

K I V O N A T

A thrE gént kódoló új nukleotid-szekvenciák és eljárás L-treonin fermentatív előállítására coryneform baktériumokkal

A találmány tárgyát képezi coryneform mikroorganizmusokban replikálódni képes, előnyösen - *Corynebacterium* eredetű - rekombináns DNS, amely legalább egy thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmaz és L-treonin előállítására irányuló eljárás, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

a) olyan mikroorganizmusok fermentációját, amelyekben legalább a thrE gént, adott esetben további génekkel kombinálva felerősítik (túlzottan kifejezik);

b) L-treonin felhalmozását a tápoldatban vagy a mikroorganizmusok sejtjeiben; és

c) L-treonin izolálását.

Jellemezve a thrE gént
Rein

A thrE gént kódoló új nukleotid-szekvenciák és eljárás L-treonin fermentatív előállítására coryneform baktériumokkal

A találmány tárgyát képezik a thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciák és eljárás L-treonin fermentatív előállítására felerősített thrE gént hordozó coryneform baktériumokkal.

L-treonint alkalmaznak az állati takarmányozásban, a humán gyógyászatban és a gyógyszeriparban.

Ismeretes, hogy L-treonin coryneform baktérium törzsek - különösen *Corynebacterium glutamicum* - fermentációjával állítható elő. Nagy jelentősége miatt állandóan dolgoznak az előállítási eljárás javításán. Az eljárás javítása érinthet fermentációs technikai intézkedéseket, mint például a keverés és oxigénellátás vagy a tápoldat összetétele, mint például cukorkoncentráció a fermentáció során, vagy a termék feldolgozását például ioncserés kromatográfiával vagy magának a mikroorganizmusnak a belső teljesítmény sajátosságait.

Ezen mikroorganizmusok teljesítmény sajátosságainak javítására a mutagenézis, szelekció és mutáns kiválasztás módszereit alkalmazzák. Ezen a módon előállíthatók olyan törzsek, amelyek antimetabolitokkal - mint például a treonin analóg α -amino- β -hidroxivaleriánsavval (AHV) - szemben rezisztensek vagy a szabályozás szempontjából fontos aminosavakra auxotrófok és L-treonint termelnek.

Néhány éve a rekombináns DNS technika módszereit szintén alkalmazzák L-treonint termelő *Corynebacterium* törzsek javítására, ahol egyes treonin bioszintézis géneket

megsokszoroznak (amplifikálnak) és vizsgálják ennek az L-treonin termelésre gyakorolt hatását.

A feltalálók L-treonin megjavított fermentatív előállítására irányuló intézkedések rendelkezésre bocsátását tűzték ki feladatul.

L-treonint alkalmaznak az állati takarmányozásban, a humán gyógyászatban és a gyógyszeriparban. Ezért általános érdeklődés mutatkozik L-treonin előállításában új, javított eljárás közzétételére.

A találmány tárgyát képezi coryneform mikroorganizmusokban replikálódni képes, előnyösen - *Corynebacterium* eredetű - rekombináns DNS, amely legalább az 1. számú és 3. számú szekvenciában bemutatott, thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmazza.

Szintén a találmány tárgyát képezi az 1. igénypont szerinti replikálódni képes DNS, amely

(i) az 1. számú vagy 3. számú szekvenciában bemutatott, thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciát, vagy

(ii) legalább egy szekvenciát, amely a genetikai kód degeneráltságán belül megfelel az (i) szekvenciáknak, vagy

(iii) legalább egy szekvenciát, amely az (i) vagy (ii) szekvenciákkal komplementer szekvenciával hibridizál, és/vagy adott esetben

(iv) (i)-ben működés szempontjából semleges szenz mutációkat tartalmaz.

Szintén a találmány tárgyát képezik a nevezett, replikációra képes DNS bevezetésével transzformált coryneform, különösen a *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok.

Végül a találmány tárgyát képezi L-treonin fermentatív előállítására szolgáló eljárás olyan coryneform baktériumok alkalmazásával, amelyek egyébként már termelnek L-treonint és amelyekben a thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciá(ka)t felerősítjük, túlzottan kifejezzük (überexpression).

Az ebben az összefüggésben használt „felerősítés” kifejezés egy mikroorganizmusban egy vagy több enzim intracelluláris aktivitásának fokozását jelenti. Ezeket az enzimeket olyan megfelelő DNS-ek kódolják, amelyekben például megemeltük a gén másolatainak számát, egy erős promótert vagy a megfelelő enzimet nagy aktivitással kódoló gént alkalmazunk és adott esetben ezen intézkedéseket kombináljuk.

A találmány tárgyát képező mikroorganizmusok képesek L-treonin előállítására glükózból, szacharózból, laktózból, fruktózból, maltózból, melaszából, keményítőből, cellulózból vagy glicerinnél és etanolból. Coryneform baktériumok képviselőiről, különösen a *Corynebacterium* nemzetségről lehet szó. A *Corynebacterium* nemzetségben belül különösen a *Corynebacterium glutamicum* faj az, amelyet a szakma L-aminosavakat termelő képességéről ismer.

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

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC 14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

és az ezekből előállított L-treonint termelő mutánsok illetve törzsek, mint például

Corynebacterium glutamicum ATCC 21649

Brevibacterium flavum ATCC BB69

Brevibacterium flavum DSM 5399

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269

Brevibacterium lactofermentum TBB-10.

Sikerült a thrE gént izolálnunk *Corynebacterium glutamicum*-ból. Az izoláláshoz mindenekelőtt egy thrE génben hibás mutánst állítunk elő *Corynebacterium glutamicum*-ból. Ehhez egy megfelelő kiindulási törzset, mint például az ATCC 14752 vagy ATCC 13032 törzset mutagenézisnek vetünk alá.

Klasszikus mutagenézis eljárások a kémiai anyagokkal történő kezelések, például N-metil-N-nitro-N-nitrózóguanidinnel vagy az UV besugárzás. Mutációk kiváltásának ilyen eljárásai általánosan ismertek és elolvashatók többek között az alábbi kézikönyvekben [Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992) vagy Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA (1981)].

Egy másik mutagenézis eljárás a transzpozon mutagenézis módszer, egy transzpozonnak DNS szekvenciába történő „beugrási” képességét használja ki, amelynek következtében az érintett gén

funkciója zavart szenved illetve kikapcsolódik. Coryneform baktérium transzpozonok ismertek a szakmában. Ily módon izolálták *Corynebacterium xerosis* M82B törzsből a Tn5432 eritromicin rezisztencia transzpozont [Tauch et al., Plasmid 33, 168-179 (1995)] és a Tn5546 klóramfenikol rezisztencia transzpozont.

Egy másik transzpozon a Tn5531 transzpozon, amelyet Ankri és munkatársai írtak le [J. Bacteriol. 178, 4412-4419 (1996)] és amelyet példaként beépítettünk a találmányba. A Tn5531 transzpozon tartalmazza az aph3 kanamicin rezisztencia gént és átadható az 1. ábrán bemutatott pCGL0040 plazmidvektor formájában. A Tn5531 transzpozon nukleotid-szekvenciája a National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) biotechnológiai információs központban az U53587 letéti számon szabadon hozzáférhető.

Sikeres mutagenézis - előnyösen transzpozon mutagenézis - után a thrE génben hibás mutánst keresünk. A thrE génben hibás arról ismerhető fel, hogy minimál tápagaron jól növekszik, treonint tartalmazó oligopeptiddel - például treonil-treonil-treonin tripeptiddel - kiegészített minimál tápagaron azonban gyenge növekedést mutat.

Egy példa ilyen mutánsra az ATCC 14752 Δ ilvAthrE::Tn5531 törzs.

A leírt módon előállított törzs azután felhasználható a thrE gén izolálására és klónozására.

Ehhez létrehozható a szóban forgó baktérium génbankja. Génbankok létesítését általánosan ismert tankönyvek és

kézikönyvek leírják. Példaként megemlíthetők a következő tankönyvek [Winnacker, Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie, Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland (1990) vagy Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]. Egy nagyon ismert génbank az *E. coli* K-12 törzs W3110, amelyet Kohara és munkatársai λ -vektorokban hoztak létre [Cell 50, 495-508 (1987)]. Bathe és munkatársai *C. glutamicum* ATCC 13032 génbankot írnak le [Mol. Gen. Genetics 252, 255-265 (1996)], amelyet a SuperCos I plazmidvektor [Wahl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2160-2164 (1987)] segítségével *E. coli* K-12 törzs NM554-ben [Raleigh et al., Nucl. Acids Res. 16, 1563-1575 (1988)] hoztak létre. A találmány számára alkalmasak olyan vektorok, amelyek coryneform baktériumokban, előnyösen *Corynebacterium glutamicum*-ban replikálódnak. Ilyen vektorok ismertek a szakmában; példaként említhető a pZ1 plazmidvektor, amelyet Menkel és munkatársai írtak le [Appl. Environ. Microbiol. 64, 549-554 (1989)]. A leírt módon kapott génbankot végül transzformáció vagy elektroporáció segítségével a *thrE* génben hibás indikátor törzsbe juttatjuk és olyan transzformátumokat keresünk, amelyek treonint tartalmazó oligopeptidek jelenlétében minimál tápagaron növekedni képesek. A klónozott DNS fragmentum azután alávethető szekvencia analízisnek.

Egy coryneform baktérium Tn5531 transzpozonnal végzett mutagenézis révén nyert mutánsának – például az ATCC 14752A *ilvAthrE::Tn5531* törzsnek – a felhasználásánál a *thrE::Tn5531* allél a benne levő *aph3* kanamicin rezisztencia gén kihasználása

mellett közvetlenül klónoozható és izolálható. Ehhez ismert klónozó vektorokat, mint például pUC18-at [Norlander et al., Gene 26, 101-106 (1983) és Yanisch-Perron et al., Gene 33, 103-119 (1985)] alkalmazunk. Gazdaszervezetként különösen megfelelőek olyan *E. coli* törzsek, amelyek restrikció és rekombináció hiányosak. Egy példa erre a Grant és munkatársai által leírt DH5 α mc^r törzs [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)]. A transzformátumok keresése kanamicin jelenlétében történik. Végezetül szekvenáljuk a kapott transzformátumok plazmid DNS-ét. Ehhez felhasználható a Sanger és munkatársai által leírt didezoxi-lánctörő módszer [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)]. Ezáltal megkapjuk a thrE génszekvencia Tn5531 inszerciós helyhez képest upstream és downstream elhelyezkedő szekvenciákat. A kapott nukleotid-szekvenciákat azután kereskedelembe kapható szekvencia analízis programokkal - mint például a Lasergene program csomaggal (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) vagy a HUSAR program csomaggal (Release 4.0, EMBL, Heidelberg, Deutschland) - analizáljuk és összeillesztjük.

Ilyen módon kaptuk meg az új, thrE gént kódoló DNS szekvenciát *C. glutamicum*-ból, amely 1. számú szekvenciaként a találmány tárgyának részét képezi. Továbbá a rendelkezésre álló DNS szekvenciából a fent leírt módszerekkel levezettük a megfelelő fehérje aminosav-szekvenciáját. A 2. számú szekvenciában a thrE gén termékének így adódott aminosav-szekvenciáját mutatjuk be.

Olyan kódoló szekvenciák, amelyek az 1. számú szekvenciából

a genetikai kód degeneráltsága révén adódnak, szintén a találmány oltalmi körébe tartoznak. Ugyanígy a találmány tárgyának részét képezik az 1. számú szekvenciával vagy az 1. számú szekvencia részeivel hibridizáló DNS szekvenciák. Továbbá a szakmában szenz mutációként ismertek fehérjékben történő konzervatív aminosavcserék, mint például glicin cseréje alaninra vagy aszparaginsav cseréje glutaminsavra, amelyek a fehérje aktivitásában nem okoznak alapvető változást, azaz működés szempontjából semlegesek. Továbbá ismert, hogy egy fehérje N- és/vagy C-terminálisán bekövetkező változások annak működését lényegesen nem korlátozzák, sőt akár stabilizálhatják. A szakember talál erre vonatkozó közleményeket többek között az alábbiakban [Ben-Bassat et al., J. Bacteriol. 169, 751-757 (1987); O'Regan et al., Gene 77, 237-251 (1989); Sahin-Toth et al., Protein Sci. 3, 240-247 (1994); Hochuli et al., Bio/Technol. 6, 1321-1325 (1988)] és ismert genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben. Olyan aminosav-szekvenciák, amelyek megfelelő módon adódnak a 2. számú szekvenciából, szintén a találmány tárgyát képezik.

Az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvencia kihasználásával alkalmas primerek szintetizálhatók és ezek azután felhasználhatók különböző coryneform baktériumok és törzsek thrE génjének polimeráz láncreakció (PCR) segítségével történő megsokszorozásához. Ehhez leírásokat talál a szakember többek között például a következő kézikönyvekben [Gait, Oligonukleotide Synthesis, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, UK (1984) és Newton und Graham, PCR, Spektrum

Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland (1994)]. Másik megoldásként az 1. számú szekvenciában bemutatott nukleotid-szekvencia vagy annak részei felhasználhatók szondaként thrE gének génbankokban - különösen coryneform baktériumok génbankjaiban - történő kereséséhez. Ehhez leírásokat talál a szakember többek között például a következő szakkönyvben és publikációban [The DIG System Users Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland (1993) és Liebl et al., Int. J. System. Bacteriol. 41, 255-260 (1991)]. Az így megsokszorozott thrE gént tartalmazó DNS fragmentumokat azután klónozzuk és szekvenáljuk.

Ilyen módon kapjuk az ATCC 13032 törzsből származó thrE gén 3. számú szekvenciában bemutatott DNS szekvenciáját, amely szintén a találmány tárgyát képezi. A 4. számú szekvenciában az ebből adódó aminosav-szekvenciát mutatjuk be.

Szintén a találmány tárgyát képezi a thrE gén izolálására szolgáló eljárás, azzal jellemezve, hogy indikátor törzsként thrE génben hibás mutánsokat, előnyösen coryneform baktériumokat nyerünk ki, amelyek treonin tartalmú oligopeptidet tartalmazó tápközegben nem, vagy csak csekély mértékben szaporodnak és

a) a thrE gént egy génbank létesítése után azonosítjuk és izoláljuk, vagy

b) transzpozon mutagenézis esetében az előnyben részesített, antibiotikum rezisztenciával rendelkező transzpozonra szelektálunk és így kapjuk meg a thrE gént.

Felfedeztük, hogy coryneform baktériumok a thrE gén túlzott kifejeződésekor jobban termelnek L-treonint.

Túlzott kifejeződés eléréséhez megemelhető a megfelelő gén másolatainak száma vagy mutáció indukálható a promóter és szabályozó régióban vagy a struktúrgéntől upstream elhelyezkedő riboszómakötő-helyen. Ugyanílyen módon hatnak a struktúrgéntől upstream beépített expressziós kazetták. Továbbá indukálható promótereken keresztül lehetséges az L-treonin termelés során a kifejeződés fokozása. A m-RNS élettartamának meghosszabítására tett intézkedések szintén javítják a kifejeződést. Továbbá az enzimfehérjék lebomlásának megakadályozása révén szintén felerősödik az enzimaktivitás. A gének vagy génszerkezetek rendelkezésre állhatnak különböző másolatszámokban plazmidokban vagy kromoszómába beépítve és megsokszorozva. Másik lehetőségként az érintett gének túlzott kifejeződése elérhető a tápoldat összetétel és tenyésztési körülmények megváltoztatásával is.

A szakember útbaigazítást talál ehhez többek között az alábbi hivatkozásokban [Martin et al., Bio/Technol. 5, 137-146 (1987); Guerrero et al., Gene 138, 35-41 (1994); Tsuchiya und Morinaga, Bio/Technol. 6, 428-430 (1988); Eikmanns et al., Gene 102, 93-98 (1991); az EPS 0 472869 és U.S.P. 4,601,893 számú szabadalmi iratok; Schwarzer und Pühler, Bio/Technol. 9, 84-87 (1991); Reinscheid et al., Appl. Environ. Microbiol. 60, 126-132 (1994); LaBarre et al., J. Bacteriol. 175, 1001-1007 (1993); a WO 96/15246 közzétételi számú szabadalmi bejelentés; Malumbres et al., Gene 134, 15-24 (1993); a JP-A 10-229891 számú szabadalmi irat; Jensen und Hammer, Biotech. Bioeng. 58, 191-195 (1998); Makrides, Microbial. Rev. 60, 512-538 (1996)] és ismert

genetikai és molekuláris biológiai tankönyvekben.

Egy példa olyan plazmidra, amelynek segítségével a thrE gén túlzottan kifejezhető, a DM368-2 pZlthrE törzsben található pZlthrE plazmid (2. ábra). A pZlthrE plazmid a pZ1 plazmidon nyugvó *C. glutamicum*-*E. coli* ingavektor, amelyet Menkel és munkatársai írtak le [Appl. Environ. Microbiol. 64, 549-554 (1989)]. Egyéb, a *C. glutamicum*-ban replikációra képes plazmidvektorok, mint például a pEKEx1 [Eikmanns et al., Gene 102, 93-98 (1991)] vagy a pZ8-1 [EP-B-0 375 889] ugyanilyen módon alkalmazhatók.

Az L-treonin előállításához az új thrE gén mellett kiegészítésként előnyös lehet az ismert treonin bioszintézis utak vagy az anaplerotikus anyagcsere vagy a citromsav kör egy vagy több enzimjének túlzott kifejezése. Így például egyidejűleg túlzott kifejeződésre készíthető

- a homoszerin dehidrogenázt kódoló hom-gén [Peoples et al., Mol. Microbiol. 2, 63-72 (1988)] vagy egy „feed back rezisztens” homoszerin dehidrogenázt kódoló hom^{dr}-allél [Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)]; vagy

- a piruvát karboxilázt kódoló pyc-gén [DE-A-19 831 609];
vagy

- a malát:kinon oxidoreduktázt kódoló mqo-gén [Molenaar et al., Eur. J. Biochem. 254, 395-403 (1998)].

Az L-treonin termelődésre a thrE gén túlzott kifejeződése mellett előnyös lehet továbbá nemkívánatos mellékreakciók, mint például a treonin dehidrogenáz kikapcsolása [Nakayama, Breeding of Amino Acid Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.)

Academic Press, London UK (1982) és Bell and Turner, J. Biochem. 156, 449-458 (1976)].

A találmány szerint előállított mikroorganizmusok L-treonin előállítás céljából szaporíthatók folyamatosan vagy szakaszosan batch fermentációban, vagy rátáplálásos (fed batch) vagy ismételt rátáplálásos (repeated fed batch) fermentációban. Ismert szaporítási módszerekről összeállítás olvasható Chmiel tankönyvében [Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991)] vagy Storhas tankönyvében [Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994)].

A felhasználásra kerülő szaporító tápoldat alkalmas módon meg kell hogy feleljen a mindenkori törzs igényeinek. Különböző mikroorganizmusok számára tápoldatok leírása megtalálható a „Manual of Methods for General Bacteriology” című kézikönyvben [American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA (1981)]. Szénforrásként felhasználható cukor és szénhidrát, mint például glükóz, szacharóz, laktóz, fruktóz, maltóz, melasz, keményítő és cellulóz, olajok és zsírok, mint például szójaolaj, napraforgóolaj, földimogyoró olaj és kókuszolaj, zsírsavak, mint például palmitinsav, sztearinsav és linolsav, alkoholok, mint például glicerín és etanol és szerves savak, mint például ecetsav. Ezek az anyagok felhasználhatók külön-külön vagy keverékben. Nitrogénforrásként alkalmazhatók szerves nitrogéntartalmú vegyületek, mint pepton, élesztőkivonat, húskivonat, malátakivonat, kukoricailekvár, szójaliszt és karbamid, vagy szervesetlen vegyületek, mint ammónium-szulfát,

ammónium-klorid, ammónium-foszfát, ammónium-karbonát és ammónium-nitrát. A nitrogénforrások felhasználhatók külön-külön vagy keverékként. Foszforforrásként alkalmazható foszforsav, kálium-dihidrogén-foszfát vagy dikálium-hidrogén-foszfát vagy ezek megfelelő nátrium sója. A tápoldatnak tartalmaznia kell továbbá fémsókat, mint például magnézium-szulfátot vagy vas-szulfátot, amelyek szükségesek a növekedéshez. Végül a fent említett anyagokhoz kiegészítésként adhatók még létfontosságú növekedési anyagok, mint aminosavak és vitaminok. A szaporító tápoldathoz ezenfelül megfelelő oltóanyag mennyiségek adhatók. A nevezett kiegészítő anyagok hozzáadhatók a tenyészethez egy adagban vagy a tenyésztés során megfelelő módon adagolva.

A tenyészet pH-kontrolljához bázikus vegyületek, mint nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid, ammónia illetve ammónium-hidroxid vagy savas vegyületek, mint foszforsav vagy kénsav adagolható megfelelő módon. A habképződés kontrolljához használható habzásgátló, mint például zsírsav-poliglikolészter. Plazmidok stabilitásának fenntartásához adhatók a tápoldathoz megfelelő szelektíven ható anyagok, például antibiotikumok. Aerob körülmények biztosításához oxigén vagy oxigéntartalmú gázkeverékek, mint például levegő vezethetők be a tenyészetbe. A tenyészet hőmérséklete normális körülmények között 20 °C és 45 °C között, előnyösen 25 °C és 40 °C között van. A tenyésztést addig folytatjuk, amíg az L-treonin képződés maximális értéket el nem ér. Ez a cél normális körülmények között 10-160 óra alatt érhető el.

Az L-treonin analízise elvégezhető ioncserés

kromatográfiával és ahhoz kapcsolódó ninhidrines származékképzéssel [Spackman et al., *Analitical Chemistry* 30, 1190 (1958)] vagy reverz fázisú HPLC-vel [Lindroth et al., *Analitical Chemistry* 51, 1167-1174 (1979)].

A következő mikroorganizmusokat helyeztük letétbe a Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) német törzs- és szövetgyűjteményben a Budapesti Szerződés szerint:

Brevibacterium flavum DM368-2 pZlthrE törzset, mint DSM 12840

Escherichia coli GM2929 pCGL0040 törzset, mint DSM 12839.

Példák

A találmányt a következő kiviteli formák segítségével világítjuk meg közelebbről.

Plazmid-DNS izolálását *Escherichia coli*-ból, valamint minden restrikciós, Klenow- és alkalikus foszfatázos kezelési technikát a Sambrook és munkatársai által írt kézikönyv [*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] szerint végeztünk. *Escherichia coli* transzformálását - ha külön nem említjük - Chung és munkatársai módszere [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175 (1989)] szerint végeztük.

1. példa

A *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 törzsből származó thrE gén klónozása és szekvenálása

1. Transzpozon mutagenézis és mutáns kiválasztás

A *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA törzset

mutagenézisnek vetettük alá a Tn5531 transzpozonnal, melynek szekvenciája az U53587 letéti szám alatt található a National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) nukleotid adatbankjában. A *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 ilvA génjébe egy deléció bevitelét a Schäfer és munkatársai által leírt [Gene 145, 69-73 (1994)] géncsere rendszer segítségével végeztük el. Ennél a Sahm és munkatársai által összeállított pK19mobsacB Δ ilvA inaktivációs vektort [Appl. Environ. Microbiol. 65, 1973-1979 (1999)] használtuk a delécióhoz. Először a metiláz hiányos *Escherichia coli* SCS110 törzset [Jerpseth and Kretz, Strategies in Molecular Biology 6, 22 (1993)] (Stratagene, Heidelberg) transzformáltuk a pK19mobsacB Δ ilvA vektor 200 ng-jával. A transzformátumokat 50 μ g/ml kanamicint tartalmazó LB agarlemezen mutatott kanamicin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk. A transzformátumok közül egyikből kinyertük a pK19mobsacB Δ ilvA plazmidot. Ezt az inaktivációs plazmidot azután elektroporáció segítségével [Haynes et al., FEMS Microbiol. Lett. 61, 329-334 (1989)] a *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 törzsbe juttattuk. Azokat a klónokat, amelyeknél az inaktivációs vektor a genomba beépült, 15 μ g/ml kanamicint tartalmazó LBHIS agarlemezen mutatott kanamicin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk [Liebl et al., FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-304 (1989)]. Ily módon 2000 olyan klónt kaptunk, amelyeket treonil-treonil-treonin jelenlétében lelassult növekedésre megvizsgáltunk. Ehhez minden klónt egyenként felvittünk 2 mM treonil-treonil-treonint tartalmazó vagy nélküli CGXII minimál táptalaj agarlemezre. A tápközeg azonos volt a Keilhauer és

munkatársai által leírt CGXII táptalajjal [J. Bacteriol. 175, 5593-5603 (1993)], kiegészítésként azonban 25 µg/ml kanamicint, 300 mg/l L-izoleucint és 15 g/l agart tartalmazott. A Keilhauer és munkatársai által leírt táptalaj összetételét az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A CGXII táptalaj összetétele

Komponens	Koncentráció
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/l
karbamid	5 g/l
KH_2PO_4	1 g/l
K_2HPO_4	1 g/l
$\text{Mg SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/l
3-morfolino-propánszulfonsav	42 g/l
CaCl_2	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1 mg/l
CuSO_4	0,2 mg/l
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
biotin	0,2 mg/l
glükóz	40 g/l
protokatechinsav	30 mg/l

Az agarlemezeket 30 °C-on inkubáltuk és 12, 18 és 24 óra elteltével vizsgáltuk a növekedést. Találtunk egy olyan transzpozon mutáns, amely treonil-treonil-treonin nélkül a kiindulási *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA törzzsel összehasonlíthatóan növekedett, míg 2 mM treonil-treonil-treonin jelenlétében lelassult növekedést mutatott. Ezt ATCC14752 Δ ilvAthrE::Tn5531 jelzéssel láttuk el.

2. Az ATCC14752 Δ ilvAthrE::Tn5531-ben levő Tn5531 inszerciós

helyek klónozása és szekvenálása

Az 1.1. példában leírt mutánsban a Tn5531 transzpozonhoz képest upstream elhelyezkedő inszerciós hely klónozásához először ennek a mutáns törzsnek a kromoszómális DNS-ét izoláltuk [Schwarzer et al., Bio/Technology 9, 84-87 (1990)] és ebből 400 ng-ot EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítottunk. A teljes restrikciós tételt a szintén EcoRI-gyel linearizált pUC18 vektorral [Norander et al., Gene 26, 101-106 (1983)] (Roche Diagnostics, Mannheim) ligáltuk. A teljes ligációs tétellel *E. coli* DH5 α mc^r törzset [Grant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)] transzformáltunk elektroporáció útján [Dower et al., Nucl. Acid Res. 16, 6127-6145 (1988)]. Azokat a transzformátumokat, amelyeknél a pUC18 vektoron a Tn5531 transzpozon inszerciós helyei klónozottan előfordultak, 50 μ g/ml karbenicillint és 25 μ g/ml kanamicint tartalmazó LB agarlemezekon mutatott karbenicillin és kanamicin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk. A transzformátumok közül háromból kinyertük a plazmidokat és restrikciós analízissel meghatároztuk a klónozott inszertumok méreteit. Az egyik, körülbelül 5,7 kb nagyságú inszertummal rendelkező plazmidon az inszerciós hely nukleotid-szekvenciáját a didezoxi-lánchasító módszerrel határoztuk meg [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)]. Ehhez az inszertumból 2,2 kb-t a következő oligonukleotid primerből kiindulva szekvenáltuk: 5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'.

A transzpozonhoz képest downstream elhelyezkedő inszerciós hely azonosításához a mutáns kromoszómális DNS-ét az XbaI

restrikciós endonukleázzal hasítottuk és az XbaI-gyel linearizált pUC18 vektorba ligáltuk. A további klónozást a fent leírtak szerint végeztük. Az egyik, körülbelül 8,5 kb nagyságú inszertummal rendelkező plazmidon az inszerciós hely nukleotid-szekvenciáját a didezoxi-lánchasító módszerrel határoztuk meg [Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)]. Ehhez az inszertumból 0,65 kb-t a következő oligonukleotid primerből kiindulva szekvenáltuk: 5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'.

A kapott nukleotid-szekvenciákat a Lasergene programcsomaggal (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analizáltuk és összeillesztettük. Ezt a nukleotid-szekvenciát 1. számú szekvenciaként adjuk meg. Az analízis eredménye egy 1467 bp hosszúságú nyílt leolvasási keret. A megfelelő gént thrE génként jelöltük. Az ehhez tartozó géntermék 489 aminosavat ölel fel és 2. számú szekvenciaként adjuk meg.

2. példa

A *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 törzsből származó thrE gén klónozása és szekvenálása

A thrE gént a pUC18 *E. coli* klónozó vektorba [Norlander et al., Gene 26, 101-106 (1983)] (Roche Diagnostics, Mannheim) klónoztuk. A klónozást két lépésben végeztük. Először a *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 törzsből származó gént polimeráz láncreakcióval (PCR) a következő, az 1. számú szekvenciából levezetett oligonukleotid primer segítségével megsokszoroztuk. thrE-előre irányuló: 5'-CCC CTT TGA CCT GGT GTT ATT G-3'

thrE reverz: 5'-CGG CTG CGG TTT CCT CTT-3'

A polimeráz láncreakciót 30 ciklusban, 200 μ M dezoxinukleotidtrifoszfát (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), a megfelelő oligonukleotidból 1 μ M, 100 ng *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 kromoszómális DNS, 1/10 térfogatnyi 10-szeres reakciópuffer és 2,6 egység hőstabil Taq-/Pwo-DNS polimeráz keverék (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim) jelenlétében, hőciklizáló berendezésben (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) a következő körülmények között végeztük el: 94 °C 30 másodpercig, 58 °C 30 másodpercig és 72 °C 2 percig.

A megsokszorozott, körülbelül 1,9 kb nagyságú fragmentumot azután a SureClone Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) segítségével a gyártó utasítása szerint a pUC18 vektor SmaI hasítási helyére ligáltuk. A teljes ligációs tétellel transzformáltuk az *E. coli* DH α mc α r törzset [Grant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)]. Transzformátumokat azonosítottunk 50 μ g/ml karbenicillint tartalmazó LB agarlemezeken mutatott karbenicillin rezisztencia alapján. A transzformátumok közül nyolcból kinyertük a plazmidot és restriktációs analízissel átvizsgáltuk az inszertumként előforduló 1,9 kb PCR fragmentumra. Az így előállt rekombináns plazmidot a következőkben pUC18thrE-ként jelöljük.

A pUC18thrE plazmidban levő 1,9 kb PCR fragmentum nukleotidszekvenciáját a Sanger és munkatársai által leírt didezoxilánchasítási módszerrel [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)] határoztuk meg. Itt a pUC18thrE teljes inszertumát szekvenáltuk a következő primer (Roche Diagnostics, Mannheim)

segítségével.

Univerzális primer: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverz primer: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

A nukleotid-szekvenciát 3. számú szekvenciaként adjuk meg. A kapott nukleotid-szekvenciát a Lasergene programcsomaggal (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analizáltuk. Az analízis eredménye egy 1467 bp hosszúságú nyílt leolvasási keret, amelyet thrE génként jelöltünk. Ez egy 489 aminosavból álló polipeptidet kódol, amelyet 4. számú szekvenciaként adunk meg.

3. példa

A thrE gén kifejezése *Corynebacterium glutamicum*-ban

A 2. példában leírt, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 törzsből származó thrE gént kifejezés céljából a pZ1 vektorba klónoztuk [Menkel et al., Appl. Environ. Microbiol. 64, 549-554 (1989)]. Ehhez a pUC18thrE plazmidből SacI és XbaI restrikciós enzimekkel kivágtunk egy 1881 bp nagyságú, a thrE gént tartalmazó DNS fragmentumot. Ennek a fragmentumnak az 5'- és 3'-végét Klenow-enzimmel kezeltük. Az eredményül kapott DNS fragmentumot az előzőleg ScaI-gyel linearizált és defoszforilezett pZ1 vektorba ligáltuk. A teljes ligációs készlettel *E. coli* DH5 α mcr törzset [Grant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)] transzformáltunk. A transzformátumokat 50 μ g/ml kanamicint tartalmazó LB agarlemezen mutatott kanamicin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk. Két transzformátumból kinyertük a plazmidot és restrikciós

analízissal az 1881 bp ScaI/XbaI fragmentum inszertumként való meglétére vizsgáltunk. Az ily módon létrehozott rekombináns plazmidot pZlthrE jelzéssel láttuk el (2. ábra).

A pZl és pZlthrE plazmidokat elektroporációval [Haynes et al., FEMS Microbiol. Lett. 61, 329-334 (1989)] juttattuk be a treonint termelő *Brevibacterium flavum* DM368-2 törzsbe. A DM368-2 törzset az EP-B-0 385 940 számú szabadalmi iratban írják le és a DSM5399 letéti számon található. Transzformátumokat azonosítottunk 15 µg/ml kanamicint tartalmazó LBHIS agarlemezen mutatott kanamicin rezisztenciájuk alapján [Liebl et al., FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-304 (1989)]. Ily módon keletkeztek a *Brevibacterium flavum* DM368-2 pZl és DM368-2 pZlthrE törzsek.

5. példa

L-treonin előállítása *Brevibacterium flavum*-mal

Treonin termelésük vizsgálatához a *B. flavum* DM368-2 pZl és DM368-2 pZlthrE törzseket 50 µg/ml kanamicint tartalmazó 100 ml agy-szív infúziós tápközegekben (Difco Laboratories, Detroit USA) 14 órán keresztül 30 °C-on előszaporítottuk. Ezt követően a sejteket fiziológiás sóoldattal egyszer mostuk és ezzel a szuszpenzióval 60-60 ml CGXII tápoldatot oly módon oltottunk be, hogy a 600 nm-en mért optikai denzitás (OD₆₀₀) 0,5 legyen. A tápközegek azonosak voltak a Keilhauer és munkatársai által leírttal [J. Bacteriol. 175, 5593-5603 (1993)], kiegészítésként azonban ml-ként 50 µg kanamicint tartalmazott. Mindkét törzset 30 °C-on 72 órát szaporítottuk. Kezdetkor, 24, 48 és 72 óra elteltével mintákat vettünk és a sejteket röviden lecentrifugáltuk (5 perc

13000 fordulat/perc mellett, Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland).

A tenyészet felülúszójából az extracelluláris aminosav koncentrációk kvantitatív meghatározása reverz fázisú HPLC-vel [Lindroth et al., Analytical Chemistry 51, 1167-1174 (1979)] történt. HP1100 sorozatba tartozó HPLC készüléket (Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland) használtunk hozzákapcsolt fluoreszcens detektorral (G1321A); a rendszer vezérlése és az adatok kiértékelése HP-Chem állomással történt (Hewlett-Packard). Az analizálandó aminosavoldat 1 μ l-ét automatikus oszlop előtti derivatizálás során 20 μ l orto-ftálaldehid/2-merkaptóetanol kész reagenssel (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Nederlanden) kevertük össze. