgl/II-StuI DNA fragmentu (Southernův přenos)
- 4) absenci sekvencí pGEM-3Z vektoru (Southernův přenos)

Obr. 4



Obr. 5



Obr. 7

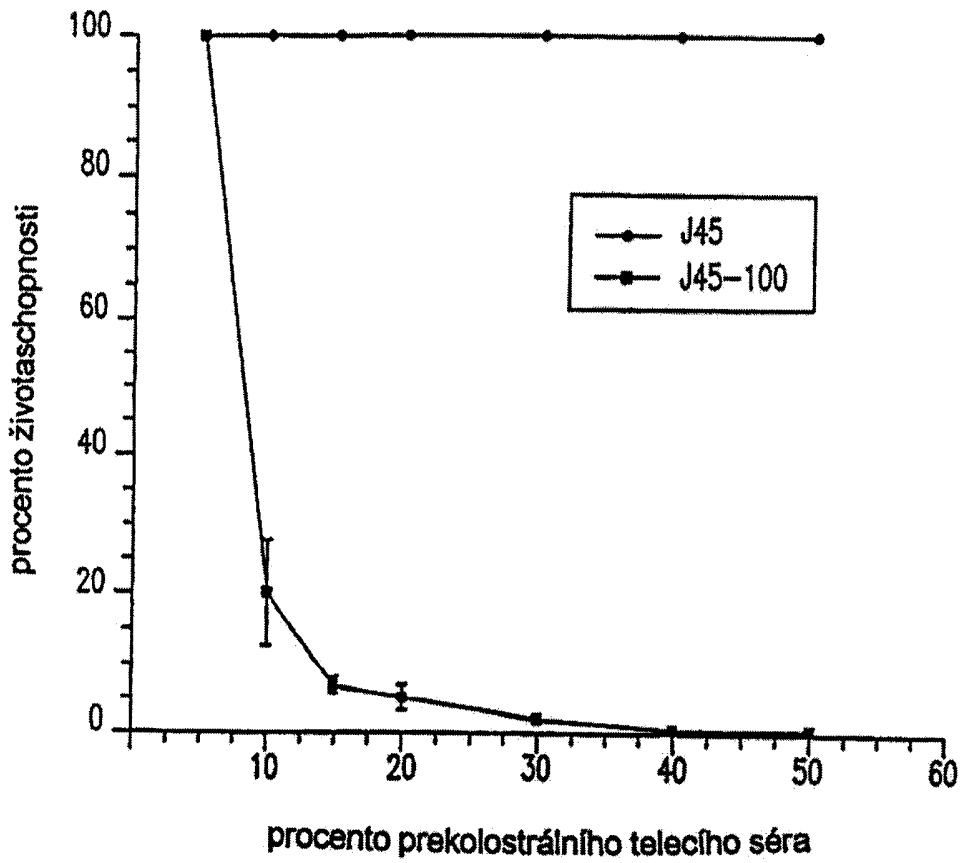
Obr. 8

CTAGACATTACATGATTAATTATAGGACGAGTCATTATGCTAGACATTAATACTCCTGAAATACGAATACGTTATGGAGTTACCCTA 90  
 GATAGTTGATAAATTTTTCATCGGAATTTTCATAAATATAAATGAGAAATTTATCAACTATCTAGGGGAACTCCGTATTTTATATGGCTT 180  
 TTAATTATAATGTTTATCTGTATAACGCCCTCTTGATTACTTTTTTAAAAAATACATTTTTTAATTTGTTTGTAATTTCTTA 270  
 TATTTAATTTCTCTTGATTAGGTAACCTTATAAATCAATCTTTATGTGGATTTAAGACATACCTATATAGTTGTTATTCCCTAATATA 360  
 TTGAAGAGAAATTAGATCAAACTCATCAACTTAGATTACTCTTTCTTTGGGGCTGGTGTCTAGTTGGCTGCCTGCTCAAGCTTACCC 450  
 CpxD → M K L I K L R L L L S L G L V A S L A A C S S L P  
 ACTTCAGGCCCTAGCCATAGTGGGATTTAGAGGCTAATCCAGAACTCAGATAAACCTTTACCGGAAGTTAATTTAGTGGAGTTAGAT 540  
 T S G P S H S A I L E A N S Q H S D K P L P E V N L V E L D  
 AATGGCTTAGTTCAGCAGTTGTATCAGACTCAGCAAAGTCAGCAATTTCCGGCTTTTAGGCACGGCTGGCGGTGCTGGATATGCGGT 630  
 N G L V Q Q L Y Q T Q Q S Q Q F S G F L G T A G G A G Y A G  
 GCGGTCAATGTGGGGATGTTCTTGAATTTCAATTTGGGAAGCCACCAGGCTGTTGTTGGCGGTACTTTTAGTCTGAAGGCCAA 720  
 A V N V G D V L E I S I W E A P P A V L F G G T F S S E G Q  
 GGTAGCGGGCATTAAACGAATTAACGGCGCAATGTTAACCAAAACGGTACGGTACTGTCCGTTTGTGGTAATATTCTGTTGCA 810  
 G S G H L T Q L P A Q W V N Q N G T V T V P F Y G H I R V A  
 GGTAAAACACCGAAGCGATTCACTCTCAATTTGTTGGGCATTGCAACGTAAGCGAATCAGCCACAAGTATTAGTAAAATTCGCAAT 900  
 G K T P E A I Q S Q I V G A L Q R X A N Q P Q V L V K I A N  
 AATAACTCTGCGGATGTACGGTATTCTGTCAGGTAACAGTATTCTGATGCCGCTGAGTGCGAATAACGAACGTGTGTAGATGCTGTT 990  
 N K S A D V T V I R Q G H S I R W P L S A N N E R Y L D A Y  
 GCAGCAGTAGGGGTACAACGAAATATTGAAGACGTTACCGTAAAATTAACCTGTTGGCTCGCAAGTCAAAACATTAGCGTTTGAAC 1080  
 A A V G T T E N I E D V T V K L T R G S Q V K T L A F E T  
 CTAATTTCCGATCCGGCCAAAATATTATGACGTCGCCGGCAGTGTGTTTCGTTGCTAAACACGCCCTTATAGCTTTACCGGTTAGGT 1170  
 L I S D P A Q N I W L R A G D V V S L L N T P Y S F T G L G  
 CCGGTGGTAACAACAGCAAATGAAATTCAGTAAGGAATTACGCTTCCGAGCTATCGGTAAGATGGTGGCCTAATTGATACT 1260  
 A V G N H Q Q W K F S S K G I T L A E A I G K W G G L I D T  
 CGTTCGGATCCGAGAGGGTATTCTGCTCCGTCATGTGCCTTTTTCTCAATTAAGTTTAGATCAGCAACACAATGGGAGCGAAAGGC 1350  
 R S D P R G V F V F R H Y P F S Q L S L D Q Q T Q W G A K G  
 TATGGTATGGGTATGGATGTACCGACGGTTTATCGTGTGAATTTACTTGAGCCGCAATCACTGTTTTTATTACACGCTTCCCGATGCAA 1440  
 Y G W G W D V P T V Y R V N L L E P Q S L F L L Q R F P W Q  
 GATAAAGATATTGCTATGTATCAATGCACCGTTGTCGAATTCAAAAATTTCTGAGAATGATTTTCTCGATTACTTCCCGGTTACA 1530  
 D K D I V Y V S N A P L S E F Q K F L R W I F S I T S P V T

