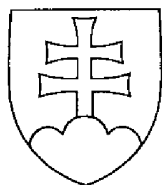


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288294

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2015.01):

C12P 13/00
C07K 14/00
C12N 1/00
C12N 15/00
C12R 1/00

- (21) Číslo prihlášky: **50038-2008**
(22) Dátum podania prihlášky: **22. 12. 1999**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **RU 98123511**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **23. 12. 1998**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **RU**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **11. 7. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **07/2000**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **3. 7. 2015**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky: **1843-99**
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(96) Číslo podania európskej patentovej prihlášky:

(73) Majiteľ: **AJINOMOTO CO., INC., Chuo-ku, Tokyo, JP;**

(72) Pôvodca: **Livshits Vitaliy Arkadyevich, Moscow, RU;**
Zakataeva Natalia Pavlovna, Moscow, RU;
Aleshin Vladimir Veniaminovich, Moscow, RU;
Belareva Alla Valentinovna, Moscow, RU;
Tokhmakova Irina Lyvovna, Moscow, RU;

(74) Zástupca: **Fajnorová Mária, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob produkcie L-aminokyselín**

(57) Anotácia:

Vynález sa týka spôsobu produkcie L-aminokyselín, najmä L-homoserínu a L-treonínu, a aminokyselín s rozvetveným reťazcom, najmä L-valínu a L-leucínu, s použitím baktérií, ktoré patria do rodu *Escherichia*, s vyšším výťažkom. Baktériou použitou v spôsobe podľa vynálezu je baktéria, ktorá má schopnosť produkovať aminokyselinu a v ktorej je posilnený gén *rhtC*, kódujúci proteín, ktorý má schopnosť podieľať sa na tvorbe baktérie, ktorá má proteín odolný proti L-treonínu. Výhodne je to baktéria, v ktorej je ďalej posilnený *rhtB* gén, kódujúci proteín, ktorý má schopnosť podieľať sa na tvorbe baktérie, ktorá má proteín odolný proti L-homoserínu, pričom táto baktéria sa kultivuje v kultivačnom prostredí na produkciu a akumuláciu aminokyseliny v prostredí a aminokyselina sa získa z uvedeného prostredia.

SK 288294 B6

Oblasť techniky

Vynález sa týka biotechnológie, bližšie sa týka spôsobu výroby aminokyselín; týka sa najmä spôsobu výroby L-homoserínu, L-treonínu, L-valínu a L-leucínu s použitím baktérií, ktoré patria do rodu *Escherichia*.

5

Doterajší stav techniky

Pôvodcovia tohto vynálezu pripravili mutant *E. coli* K-12, s mutáciou *thrR* (v tomto texte označovanú ako *rhtA23*), ktorá sa týka odolnosti proti vyšším koncentráciám treonínu alebo homoserínu v minimálnom médiu (Astaurova O., B. et al., Appl. Bioch. and Microbiol., 21, 611 až 616 (1985)). Uvedená mutácia umožnila zlepšenie výroby L-treonínu (patent SU 974 817), homoserínu a glutamátu (Astaurova O. B., et al., Appl. Bioch. and Microbiol. 27, 556 až 561 (1991)) s použitím príslušných produkčných kmeňov *E. coli*.

10

Pôvodcovia tohto vynálezu ďalej zistili, že *rhtA* gén jestvuje v 18 min na chromozóme *E. coli* a že *rhtA* gén je identický s ORF1 medzi génmi *pexB* a *ompX*. Celok, exprimujúci proteín kódovaný s ORF sa označil ako *rhtA* (*rht*: resistance to *h*omoserine and *t*hreonine). Uvedený gén *rhtA* zahŕňa 5'-nekódujúcu oblasť vrátane sekvencie SD, ORF1 a terminátor. Pôvodcovia tohto vynálezu teda zistili, že divoký typ *rhtA* génu sa podieľa na odolnosti k treonínu a homoserínu, ak je klonovaný v násobných kópiách (multicopy state), a že uvedená *rhtA23* mutácia je substitúcia A-za-G v polohe -1 vzhľadom na štartovací kodón ATG (Abstracts of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, spojený s Výročnou konferenciou (1997) Am. Soc. for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, CA USA, 24. až 29. augusta 1997, abstrakt 457).

15

20

Zistilo sa, že počas klonovania *rhtA* génu v *E. coli* jestvujú najmenej dva rôzne gény, ktoré dodávajú odolnosť proti treonínu a homoserínu. Jeden z týchto génov je gén *rhtA* a ďalší zistený gén bol gén *rhtB*, ktorý vnáša odolnosť proti homoserínu (Ruská patentová prihláška 98 118 425).

25

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je spôsob produkcie aminokyseliny, predovšetkým L-homoserínu, L-treonínu a aminokyselín s rozvetveným reťazcom s vyšším výťažkom.

30

Pôvodcovia vynálezu zistili, že oblasť 86 min na chromozóme *E. coli*, ak je klonovaná viacnásobne kopírujúcim vektorom, dodáva bunkám *E. coli* odolnosť proti L-homoserínu; pôvodcovia vynálezu ďalej zistili, že v protismernej oblasti jestvuje ďalší gén, gén *rhtC*, ktorý spôsobuje odolnosť proti treonínu; ďalej zistili, že amplifikáciou týchto génov sa môže zlepšiť aminokyselinová produktivita baktérií *E. coli*, podobne ako pri géne *rhtA*. Na základe uvedených zistení vznikol tento vynález.

35

V súvislosti s uvedeným spôsobom bolo zistené nasledovné:

1) Baktéria použitá v spôsobe podľa vynálezu patrí k rodu *Escherichia*, pričom jej rezistencia proti L-treonínu je zosilnená posilnením aktivity proteínu definovaného v nasledujúcich odsekoch A) alebo B) v bunke tejto baktérie:

40

A) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 4; alebo

B) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín aminokyselinovej sekvencie SEQ ID No.:4 a ktorý má schopnosť urobiť baktériu, ktorá obsahuje uvedený proteín, odolnou proti L-treonínu;

45

2) Baktéria, ako je opísaná v bode 1), pričom jej rezistencia proti L-homoserínu je zosilnená posilnením aktivity proteínu definovaného v nasledujúcich odsekoch C) alebo D) v bunke tejto baktérie:

C) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 2; alebo

D) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín aminokyselinovej sekvencie SEQ ID No.: 2 a ktorý má schopnosť urobiť baktériu, ktorá obsahuje uvedený proteín, odolnou proti L-homoserínu;

50

3) Baktéria, ako je opísaná v bode 1) alebo 2), v ktorej aktivita proteínu, ako je definovaný v A) alebo v B), je posilnená transformáciou baktérie pomocou DNA kódujúcej pre proteín, ako je definovaný v A) alebo B);

4) Baktéria, ako je opísaná v bode 2), v ktorej aktivita proteínu, ako je definovaný v C) alebo v D), je posilnená transformáciou baktérie pomocou DNA kódujúcej pre proteín, ako je definovaný v C) alebo D);

55

5) Spôsob produkcie aminokyseliny, ktorý zahrnuje nasledujúce kroky:

kultiváciu baktérie, ako je opísaná v ktoromkoľvek z bodov 1) až 4), ktorá je schopná produkovať aminokyselinu, v kultivačnom médiu, na produkovanie a akumulovanie aminokyseliny v kultivačnom médiu, a izoláciu aminokyseliny z média;

55

6) Spôsob podľa bodu 5), pričom aminokyselina je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z L-homoserínu, L-treonínu a aminokyselín s rozvetveným reťazcom.

60

- 7) Spôsob podľa bodu 6), pričom aminokyselinou s rozvetveným reťazcom je L-valín alebo L-leucín.
 8) DNA, ktorá kóduje proteín definovaný v nasledujúcich bodoch A) alebo B):
 A) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 4,
 B) proteín, ktorý má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 4 vrátane substitúcie, delécie, inzercie,
 5 adície alebo inverzie jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín, a tento proteín má schopnosť urobiť baktériu, v ktorej sa nachádza, rezistentnú proti L-treonínu,
 9) DNA uvedená v bode 8), ktorá je DNA definovaná v nasledujúcich bodoch a) alebo b):
 a) DNA, ktorá zahŕňa nukleotidovú sekvenciu od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID No.: 3;
 b) DNA, ktorá hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID
 10 No.: 3, alebo vzorka pripravená z nukleotidovej sekvencie v prísnych podmienkach, a ktorá kóduje proteín s aktivitou schopnou urobiť baktériu, ktorá tento proteín obsahuje, rezistentnou proti L-treonínu.
 10) DNA, ako je opísaná v bode 9), pričom prísne podmienky sú podmienky, pri ktorých sa premývanie uskutočňuje pri 60 °C a koncentrácia solí zodpovedá 1 x SSC a 0,1 % SDS.

DNA fragment, kódujúci pre proteín určený v A) alebo B), sa môže označiť ako gén *rhtC*; proteín kódovaný génom *rhtC* sa môže označiť ako *RhtC* proteín; DNA kódujúca pre proteín určený v C) alebo D) sa môže označiť ako gén *rhtB* proteín, kódovaný génom *rhtB* sa môže označiť ako *RhtB* proteín. Účinnosť (aktivity) *RhtC* proteínu, ktorý sa podieľa na odolnosti baktérie proti L-treonínu (to znamená účinnosť, vyznačujúca sa tým, že baktéria má *RhtC* proteín odolný proti L-treonínu) sa môže označiť ako Rt aktivita a účinnosť *RhtB* proteínu, ktorý sa podieľa na odolnosti baktérie proti L-homoserínu (to znamená účinnosť, vyznačujúca sa tým, že baktéria má *RhtB* proteín odolný proti L-homoserínu) sa môže označiť ako Rh aktivita. Konštrukčný gén, kódujúci *RhtC* proteín alebo *RhtB* proteín v *rhtC* géne alebo v *rhtB* géne, možno označiť ako *rhtC* konštrukčný gén alebo *rhtB* konštrukčný gén. Výraz zvýšenie, zosilnenie alebo zlepšenie Rt účinnosti (aktivity) alebo Rh účinnosti (aktivity) znamená zvýšenie odolnosti baktérie proti treonínu alebo homoserínu alebo zvýšenie odolnosti pomocou zvýšenia počtu molekúl *RhtC* proteínu alebo *RhtB* proteínu so zvýšenou špecifickou aktivitou týchto proteínov alebo znecitlivením negatívnej regulácie proti expresii alebo aktivite uvedených proteínov a podobne. Výraz DNA kódujúca pre proteín znamená DNA, ktorej jedno z vlákien kóduje pre proteín, ak je DNA dvojvláknová. Odolnosť proti L-treonínu znamená takú vlastnosť baktérie, že baktéria rastie na minimálnom médiu, obsahujúcom L-treonín v koncentrácii, pri ktorej kmeň divokého typu uvedenej baktérie nerastie, zvyčajne >30 mg.ml⁻¹. Odolnosť proti L-homoserínu znamená takú vlastnosť baktérie, že baktéria rastie na minimálnom médiu, obsahujúcom L-homoserín v koncentrácii, pri ktorej kmeň divokého typu uvedenej baktérie nerastie, zvyčajne >5 mg.ml⁻¹. Schopnosť produkovať aminokyselinu znamená takú vlastnosť baktérie, že baktéria produkuje a akumuluje aminokyselinu v prostredí (médiu) vo väčšom množstve ako kmeň divokého typu uvedenej baktérie.

Ďalej texte sa vynález vysvetľuje podrobnejšie.

- 1) DNA použitá na kódovanie proteínu použitého v spôsobe podľa tohto vynálezu

Prvý fragment DNA, použitý v tomto vynáleze (*rhtC* gén), kódujúci pre proteín, ktorý má Rt aktivitu a má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 4. Podrobnejšie, uvedená DNA môže byť napríklad DNA, zahŕňajúca nukleotidovú sekvenciu s číslami nukleotidov 187 až 804 nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 3.

Druhý fragment DNA, použitý v tomto vynáleze (*rhtB* gén), kódujúci pre proteín, ktorý má aktivitu Rh a má aminokyselinovú sekvenciu SEQ ID No.: 2. Podrobnejšie, uvedená DNA môže byť napríklad DNA, zahŕňajúca nukleotidovú sekvenciu s číslami nukleotidov 557 až 1 171 nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 1.

Uvedený gén *rhtB*, ktorý má nukleotidovú sekvenciu SEQ ID No.: 1, zodpovedá časti komplementárnej sekvencie k sekvencii označenej prístupovým číslom M87 049 v GenBank a zahŕňa f138 (čísla nukleotidov 61 959 až 61 543 z M87 049), čo je známy, ale funkčne neznámy ORF (open reading frame, otvorený čítací rámec), prítomný v 86 min na chromozóme *E. coli* a jeho 5'- a 3'-okrajové oblasti. Uvedený f138, ktorý má iba 160 nukleotidov v okrajovej oblasti 5'-, by nemohol zvyšovať odolnosť proti homoserínu. Medzi 62 160. a 61 959. nukleotidmi M87 049 (v protismere ORF f138) nie je prítomný nijaký terminačný kodón. Jeden z ATG kodónov tejto sekvencie je navyše uprednostňovaný ribozómovým väzbovým miestom (62 171 až 62 166 v M87 049). Preto je kódujúca oblasť dlhšia o 201 bp. Väčší ORF (nukleotidy číslo 62 160 až 61 546 z M87 049) sa označuje ako *rhtB* gén.

Uvedený gén *rhtB* sa môže získať napríklad naočkováním Mucts lyzogénneho kmeňa *E. coli* použitím lyzáty lyzogénneho kmeňa *E. coli*, ako je K12 alebo W3 110, spôsobom, v ktorom sa použije mini-Mu d5005 fág (Groisman E. A., et al., *J. Bacteriol.* 168, 357 až 364 (1986)) a izolujú sa fágové DNA z kolónií, rastúcich na minimálnom médiu, obsahujúcom kanamycín (40 µg.ml⁻¹) a L-homoserín (10 µg.m⁻¹). Ako sa objasňuje v ďalej uvedených príkladoch, gén *rhtB* sa zmapoval v 86 min na chromozóme *E. coli*. Uvedený fragment DNA vrátane génu *rhtB* možno preto získať z chromozómu *E. coli* hybridizáciou kolónií alebo PCR (polymerase chain reaction, pozri White T. J. et al., *Trends Genet.* 5, 185 (1989)) s použitím oligonukleotidu (prípadne oligonukleotidov), ktorý má sekvenciu zodpovedajúcu oblasti blízkej časti 86 min na chromozóme *E. coli*.

Oligonukleotid môže byť alternatívne konštruovaný podľa nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 1. Úplná kódujúca oblasť môže byť amplifikovaná použitím oligonukleotidov, ktoré majú nukleotidové sekvencie zodpovedajúce protismernej oblasti od nukleotidu číslo 557 a v smere od nukleotidu číslo 1 171 v SEQ ID No.: 1 ako priméry pre PCR.

5 Syntéza oligonukleotidov sa môže vykonať bežným spôsobom, ako je napríklad fosfoamidový spôsob (pozri Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)) s použitím komerčne dostupného syntetizátora DNA (napríklad DNA Synthesizer Model 380B, vyrábaný v Applied Biosystems). PCR sa ďalej môže vykonať s použitím komerčne dostupného PCR-zariadenia (napríklad DNA Thermal Cycler Model PJ2000, vyrábaný spoločnosťou Takara Shuzo Co., Ltd.) a *Taq* DNA polymerázy (dodávanej spoločnosťou Takara Shuzo Co., Ltd.) spôsobom, uvádzaným dodávateľom.

10 Gén *rhtC* sa získal v DNA fragmente vrátane génu *rhtB* v spojitosti s klonovaním *rhtB* génu, ako sa uvádza ďalej v príkladoch uskutočnenia vynálezu. Uvedený gén *rhtC* zodpovedá opravenej (opisuje sa v ďalšom texte) sekvencii 0128 (nukleotidy číslo 60 860 až 61 480 z prístupového čísla M87049 GeneBank), čo je známy ale funkčne neznámy ORF. Uvedený gén *rhtC* možno získať spôsobom PCR alebo hybridizáciou s použitím oligonukleotidov konštruovaných podľa nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 3. Úplnú kódujúcu oblasť možno amplifikovať pri použití oligonukleotidov, ktoré majú nukleotidovú sekvenciu zodpovedajúcu protismernej oblasti od nukleotidu číslo 187 a oblasti v smere od nukleotidu číslo 804 v SEQ ID No.: 3 ako priméry pre PCR.

20 DNA kódujúca pre RhtB proteín podľa tohto vynálezu môže kódovať pre RhtB proteín vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín na jednom mieste alebo viacerých miestach za predpokladu, že sa Rh aktivita týmto spôsobom kódovaného RhtB proteínu nezhorší. Podobne, DNA kódujúca pre RhtC proteín podľa tohto vynálezu môže kódovať pre RhtC proteín vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín na jednom mieste alebo viacerých miestach za predpokladu, že sa Rt aktivita týmto spôsobom kódovaného RhtC proteínu nezhorší.

25 DNA, ktorá kóduje pre v podstate rovnaký proteín, ako je RhtB proteín alebo RhtC proteín, ako sa opisujú vyššie, možno získať napríklad modifikáciou nukleotidovej sekvencie, napríklad polohovo usmernenou mutagenézou tak, že jeden aminokyselinový zvyšok alebo viac aminokyselinových zvyškov sa na určitom mieste podrobí delécii, substitúcii, inzercii alebo adícii. DNA, modifikovanú opísaným spôsobom možno získať bežne známym mutačným postupom. Mutačný postup zahrnuje spôsob spracovania DNA, kódujúcej pre RhtB proteín alebo pre RhtC proteín, *in vitro*, napríklad s hydroxylamínom, a spôsob spracovania mikroorganizmu, napríklad baktérie, ktorá patrí k rodu *Escherichia*, so zakotvenou DNA, kódujúcou pre RhtB proteín ultrafialovým ožiarovaním, alebo mutačným činidlom, ako je napríklad *N*-metyl-*N'*-nitro-nitrozoguanidín (NTG) a kyselina dusitá, bežne používané v mutačných postupoch.

30 DNA, ktorá kóduje pre v podstate rovnaký proteín ako RhtB proteín alebo RhtC proteín možno získať expresiou DNA, vystavenej mutačnému účinku *in vitro*, ako sa opisuje vyššie, v násobných kópiách vo vhodnej bunke, vyšetrením odolnosti proti homoserínu alebo treonínu a selekciou DNA, ktorá zvyšuje uvedení odolnosť.

Je všeobecne známe, že aminokyselinová sekvencia proteínu a nukleotidová sekvencia, ktorá pre proteín kóduje, sa môžu podľa jednotlivých druhov, kmeňov, mutantov alebo variantov trochu líšiť.

40 Preto DNA, ktorá kóduje pre v podstate rovnaký proteín, ako je proteín RhtC, sa môže získať izoláciou DNA, ktorá hybridizuje s DNA, ktorá má, napríklad, nukleotidovú sekvenciu s nukleotidmi číslo 187 až 804 nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 3, alebo z nej získateľnou sondou v prísnych podmienkach, a ktorá kóduje pre proteín, ktorý má Rt aktivitu z baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, ktorá sa podrobí mutačnému spracovaniu; alebo zo spontánneho mutantu alebo variantu baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*.

45 DNA, ktorá kóduje pre v podstate rovnaký proteín, ako je RhtB proteín, sa môže tiež získať izoláciou DNA, ktorá hybridizuje s DNA, ktorá má, napríklad, nukleotidovú sekvenciu nukleotidov číslo 557 až 1171 nukleotidovej sekvencie SEQ ID No.: 1 alebo z nej pripraviteľnej sondy v prísnych podmienkach a ktorá kóduje pre proteín, ktorý má Rh aktivitu z baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, ktorá sa podrobí mutačnému spracovaniu; alebo zo spontánneho mutantu alebo variantu baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*.

50 Výraz „prísne podmienky“ sa tu vzťahuje na podmienky, pri ktorých sú DNA vzájomne hybridizované v prítomnosti solí v koncentrácii, zodpovedajúcej bežným podmienkam premývania pri Southernovom hybridizačnom postupe, to znamená 60 °C, 1 x SSC, 0,1 % SDS, výhodne 0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

2) Baktéria patriaca k rodu *Escherichia* použitá v spôsobe podľa tohto vynálezu

55 Baktéria patriaca k rodu *Escherichia* použitá v spôsobe podľa tohto vynálezu je baktéria patriaca k rodu *Escherichia*, ktorej Rt aktivita je zvýšená. Výhodným uskutočnením baktérie je baktéria, ktorá má ďalej zvýšenú aj Rh aktivitu. Ako príklad baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, možno uviesť *Escherichia coli*. Rh aktivita môže byť zvýšená napríklad amplifikáciou počtu kópií *rhtC* konštrukčného génu v bunke alebo transformáciou baktérie, patriacej k rodu *Escherichia* s rekombinantnou DNA, v ktorej fragment DNA, zahrnujúci uvedený *rhtC* konštrukčný gén, kódujúci RhtC proteín sa liguje s promótorovou sekvenciou, ktorá

účinne pôsobí v baktérii, patriacej k rodu *Escherichia*. Rt aktivitu možno zvýšiť tiež substitúciou promótorovej sekvencie génu *rhtC* na chromozóme promótorovou sekvenciou, ktorá účinne pôsobí v baktérii, patriacej k rodu *Escherichia*.

5 Popri uvedenom možno zvýšiť Rh aktivitu napríklad amplifikáciou počtu kópií *rhtB* konštrukčného génu v bunke alebo transformáciou baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, s rekombinantnou DNA, v ktorej fragment DNA, zahrnujúci uvedený *rhtB* konštrukčný gén, kódujúci RhtB proteín sa liguje s promótorovou sekvenciou, ktorá účinne pôsobí v baktérii, patriacej k rodu *Escherichia*. Rh aktivitu možno tiež zvýšiť substitúciou promótorovej sekvencie génu *rhtB* na chromozóme promótorovou sekvenciou, ktorá účinne pôsobí v baktérii, patriacej k rodu *Escherichia*.

10 Amplifikácia počtu kópií konštrukčného génu *rhtC* alebo konštrukčného génu *rhtB* v bunke sa môže vykonať vložením vektora násobných kópií (multicopy vector), ktorý je nositeľom konštrukčného génu *rhtC* alebo konštrukčného génu *rhtB*, do bunky baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*. Podrobnejšie, počet kópií sa môže zvýšiť vložením plazmidu, fágu alebo transpozónu (Berg D. E. a Berg C. M., Bio/Technol. 1, 417 (1983)), ktorý nesie konštrukčný gén *rhtC* alebo konštrukčný gén *rhtB* do bunky baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*.

15 Ako príklad vektora násobných kópií možno uviesť plazmidové vektory, ako sú pBR322, pMW118, pUC19 a podobne, fágové vektory, ako sú λ 1059, λ BF101, M13mp9, a podobne. Ako príklad transpozónov možno uviesť Mu, Tn10, Tn5 a podobne.

20 Vloženie DNA do baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, sa môže vykonať napríklad spôsobom, opísaným D. A. Morrisonom (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)), alebo spôsobom, v ktorom sa hostiteľská bakteriálna bunka spracuje s chloridom vápenatým na zvýšenie priepustnosti pre DNA (Mandel M. a Higa A., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970)) a podobnými spôsobmi.

25 Ak u baktérií, patriacich k rodu *Escherichia*, produkujúcich aminokyselinu, ako sa opisuje vyššie, je zvýšená Rt aktivita alebo Rt aktivita a Rh aktivita, možno produkované množstvo aminokyseliny zvýšiť. Ako baktérie, patriace k rodu *Escherichia*, ktoré majú zvýšenú Rt aktivitu alebo Rt aktivitu a Rh aktivitu sa používajú kmene, ktoré majú schopnosť produkovať vyžadované aminokyseliny. Okrem toho, schopnosť produkovať aminokyselinu možno včleniť do baktérie, v ktorej je z aktivít Rt a Rh zvýšená aktivita Rt.

30 Na základe amplifikácie *rhtC* DNA fragmentu sa získali nové kmene *E. coli* MG442/pRhtC, produkujúci homoserín; *E. coli* MG442/pVIC40, pRhtC, produkujúci treonín; *E. coli* NZ10/pRhtBC a *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC, produkujúce homoserín, valín a leucín, ktoré akumulujú aminokyseliny vo vyššom množstve v porovnaní s neamplifikovaným *rhtC* DNA fragmentom.

Uvedené nové kmene boli uložené (v súlade s Budapeštianskou dohodou o medzinárodnom uložení) v celoruskej Zbierke priemyselných mikroorganizmov (VKPM). Kmeň *E. coli* MG442/pRhtC bol uložený s prístupovým číslom VKPM B-7700; kmeň *E. coli*: MG442/pVIC40, pRhtC bol uložený s prístupovým číslom VKPM B-7680; kmeň *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC bol uložený s prístupovým číslom VKPM B-7681; 35 a kmeň *E. coli* NZ10/pRhtBC bol uložený s prístupovým číslom VKPM B-7682.

Uvedený kmeň *E. coli* MG442/pRhtC (VKPM B-7700) má ďalej uvedené kultivačne morfológické a biochemické vlastnosti.

Cytomorfológia

40 Gramnegatívne, slabo pohyblivé tyčinky so zaoblenými koncami. Pozdĺžna veľkosť 1,5 až 2 μ m.

Kultivačné vlastnosti

Agar s boviným extraktom:

45 Po 24 hodinách rastu pri 37 °C produkuje okrúhle, takmer biele, polopriehľadné kolónie s priemerom 1,0 až 3 mm, ktoré majú hladký povrch, pravidelné alebo mierne zvlnené okraje, v strede sú mierne vyvýšené, majú homogénnu štruktúru, pastovitú konzistenciu a sú ľahko emulgovateľné.

Agar podľa Lúriu:

50 Po 24 hodinách rastu pri 37 °C sa vyvinuli takmer biele, polopriehľadné kolónie s priemerom 1,5 až 2,5 mm, ktoré mali hladký povrch, homogénnu štruktúru, pastovitú konzistenciu a sú ľahko emulgovateľné.

Mínimálne, agarom dopované prostredie M9:

55 Po 40 až 48 hodinách rastu pri 37 °C sa tvoria kolónie s priemerom 0,5 až 1,5 mm, ktoré sú sfarbené do sivobiela, sú polopriehľadné, mierne konvexné s lesklým povrchom.

Rast na vývare boviného extraktu:

Po 24 hodinách rastu pri 37 °C vznik silného rovnomerného zákalu a charakteristického zápachu.

60

Fyziologické a biochemické znaky

Rast po očkovaní do agaru s boviným extraktom: dobrý rast v okolí zaočkovanej oblasti. Mikroorganizmus sa ukázal ako fakultatívne anaeróbný. Neskvapalňuje želatínu.

Dobre rastie na mlieku, rast je sprevádzaný koaguláciou mlieka.

5 Neprodukuje indol.

Teplotné podmienky: rastie na bovinom vývare pri 20 až 42 °C; optimum teploty je medzi 33 až 37 °C. pH hodnota kultivačného prostredia: rastie na tekutom médiu s pH od 6 do 9, optimálna hodnota pH je 7,2.

Zdroje uhlíka: dobre rastie na glukóze, fruktóze, laktóze, manóze, galaktóze, xylóze, glycerole, manitole; produkuje kyselinu a plyn.

10 Zdroje dusíka: asimiluje dusík vo forme amoniaku, solí kyseliny dusičnej, ako aj z niektorých organických zlúčenín.

Je rezistentný proti ampicilínu.

Ako rastový faktor sa použije L-izoleucín. Kmeň môže slabo rásť aj bez izoleucínu.

15 Obsah plazmidov: bunky obsahujú násobný hybridný plazmid pRhtC, ktorý zabezpečuje odolnosť proti ampicilínu (100 mg.dm⁻³) a nesie gén *rhtC*, ktorý zodpovedá za zvýšenú odolnosť proti treonínu (50 mg.ml⁻¹).

Kmeň *E. coli* MG442/pVIC40, pRhtC (VKPM B-7680) má rovnaké kultivačno-morfologické a biochemické vlastnosti ako kmeň VKPM B-7700 s výnimkou, že dodatočne k pRhtC obsahuje násobný hybridný plazmid pVIC40, ktorý zabezpečuje odolnosť proti streptomycínu (100 mg.dm⁻³) a nesie gény treonínového operónu.

20 Kmeň *E. coli* NZ10/pRhtB, pRhtC (VKPM B-7681) má rovnaké kultivačno-morfologické a biochemické vlastnosti ako kmeň VKPM B-7700 s výnimkou, že sa ako rastový faktor použije L-treonín (0,1 až 5 mg.ml⁻¹) namiesto L-izoleucínu. Okrem uvedeného, obsahuje násobný hybridný plazmid, ktorý zabezpečuje odolnosť proti kanamycínu (50 mg.dm⁻³) a nesie *rhtB* gén, ktorý vnáša odolnosť proti homoserinu (10 mg.ml⁻¹).

25 Kmeň *E. coli* NZ10/pRhtBC (VKPM B-7682) má rovnaké kultivačno-morfologické a biochemické vlastnosti ako kmeň VKPM B-7681 s výnimkou, že obsahuje násobný hybridný plazmid pRhtBC, ktorý zabezpečuje odolnosť proti ampicilínu (100 mg.dm⁻³) a nesie obidva gény, *rhtB* a *rhtC*, ktoré vnášajú odolnosť proti L-homoserinu (10 mg.ml⁻¹) a L-treonínu (50 mg.ml⁻¹).

3) Spôsob produkcie aminokyseliny

30 Aminokyselinu možno hospodárne produkovať kultiváciou baktérie, v ktorej je amplifikáciou počtu kópií *rhtC* génu alebo *rhtC* génu a *rhtB* génu zvýšená Rt aktivita alebo Rt aktivita a Rh aktivita, ako sa uvádza vyššie, a ktorá má schopnosť v kultivačnom prostredí produkovať aminokyselinu; v kultivačnom prostredí (médiu) sa produkuje a akumuluje aminokyselina; aminokyselina sa potom získa z prostredia. Ako výhodný príklad aminokyseliny možno uviesť L-homoserín, L-treonín a aminokyseliny s rozvetveným reťazcom. Ako príklad aminokyseliny s rozvetveným reťazcom možno uviesť L-valín, L-leucín a L-izoleucín; výhodný príklad je L-valín a L-leucín.

35 V spôsobe podľa tohto vynálezu sa kultivácia baktérie, patriacej k rodu *Escherichia*, oddelenie a čistenie aminokyselín z tekutého prostredia môže vykonať obdobnými spôsobmi, ktoré sa bežne používajú na produkciu aminokyseliny fermentáciou s použitím baktérie. Pri kultivácii sa môže použiť syntetické prostredie alebo prirodzené prostredie, pokiaľ prostredie obsahuje zdroj uhlíka a zdroj dusíka, minerálne látky a, ak treba, tak aj vhodné množstvá výživových zložiek, ktoré baktéria vyžaduje na svoj rast. Zdroj uhlíka môže zahŕňať rôzne sacharidy, ako je glukóza a sacharóza, a rôzne organické kyseliny v závislosti od asimilačných schopností použitej baktérie. Možno použiť aj alkohol, ako je etanol alebo glycerol. Ako zdroj dusíka sa použije amoniak, rôzne amónne soli, ako je síran amónny, ďalšie dusíkaté zlúčeniny, ako sú amíny, prírodné zdroje dusíka ako je peptón, sójový hydrolyzát a digerované fermentačné mikroorganizmy. Ako minerálne látky sa použijú dihydrogenfosforečnan draselný, síran horečnatý, chlorid sodný, síran železnatý, síran mangnatý, uhličitan vápenatý.

40 Kultivácia sa výhodne uskutoční v aeróbných podmienkach za pretrepávania alebo ako kultivácia s prevzdušňovaním a miešaním. Teplota kultivácie je zvyčajne 20 až 40 °C, výhodne 30 až 38 °C. Hodnota pH kultúry je zvyčajne medzi 5 a 9, výhodne medzi 6,5 a 7,2; pH kultúry možno nastavovať amoniakom, uhličitanom vápenatým, rôznymi kyselinami, rôznymi zásadami a tlmivými látkami. 1 až 3 dňová kultivácia zvyčajne vedie k akumulácii vyžadovanej aminokyseliny v prostredí.

45 Oddelenie aminokyseliny sa môže po kultivácii vykonať odstránením tuhých podielov, ako sú bunky, od tekutého prostredia odstredením alebo membránovou filtráciou, potom izoláciou a čistením vyžadovanej aminokyseliny na meniči iónov, skoncentrovaním a frakčnou kryštalizáciou alebo podobnými spôsobmi.

55

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje klonovanie a identifikáciu *rhtB* a *rhtC* génov;

60 Obrázok 2 znázorňuje štruktúru plazmidu pRhtB, kotviaceho gén *rhtB*;

Obrázok 3 znázorňuje štruktúru plazmidu pRhtC, kotviaceho gén *rhtC* a

Obrázok 4 znázorňuje štruktúru plazmidu pRhtBC, kotviaceho gén *rhtB* a gén *rhtC*.

5 Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález sa podrobnejšie opisuje pomocou príkladov. Pokiaľ sa neuvádza inak, aminokyselina v príkladoch má L-konfiguráciu.

10 Príklad 1

Získanie *rhtB* a *rhtC* DNA fragmentov

Krok 1. Klonovanie génov spôsobujúcich odolnosť proti homoserinu a treonínu do mini-Mu fágu

Gény, spôsobujúce odolnosť proti homoserinu a treonínu sa klonovali *in vivo* s použitím mini-Mu d5005 fágu (Groisman e., A., et al., J. Bacteriol., 168, 357 až 364 (1986)). Ako donor sa použil MuCts62 lyzogén kmeňa MG442 (Guayatiner et al., Genetika (v ruštine) 14, 947 až 956 (1978)). Čerstvo pripravený lyzát sa použil na infikovanie lyzogénnych derivátov MuCts kmeňa VKPM V-513 (Hfr K10 metB). Bunky sa naniesli na platne s minimálnym glukózovým M9 médiom s metionínom (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), kanamycínom (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a homoserinom (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Kolónie, ktoré vznikli po 48 hodinách rastu, sa preniesli a izolovali. Plazmidová DNA sa izolovala a použila na transformáciu kmeňa VKPM B-513 bežnou technikou. Transformanty sa selektovali na agarových platinách s L-vývarom s kanamycínom uvedeným postupom. Plazmidová DNA sa izolovala z transformantov, ktoré boli odolné proti homoserinu; plazmidová DNA sa analyzovala reštrikčným mapovaním štruktúry vložených fragmentov. Ukázalo sa, že z donora boli klonované dva typy inzertov, ktoré prislúchajú rozdielnym chromozómovým oblastiam. V *E. coli* potom jestvujú najmenej dva rozdielne gény, ktoré v násobných kópiách dodávajú odolnosť proti homoserinu. Jeden z uvedených dvoch typov inzertov je gén *rhtA*, ktorý už bol opísaný (Abstract of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, spojený s 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, USA, august 24 – 29, 1997). Mlul-Mlul fragment (0,8 kb) spôsobuje medzi inými aj v uvedených dvoch typoch inzertov odolnosť iba proti homoserinu (obrázok 1).

30

Krok 2. Identifikácia *rhtB* génu a *rhtC* génu

Inzertový fragment bol sekvenovaný Sangerovým spôsobom dideoxy terminácie reťazcov. Obidve vlákna DNA boli celkom sekvenované a všetky spoje sa prekryli. Sekvenovanie ukázalo, že inzertový fragment zahŕňoval f138 (nukleotidové čísla 61 543 až 61 959 z prístupového čísla M97 049 GenBank), ktorý bol známy, ale funkčne neznámy ORF (open reading frame), prítomný v 86 min *E. coli* chromozóme a približne 350 bp jeho protismernej oblasti (oblasť v smere v sekvencii M87 049). Uvedený f138, ktorý mal iba 160 nukleotidov v 5-okrajovej oblasti nemohol spôsobiť odolnosť proti homoserinu. V protismere ORF f138 medzi nukleotidmi 62 160 až 61 950 z M87 049 nie je prítomný žiadny terminačný kodón. Ďalej, v uvedenej sekvencii za sekvenciou, predpokladanou ako ribozómové väzbové miesto je prítomná jedna ATG. Väčší ORF (nukleotidové čísla 62 160 až 61 546) sa označil ako gén *rhtB*. Odvodnený proteín z uvedeného génu *rhtB* má oblasť, ktorá je vysoko hydrofóbná a obsahuje možné transmembránové segmenty.

40

Ako sa uvádza ďalej, plazmid obsahujúci tento gén vnáša do buniek odolnosť iba proti vysokým koncentráciám homoserinu. Pretože počiatočný SacII-SacII DNA fragment obsahoval druhý neidentifikovaný ORF, 0128, bol gén subklonovaný a skúšaný na jeho schopnosť vnášať odolnosť proti homoserinu a treonínu. Zistilo sa, že plazmid, obsahujúci o128 (fragment *Clal-Eco47III*) vnášal odolnosť k 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ treonínu (obrázok 1). Subklonovaný fragment sa sekvenoval a zistilo sa, že obsahuje ďalší nukleotid (G) v polohe medzi nukleotidmi 61 213 až 61 214 M87 049. Príspevok nukleotidu k sekvencii eliminoval posun rámca a zväčšenie ORF v 5'-okrajovej oblasti až do nukleotidu 60 860. Tento nový gén sa označil ako *rhtC*. Zistilo sa, že obidva gény, *rhtB* a *rhtC*, sú homológne k transportéru, pôsobiacom pri exporte lyzínu z *Corynebacterium glutamicum*.

50

Príklad 2

Vplyv amplifikácie génov *rhtB* a *rhtC* na produkciu homoserinu

1) Konštrukcia L-homoserin produkujúceho kmeňa *E. coli* NZ10/pAL4, pRhtB a produkcia homoserinu

Na získanie pRhtB (obrázok 2) sa gén *rhtB* inzertoval do plazmidu pUK21 (Vieira J. a Messing J., Gene 100, 189 až 194 (1991)).

Na získanie kmeňov NZ10/pAL4 sa kmeň NZ10 *E. coli* transformoval plazmidom pAL4, čo je vektor pBR322, do ktorého bol vložený gén *thrA*, kódujúci pre aspartokinázu – homoserinovú dehydrogenázu I. Kmeň NZ10 je *leuB*⁺-revertný mutant *thrB*⁻, získaný z kmeňa *E. coli* C600 (*thrB*, *leuB*) (Appleyard R. K., Genetics 39, 440 až 452 (1954)).

60

Na získanie kmeňov NZ10/pAL4, pUK21 a NZ10/pAL4, pRhtB sa kmeň NZ10/pAL4 transformoval s pUK21 alebo pRhtB.

- 5 Každý zo získaných transformantov sa kultivoval 18 hodín pri 37 °C vo výživnom vývare s 50 mg.dm⁻³ kanamycínu a 100 mg.dm⁻³ ampicilínu; do 20 x 200 mm skúmaviek sa očkovalo 0,3 ml získanej kultúry vždy do 3 ml fermentačného média, ktoré malo ďalej uvedené zloženie a obsahovalo 50 mg.dm⁻³ kanamycínu a 100 mg.dm⁻³ ampicilínu; kultivácia prebiehala 48 hodín pri 37 °C v rotačnej trepačke. Po kultivácii sa známymi spôsobmi stanovilo akumulované množstvo homoserínu v médiu a absorbanca pri 560 nm.

Fermentačné médium, zloženie v g.dm⁻³:

glukóza	80
(NH ₄) ₂ SO ₄	22
K ₂ HPO ₄	2
NaCl	0,8
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,8
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,02
MnSO ₄ .5 H ₂ O	0,02
hydrochlorid tiamínu	0,2
kvasinkový extrakt	1,0
CaCO ₃	30

10 (CaCO₃ sa sterilizoval samostatne).

Výsledky sa uvádzajú v tabuľke 1. Ako je z tabuľky 1 zrejmé, kmeň NZ10/pAL4, pRhtB akumuloval homoserín vo väčšom množstve ako kmeň NZ10/pAL4, pUK21, v ktorom nebol gén *rhtB* zosilnený.

15 Tabuľka 1

Kmeň	OD ₅₆₀	Akumulované množstvo homoserínu v g.dm ⁻³
NZ10/pAL4, pUK21	14,3	3,3
NZ10/pAL4, pRhtB	15,6	6,4

2) Konštrukcia homoserín produkujúceho kmeňa *E. coli* MG442/pRhtC a produkcia homoserínu

Na získanie pRhtC (obrázok 3) sa do pUC21 vektora (Vieira, J. a Messing, J.: Gene 100, 189 až 194 (1991)) vložil gén *rhtC*.

- 20 Aby sa získali kmene MG442/pUC21 a MG442/pRhtC, transformoval sa známy kmeň MG442 *E. coli*, ktorý môže produkovať treonín v množstvách nie menších ako 3 g.dm⁻³ (Gusyatiner, et al., Genetika (ruská) 14, 947 až 956 (1978)), vložení pUC21 alebo pRhtC.

- 25 Každý zo získaných transformantov sa 18 hodín kultivoval pri 37 °C vo výživnom vývare s 100 mg.ml⁻¹ ampicilínu; do 20 x 200 mm skúmaviek sa zaočkovovalo vždy po 0,3 ml získanej kultúry do 3 ml opísaného fermentačného média, obsahujúceho 100 mg.ml⁻¹ ampicilínu; kultivovalo sa 48 hodín pri 37 °C v rotačnej trepačke. Po kultivácii sa známymi spôsobmi stanovovalo akumulované množstvo homoserínu v prostredí a absorbanca pri 560 nm. Výsledky sa uvádzajú v tabuľke 2.

Tabuľka 2

Kmeň	OD ₅₆₀	Akumulované množstvo homoserínu v g.dm ⁻³
MG442/pUC21	9,7	<0,1
MG442/pRhtC	15,2	9,5

30

Príklad 3

Vplyv amplifikácie *rhtB* a *rhtC* génov na produkciu treonínu

- 35 1) Konštrukcia kmeňa *E. coli* VG442/pVIC40, pRhtB (VKPM B-7660), produkujúceho treonín a produkcia treonínu

Bežným spôsobom transformácie sa transformoval kmeň MG442 vložení známeho plazmidu pVIC40 (patent USA 5 175 107 (1992)). Transformanty sa selektovali na LB agarových platniach, obsahujúcich 0,1 mg.ml⁻¹ streptomycínu. Tak sa získal nový kmeň MG442/pVIC40.

- 40 Kmeň MG442/pVIC40 sa transformoval s pUK21 alebo pRhtB na získanie kmeňov MG442/pVIC40, pUK21 a MG442/pVIC40, pRhtB.

Získané transformanty sa 18 hodín kultivovali pri 37 °C vo výživnom vývare s 50 mg.dm⁻³ kanamycínu a 100 mg.dm⁻³ streptomycínu; do 20 x 200 mm skúmaviek sa zaočkovovalo vždy po 0,3 ml získanej kultúry do

3 ml fermentačného média opísaného v príklade 2, obsahujúceho 50 mg.dm⁻³ kanamycínu a 100 mg.dm⁻³ streptomycínu; kultivovalo sa 68 hodín pri 37 °C v rotačnej trepačke. Po kultivácii sa známymi spôsobmi stanovovalo akumulované množstvo treonínu v prostredí a absorbanca pri 560 nm.

Výsledky sa uvádzajú v tabuľke 3. Ako je z tabuľky 3 zrejmé, kmeň MG442/pVIC40, pRhtB akumuloval treonín vo väčšom množstve ako kmeň MG442/pVIC40, pUK21, v ktorom gén *rhtB* nebol zosilnený.

Tabuľka 3

Kmeň	OD ₅₆₀	Akumulované množstvo treonínu v g.dm ⁻³
MG442/pVIC40, pUK21	16,3	12,9
MG442/pVIC40, pRhtB	15,2	16,3

2) Konštrukcia kmeňa *E. coli* VG442/pVIC40, pRhtC (VKPM B-7680), produkujúceho treonín a produkcia treonínu

Kmeň MG442/pVIC40 sa transformoval s pRhtC a pUC21. Získali sa tak transformanty MG442/pVIC40, pRhtC a MG442/pVIC40, pUC21. Rovnakým spôsobom ako vyššie sa kmene MG442/pVIC40, pRhtC a MG442/pVIC40, pUC21 18 hodín kultivovali pri 37 °C vo výživnom vývare s 100 mg.dm⁻³ ampicilínu a 100 mg.dm⁻³ streptomycínu; do 20 x 200 mm skúmaviek sa zaočkovovalo vždy po 0,3 ml získanej kultúry do 3 ml fermentačného média opísaného v príklade 2, obsahujúceho 100 mg.dm⁻³ ampicilínu a 100 mg.dm⁻³ streptomycínu; kultivovalo sa 46 hodín pri 37 °C v rotačnej trepačke. Po kultivácii sa známymi spôsobmi stanovovalo akumulované množstvo treonínu v prostredí a absorbanca pri 560 nm.

Výsledky sa uvádzajú v tabuľke 4. Z údajov v tabuľke 4 je zrejmé, že kmeň MG442/pVIC40, pRhtC akumuluje treonín vo väčšom množstve ako kmeň MG442/pVIC40, pUC21, v ktorom gén *rhtC* nebol zosilnený.

Tabuľka 4

Kmeň	OD ₅₆₀	Akumulované množstvo treonínu v g.dm ⁻³
MG442/pVIC40, pUC21	17,4	4,9
MG442/pVIC40, pRhtC	15,1	10,2

Príklad 4

Spoločný vplyv génu *rhtB* a génu *rhtC* na produkciu aminokyseliny

Do pUC21 sa vložil *SacII-SacII* fragment DNA, obsahujúci *rhtB* a *rhtC* gény. Získal sa tak plazmid pRhtBC, ktorý kotví obidva gény, *rhtB* gén aj *rhtC* gén (obrázok 4).

Potom sa transformoval kmeň NZ10 s pUC21, pRhtB, pRhtC alebo pRHBC; získali sa tak transformanty NZ10/pUC21 (VKPM B-7685), NZ10/pRhtB (VKPM B-7683), NZ10/pRhtC (VKPM B-7684), NZ10/pRhtB, pRhtC (VKPM B-7681) a NZ10/pRhtBC (VKPM B-7682).

Získané transformanty sa kultivovali rovnakým spôsobom ako vyššie; známymi spôsobmi sa stanovovalo akumulované množstvo rôznych aminokyselín v prostredí a absorbanca prostredia pri 540 nm.

Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5. Z údajov v tabuľke 5 vyplýva, že pRhtB a pRhtC majú spoločný účinok na produkciu homoserínu, valínu a leucínu. Tieto výsledky znamenajú, že *rhtB* a *rhtC* génové produkty môžu v bunkách vstupovať do interakcií.

Tabuľka 5

Kmeň	OD ₅₆₀	Homoserín g.dm ⁻³	Valín g.dm ⁻³	Leucín g.dm ⁻³
NZ10/pUC21	18,7	0,6	0,22	0,16
NZ10/pRhtB	19,6	2,3	0,21	0,14
NZ10/pRhtC	20,1	0,7	0,2	0,15
NZ10/pRhtBC	21,8	4,2	0,34	0,44
NZ10/pRhtB, pRhtC	19,2	4,4	0,35	0,45

Príklad 5

Vplyv *rhtB* génu a *rhtC* génu na odolnosť proti aminokyselinám

Ako už bolo uvedené, plazmidy kotviace *rhtB* a *rhtC* majú pri pestovaní rôznych kmeňov kladný vplyv na akumuláciu niektorých aminokyselín v kultúre. Zistilo sa, že spektrum akumulovaných aminokyselín je závislé od genotypu kmeňa. Homológia *rhtB* a *rhtC* génových produktov s lyzínovým transportérom *LysE* z *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic, M., Sahn, H. a Eggeling, L., Mol. Microbiol. 22, 815 až 826 (1996)) poukazuje na analogické funkcie týchto proteínov.

Preto sa skúšal vplyv pRhtB a pRhtC plazmidov na citlivosť kmeňa N99, ktorý je mutant rezistentný proti streptomycínu (Str^R) známeho kmeňa W3350 (VKPM B-1557), proti niektorým aminokyselinám a analógom aminokyselín. Nočné kultúry (10^9 cfu.ml⁻¹) kmeňov N99/pUC21, N99//pUK21, N99/pRhtB a N99/pRhtC sa zriedili 1 : 100 minimálnym M9 médiom a nechali sa 5 hodín rásť v rovnakom médiu. V logaritmickú fázu rastu sa kultúry zriedili a približne 10^4 živých buniek sa nanieslo na dobre vysušené platne s M9 agarom (2 %), obsahujúce dvojnásobné prírastky aminokyselín alebo ich analógov. Týmto spôsobom sa hodnotila minimálna inhibičná koncentrácia (minimum inhibitory concentration, MIC) skúšaných zlúčenín.

Výsledky sa uvádzajú v tabuľke 6. Z výsledkov v tabuľke 6 vyplýva, že násobné kópie *rhtB* popri homoseríne vnášajú aj zvýšenú odolnosť proti α -amino- β -hydroxyvalérovej kyseline (AHVA) a S-(2-aminoetyl)-L-cysteínu (AEC), a proti 4-aza-D,L-leucínu; násobné kópie génu *rhtC* popri treoníne zvýšili odolnosť voči valínu, histidínu a AHVA. Tieto výsledky ukazujú, že každý z predpokladaných transportérov, *RhtB* a *RhtC*, je špecifický k niekoľkým substrátom (aminokyselinám) alebo môže vykazovať nešpecifické účinky ako výsledok amplifikácie.

Tabuľka 6

Substrát	MIC v $\mu\text{g.ml}^{-1}$		
	N99/pUC21*	N99/pRhtB	N99/pRhtC
L-homoserín	1 000	20 000	1 000
L-treonín	30 000	40 000	80 000
L-valín	0,5	0,5	2,0
L-histidín	5 000	5 000	40 000
AHVA	100	2 000	15 000
AEC	5	20	5
4-aza-DL-leucín	50	100	50
O-metyl-L-treonín	20	20	20

*/ Rovnaké údaje sa získali s N99/pUK21

Zoznam sekvencií

- 20 <110> Ajinomoto Co., Inc.
 <120>
 <130> EPA-53286
 <140> 99125406.1
 <141> 1999-12-20
 25 <150> RU-98123511
 <151> 1998-12-23
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 30 <211> 1231
 <212> DNA
 <213> *Escherichia coli*
 <220>
 <221> CDS
 35 <222> (557)...(1171)
 <400> 1

```

agaataatg tggagatgc accgcccac gaatgtgcca gtatatagcg tttacgccac      60
ggaccgggct gaacctcctg ctgccagaat gccgccagat catcaacata atcattaag      120
cgattaacat gcccgagatg cggatcggct aacaggcgac cggaacgtcc ctgcccgca      180
tggtcgatga ttaagacatc aaacccaaa tggaacaggt cataggccag ttccgcatat      240
tttacgtagc tctcaatacg ccccgggcag atgactacca cccggtcatg gtgctgtgcg      300
cgaaaacgga caaagcgcac cggaatgtca tccacaccag taaactctgc ttcacacgc      360
tgacgccaga aatcagtcag cggtcaccatg gtaaaagcag caaacgcggt ttctctgtt      420
tcccagtcct tttgctgctg aaacatcggg taatctgcct cttaaaccac gtaaaatcgt      480
tttttttagc gtgctgaca caacgctgcg acagtagcgt attgtggcac aaaaatagac      540
acaccgggag ttcate atg acc tta gaa tgg tgg ttt gcc tac ctg ctg aca      592
Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr

```

SK 288294 B6

				1				5					10				
tcg	atc	att	tta	acg	ctg	tcg	cca	ggc	tct	ggt	gca	atc	aac	act	atg		640
Ser	Ile	Ile	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Met		
		15					20					25					
acc	acc	tcg	ctc	aac	cac	ggt	tat	ccg	gcc	ggt	ggc	gtc	tat	tgc	tgg		688
Thr	Thr	Ser	Leu	Asn	His	Gly	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Tyr	Cys	Trp		
	30					35					40						
gct	tca	gac	cgg	act	ggc	gat	tca	tat	tgt	gct	ggt	tgg	cgt	ggg	gtt		736
Ala	Ser	Asp	Arg	Thr	Gly	Asp	Ser	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Arg	Gly	Val		
	45				50					55					60		
ggg	acg	cta	ttt	tcc	cgc	tca	gtg	att	gcg	ttt	gaa	gtg	ttg	aag	tgg		784
Gly	Thr	Leu	Phe	Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Trp		
				65					70					75			
gca	ggc	gcg	gct	tac	ttg	att	tgg	ctg	gga	atc	cag	cag	tgg	cgc	gcc		832
Ala	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ile	Trp	Leu	Gly	Ile	Gln	Gln	Trp	Arg	Ala		
		80					85					90					
gct	ggt	gca	att	gac	ctt	aaa	tcg	ctg	gcc	tct	act	caa	tcg	cgt	cga		880
Ala	Gly	Ala	Ile	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg		
		95					100					105					
cat	ttg	ttc	cag	cgc	gca	gtt	ttt	gtg	aat	ctc	acc	aat	ccc	aaa	agt		928
His	Leu	Phe	Gln	Arg	Ala	Val	Phe	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Lys	Ser		
	110						115					120					
att	gtg	ttt	ctg	gcg	gcg	cta	ttt	ccg	caa	ttc	atc	atg	ccg	caa	cag		976
Ile	Val	Phe	Leu	Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Gln	Gln		
					130					135					140		
ccg	caa	ctg	atg	cag	tat	atc	gtg	ctc	ggc	gtc	acc	act	att	gtg	gtc		1024
Pro	Gln	Leu	Met	Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val		
				145					150					155			
gat	att	att	gtg	atg	atc	ggt	tac	gcc	acc	ctt	gct	caa	cgg	att	gct		1072
Asp	Ile	Ile	Val	Met	Ile	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala		
			160					165						170			
cta	tgg	att	aaa	gga	cca	aag	cag	atg	aag	gcg	ctg	aat	aag	att	ttc		1120
Leu	Trp	Ile	Lys	Gly	Pro	Lys	Gln	Met	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe		
		175					180					185					
ggc	tcg	ttg	ttt	atg	ctg	gtg	gga	gcg	ctg	tta	gca	tcg	gcg	agg	cat		1168
Gly	Ser	Leu	Phe	Met	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	His		
	190					195					200						
gcg	tgaaaaataa			tgtcggatgc			ggcgtaaacg			ccttatccga		cttactctga					1221
Ala																	
	205																
agacgcgtct																	1231

<210> 2

<211> 205

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 2

Met	Thr	Leu	Glu	Trp	Trp	Phe	Ala	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Leu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Thr	Met	Thr	Thr	Ser	Leu
			20					25					30		
Asa	His	Gly	Tyr	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Tyr	Cys	Trp	Ala	Ser	Asp	Arg
		35					40					45			

SK 288294 B6

Thr	Gly	Asp	Ser	Tyr	Cys	Ala	Gly	Trp	Arg	Gly	Val	Gly	Thr	Leu	Phe
	50					55					60				
Ser	Arg	Ser	Val	Ile	Ala	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Ala
65					70					75					80
Tyr	Leu	Ile	Trp	Leu	Gly	Ile	Gln	Gln	Trp	Arg	Ala	Ala	Gly	Ala	Ile
				85					90					95	
Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	His	Leu	Phe	Gln
			100					105					110		
Arg	Ala	Val	Phe	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Pro	Lys	Ser	Ile	Val	Phe	Leu
		115					120					125			
Ala	Ala	Leu	Phe	Pro	Gln	Phe	Ile	Met	Pro	Gln	Gln	Pro	Gln	Leu	Met
	130				135					140					
Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Ile	Val
145				150						155					160
Met	Ile	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala	Leu	Trp	Ile	Lys
				165					170					175	
Gly	Pro	Lys	Gln	Met	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Phe
			180					185					190		
Met	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Arg	His	Ala			
		195					200					205			

<210> 3

<211> 840

<212> DNA

5 <213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (187)...(804)

<400> 3

10

atgccgatca	ccgccagcga	aatgctcagc	gttaacggcg	ttgggatgcg	caagctggaa	60
cgctttggca	aaccgtttat	ggcgtgtgatt	cgtgcgcatg	ttgatggcga	tgacgaagag	120
tagtcagcag	cataaaaaag	tgccagtatg	aagactccgt	aaacgtttcc	cccgcgagtc	180
aaatgt atg ttg atg tta ttt ctc acc gtc gcc atg gtg cac att gtg						228
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val						
1 5 10						
gcg ctt atg agc ccc ggt ccc gat ttc ttt ttt gtc tct cag acc get						276
Ala Leu Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala						
15 20 25 30						
gtc agt cgt tcc cgt aaa gaa gcg atg atg ggc gtg ctg ggc att acc						324
Val Ser Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr						
35 40 45						
tgc ggc gta atg gtt tgg gct ggg att gcg ctg ctt ggc ctg cat ttg						372
Cys Gly Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu						
50 55 60						
att atc gaa aaa atg gcc tgg ctg cat acg ctg att atg gtg ggc ggt						420
Ile Ile Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly						
65 70 75						
ggc ctg tat ctc tgc tgg atg ggt tac cag atg cta cgt ggt gca ctg						468
Gly Leu Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu						
80 85 90						
aaa aaa gag gcg gtt tct gca cct gcg cca cag gtc gag ctg gcg aaa						516
Lys Lys Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys						
95 100 105 110						
agt ggg cgc agt ttc ctg aaa ggt tta ctg acc aat ctc gct aat ccg						564

SK 288294 B6

Ser	Gly	Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Pro	
				115					120					125		
aaa	gcg	att	atc	tac	ttt	ggc	tcg	gtg	ttc	tca	ttg	ttt	gtc	ggt	gat	612
Lys	Ala	Ile	Ile	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	Leu	Phe	Val	Gly	Asp	
			130					135					140			
aac	gtt	ggc	act	acc	gcg	cgc	tgg	ggc	att	ttt	gcg	ctg	atc	att	gtc	660
Asa	Val	Gly	Thr	Thr	Ala	Arg	Trp	Gly	Ile	Phe	Ala	Leu	Ile	Ile	Val	
		145					150					155				
gaa	acg	ctg	gcg	tgg	ttt	acc	gtc	gtt	gcc	agc	ctg	ttt	gcc	ctg	ccg	708
Glu	Thr	Leu	Ala	Trp	Phe	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Leu	Pro	
	160					165						170				
caa	atg	cgc	cgt	ggt	tat	caa	cgt	ctg	gcg	aag	tgg	att	gat	ggt	ttt	756
Gln	Met	Arg	Arg	Gly	Tyr	Gln	Arg	Leu	Ala	Lys	Trp	Ile	Asp	Gly	Phe	
175				180						185					190	
gcc	ggg	gcg	tta	ttt	gcc	gga	ttt	ggc	att	cat	ttg	att	att	tcg	cgg	804
Ala	Gly	Ala	Leu	Phe	Ala	Gly	Phe	Gly	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ser	Arg	
			195					200						205		
tgatgccaga cgcgtcttca gagtaagtcg gataag															840	

<210> 4

<211> 206

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 4

Met	Leu	Met	Leu	Phe	Leu	Thr	Val	Ala	Met	Val	His	Ile	Val	Ala	Leu	
1				5					10					15		
Met	Ser	Pro	Gly	Pro	Asp	Phe	Phe	Phe	Val	Ser	Gln	Thr	Ala	Val	Ser	
			20					25					30			
Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Met	Gly	Val	Leu	Gly	Ile	Thr	Cys	Gly	
		35					40					45				
Val	Met	Val	Trp	Ala	Gly	Ile	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	His	Leu	Ile	Ile	
	50					55					60					
Glu	Lys	Met	Ala	Trp	Leu	His	Thr	Leu	Ile	Met	Val	Gly	Gly	Gly	Leu	
65				70						75					80	
Tyr	Leu	Cys	Trp	Met	Gly	Tyr	Gln	Met	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Lys	Lys	
			85					90						95		
Glu	Ala	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Gly	
			100					105					110			
Arg	Ser	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala	
		115					120					125				
Ile	Ile	Tyr	Phe	Gly	Ser	Val	Phe	Ser	Leu	Phe	Val	Gly	Asp	Asn	Val	
	130					135					140					
Gly	Thr	Thr	Ala	Arg	Trp	Gly	Ile	Phe	Ala	Leu	Ile	Ile	Val	Glu	Thr	
145				150						155				160		
Leu	Ala	Trp	Phe	Thr	Val	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Leu	Pro	Gln	Met	
			165					170					175			
Arg	Arg	Gly	Tyr	Gln	Arg	Leu	Ala	Lys	Trp	Ile	Asp	Gly	Phe	Ala	Gly	
		180						185					190			
Ala	Leu	Phe	Ala	Gly	Phe	Gly	Ile	His	Leu	Ile	Ile	Ser	Arg			
		195					200					205				

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob produkcie aminokyseliny, vybranej z L-homoserínu alebo L-treonínu, ktorý zahrnuje nasledujúce kroky: kultiváciu baktérie, ktorá je schopná produkovať aminokyselinu, v kultivačnom médiu, na produkovanie a akumulovanie aminokyseliny v kultivačnom médiu, a izoláciu aminokyseliny z média, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že baktéria patrí do rodu *Escherichia*, pričom jej rezistencia voči L-treonínu je zosilnená posilnením aktivity proteínu podľa A) alebo B) v bunkách tejto baktérie, kde:

A) proteín zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No.: 4 v zozname sekvencií alebo
 B) proteín zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín v aminokyselinovej sekvencii, znázornenej v SEQ ID No.: 4 v zozname sekvencií, a tento proteín má schopnosť urobiť baktériu, v ktorej sa nachádza, rezistentnú proti L-treonínu, pričom tento proteín je kódovaný DNA, ktorá je definovaná v a) alebo v b) ako:

a) DNA, ktorá zahrnuje nukleotidovú sekvenciu od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID No.: 3;
 b) DNA, ktorá hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID No.: 3 v prísnych podmienkach a ktorá kóduje proteín s aktivitou schopnou urobiť baktériu, ktorá tento proteín obsahuje, rezistentnou proti L-treonínu, pričom prísne podmienky sú podmienky, pri ktorých sa premyvávanie uskutočňuje pri 60 °C a koncentrácia solí zodpovedá 1 x SSC a 0,1 % SDS.

2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že rezistencia proti L-homoserínu je v baktérii ďalej posilnená prostredníctvom posilnenia aktivity proteínu podľa C) alebo D) v bunkách tejto baktérie:

C) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No.: 2 v zozname sekvencií, alebo

D) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín v aminokyselinovej sekvencii, znázornenej v SEQ ID No.: 2 v zozname sekvencií, pričom tento proteín má aktivitu schopnú urobiť baktériu, v ktorej sa nachádza, rezistentnú proti L-homoserínu.

3. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že proteín podľa C) alebo D) je kódovaný DNA, ktorá je definovaná v c) alebo d):

c) DNA, ktorá zahrnuje nukleotidovú sekvenciu od nukleotidu 557 po nukleotid 1171 v SEQ ID No.: 1;
 d) DNA, ktorá hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou od nukleotidu 557 po nukleotid 1171 v SEQ ID No.: 1 v prísnych podmienkach a ktorá kóduje proteín s aktivitou schopnou urobiť baktériu, ktorá tento proteín obsahuje, rezistentnou proti L-homoserínu, pričom prísne podmienky sú podmienky, pri ktorých sa premyvávanie uskutočňuje pri 60 °C a koncentrácia solí zodpovedá 1 x SSC a 0,1 % SDS.

4. Spôsob produkcie aminokyseliny, ktorý zahrnuje nasledujúce kroky: kultiváciu baktérie, ktorá je schopná produkovať aminokyselinu, v kultivačnom médiu, na produkovanie a akumulovanie aminokyseliny v kultivačnom médiu, a izoláciu aminokyseliny z média, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že baktéria patrí do rodu *Escherichia*, pričom jej rezistencia proti L-treonínu je zosilnená posilnením aktivity proteínu podľa A) alebo B) v bunkách tejto baktérie, kde:

A) proteín zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No.: 4 v zozname sekvencií alebo
 B) proteín zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín v aminokyselinovej sekvencii, znázornenej v SEQ ID No.: 4 v zozname sekvencií, a tento proteín má schopnosť urobiť baktériu, v ktorej sa nachádza, rezistentnú proti L-treonínu, pričom tento proteín je kódovaný DNA, ktorá je definovaná v a) alebo v b) ako:

a) DNA, ktorá zahrnuje nukleotidovú sekvenciu od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID No.: 3;
 b) DNA, ktorá hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou od nukleotidu 187 po nukleotid 804 v SEQ ID No.: 3 v prísnych podmienkach a ktorá kóduje proteín s aktivitou schopnou urobiť baktériu, ktorá tento proteín obsahuje, rezistentnou proti L-treonínu, pričom prísne podmienky sú podmienky, pri ktorých sa premyvávanie uskutočňuje pri 60 °C a koncentrácia solí zodpovedá 1 x SSC a 0,1 % SDS, a pričom rezistencia tejto baktérie voči L-homoserínu je ďalej posilnená prostredníctvom posilnenia aktivity proteínu podľa C) alebo D) v bunkách tejto baktérie:

C) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu znázornenú v SEQ ID No.: 2 v zozname sekvencií, alebo

D) proteín, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu vrátane delécie, substitúcie, inzercie alebo adície jednej aminokyseliny alebo viacerých aminokyselín v aminokyselinovej sekvencii, znázornenej v SEQ ID No.: 2 v zozname sekvencií, pričom tento proteín má aktivitu schopnú urobiť baktériu, v ktorej sa nachádza, rezistentnú proti L-homoserínu.

5. Spôsob podľa nároku 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že aminokyselinou je aminokyselina s rozvetveným reťazcom.

6. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že aminokyselinou s rozvetveným reťazcom je L-valín alebo L-leucín.

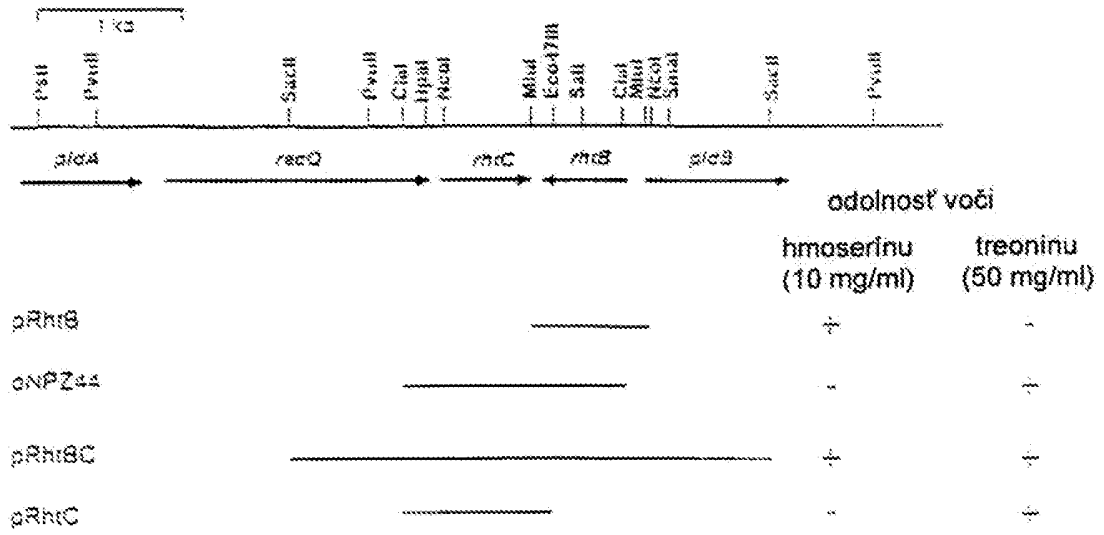
7. Spôsob podľa nároku 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že proteín podľa C) alebo D) je kódovaný DNA, ktorá je definovaná v c) alebo d):

c) DNA, ktorá zahŕňa nukleotidovú sekvenciu od nukleotidu 557 po nukleotid 1171 v SEQ ID No.: 1;

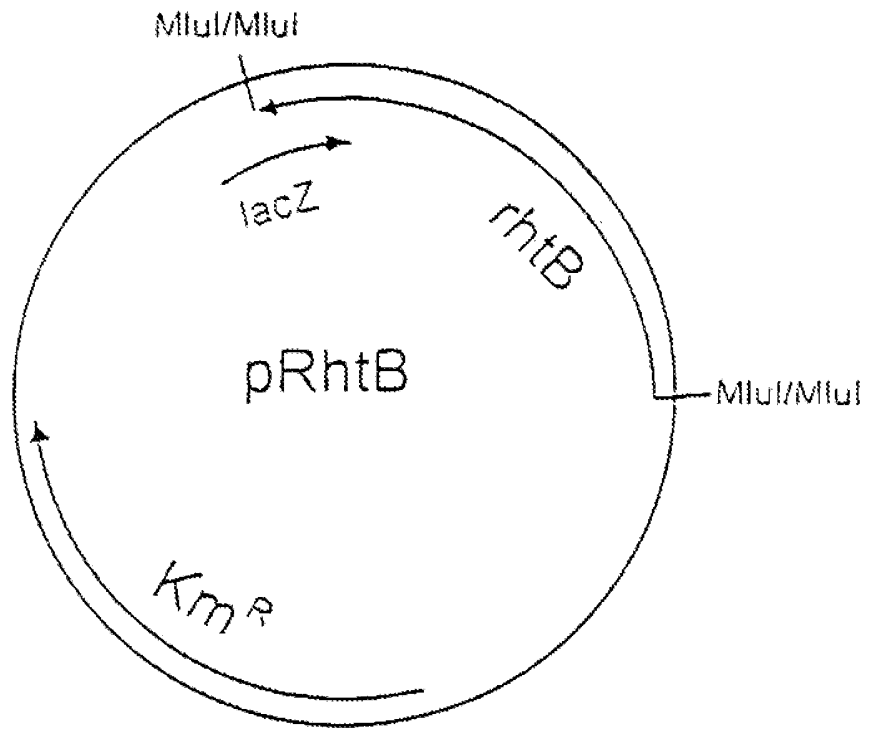
- 5 d) DNA, ktorá hybridizuje s nukleotidovou sekvenciou od nukleotidu 557 po nukleotid 1171 v SEQ ID No.: 1 v prísnych podmienkach a ktorá kóduje proteín s aktivitou schopnou urobiť baktériu, ktorá tento proteín obsahuje, rezistentnou proti L-homoserínu, pričom prísne podmienky sú podmienky, pri ktorých sa premývanie uskutočňuje pri 60 °C a koncentrácia solí zodpovedá 1 x SSC a 0,1 % SDS.

10

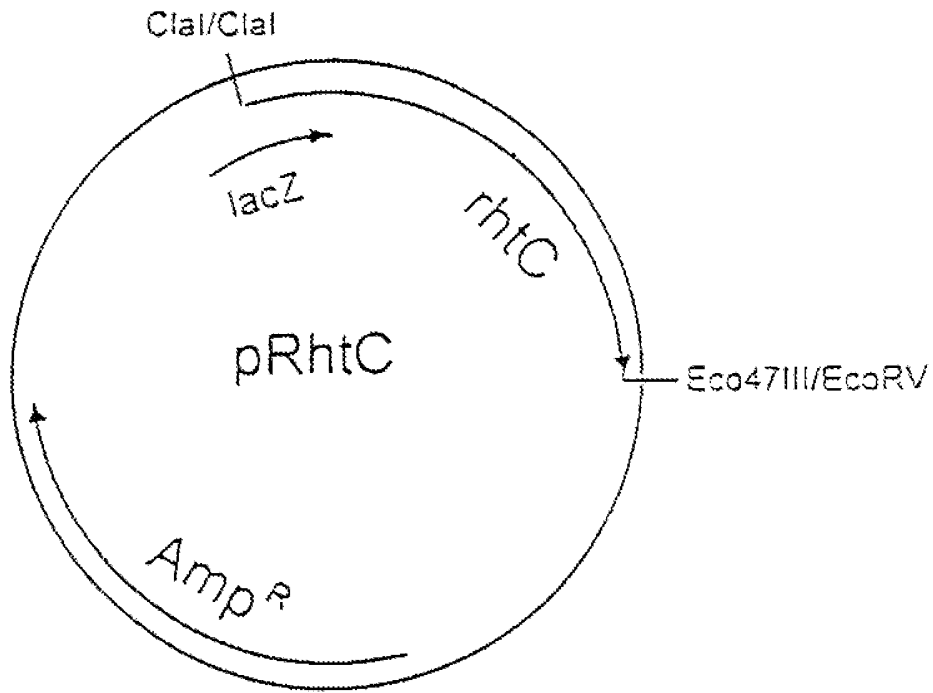
4 výkresy



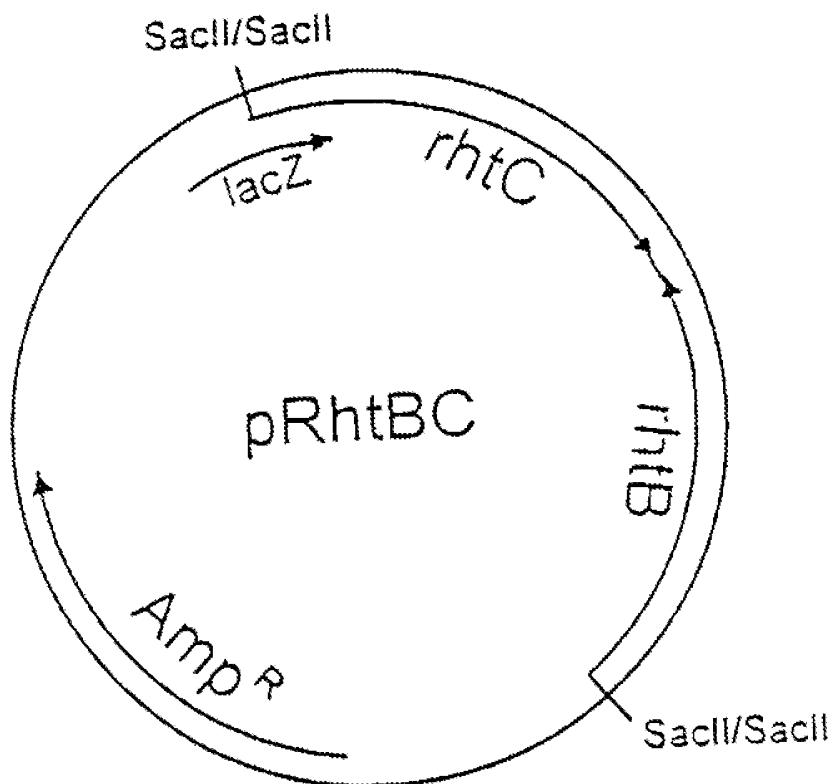
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4

Koniec dokumentu