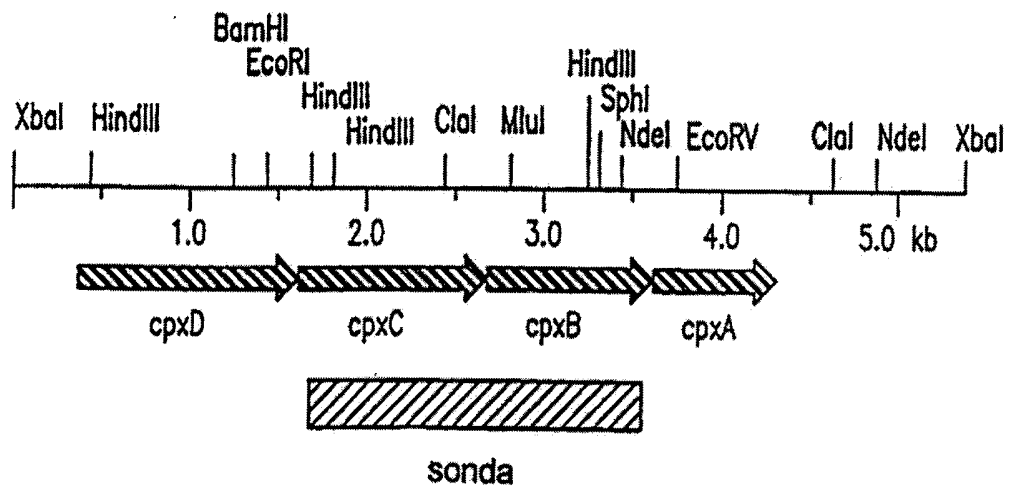
Obr. 10a

AGTACGACTAATGCTATTCGTGCCTATTAATATATTGAATTTATAAGGATAAAATATGAAACAACCTATTACGGCAAGTCCGACAGAAAA 1620  
 S T H A I R A Y CpxC → W E T T I T A S P T E K  
 ACTACAAAAACCGTTAAACAGAAAAAAGTTGGTTAAAAAGCTTAATCCGTTATTTGGGTAAGTGTAGCGATTCTACGGTATTATC 1710  
 L Q K P V K Q K K S W L K K L H P L F W V T V A I P T V L S  
 AGCCTTTATTTCCGTTCTGTTCCTCCGATTTATATTTCCGGAATCAAGCTTCGTTGTAAGATCTCCTCAAATCAGACCGCTTTAAC 1800  
 A F Y F G S V A S D I Y I S E S S F V V R S P Q N O T A L T  
 CGGTGCGGTCCCTTATTACAAGGTTCCGGATTTCTCGAGCTCAAGATGATACTTATACCGTACAAGAATATATGCATTCTCGTACGGC 1890  
 G V G A L L Q C S C F S R A Q D D T Y T V Q E Y W H S R T A  
 ACTAGAACAGTTAATGAAAGACTTCCCAATACGTGAATCATGAGAAATCAAGGGCATATTATCGCTCGCTTAAATGGATTGGTTAAA 1980  
 L E Q L W K D L P I R E Y Y E N Q G D I I A R F R G F G L N  
 TAATAGTAAAGAAGCGTTTATAAATATTTCCGAGATCCGTTAAGTGTGGACTTTGACTCTGTTCCGGTATCGCCAGCTTACGTATTCCG 2070  
 N S K E A F Y K Y F R D R L S V D F D S V S G I A S L R I R  
 AGCATTIACCGGAAGAGGGCAACAATAATCAAAAATTACTGCCGAAGGTGAAACCGCTTATAACCGTTTAAACGAACGTGCAAC 2160  
 A F N A E E G Q Q I N Q X L L A E G E T L I N R L N E R A R  
 AAAAGATACCATTTCATTTGCCGAACAACCGGTTACACAACCGGAAAAATATGTAACCAAACGGAAATGCTTTAAGTAAATACCGTAT 2250  
 K D T I S F A E Q A V T E A E N H Y N E T A N A L S K Y R I  
 CAAAAATAAATCTTTGATTACCGGCACAATCCGGCGTACAACCTTCATTAATTTCCAGCCTAAAAAGCGAATTGATTGCTGTAGAAAC 2340  
 K N K I F D L P A Q S G V Q L S L I S S L K S E L I R V E T  
 ACAATTGCCCAATTGCAATCTATTACACCGGACAACCCACAAGTTGATGCAATTGCTTATGCGCCAAAAAGTTTACGTAAGGAATCGA 2430  
 Q L A Q L Q S I T P D N P Q V D A L L W R Q K S L R K E I D  
 TGAGCAATCAAAACAGCTTCCAGTAACAGTAATAGCTTATTGCTATTCAAAGTCCCGATTACCACCGCTTACTGCAAAACGAGCT 2520  
 E Q S K Q L S S N S N S S I A I Q T A D Y Q R L V L A N E L  
 GGCACAGCAACATTTGACCGCAGCATTAACTCATTACAAAATACGAAAAATGAAGCGGATCGCCAGCAACTTTATTAGAAGTATCAG 2610  
 A Q Q Q L T A A L T S L Q N T K N E A D R O Q L Y L E V I  
 TCAGCCAGCAAAACCGGACTGGCGGAAGAGCCCTTATCCCTTATATAATATTTAGCCACATCTTTATCGGTCTGATGCTTTATGGTGT 2700  
 Q P S K P D W A E E P Y R L Y N I L A T F F I G L W L Y G V  
 ATTAAGTTTATTAATGCAAGCGTAAGAGAGCACAAAACTAATGCAATACGGTGATCAAAACACTTTCCGCCAATCTCTGCCATTCAA 2790  
 L S L L I A S V R E H K N  
 GGGAGAGTAATCGGTGCTTACTCATCGGGAAATATTACCGGTTACGGACGAAAAATTTGGGTTTTTATGGCTGTTTGTGAGCCG 2880  
 G R V I G A L L W R E I T R Y G R K N L G F L W L F V E P  
 CTATTACTCATTATTATCGTTTGTATGGAAATTTATCCGACGGGATCGCGTTCCGATTTAAATATTGCTTTTGTGATTACC 2970  
 L L L T L F I V L W W K F I R A D R V S D L H I A F V I T  
 GGTIATCCAATGCCATGATGTGGCTAATGCGTCAAACCGCACTATCGGTGCAATTTCCGGTAACTGAGTCTTCTTATCATCGTAAT 3060  
 G Y P W A W W W R N A S H R T I G A I S G N L S L L Y H R N  
 GTCCGGTATTAGATACCTTACTGCTCGTGCATACTGAAGTAGCAGGTGCAACGATTGCCAAATCATTATTATGCCATTAGTCAAT 3150  
 Y R V L D T L L A R V I L E V A G A T I A Q I I I W A L V I

Obr. 10b



Obr. 9



Obr. 11

Konec dokumentu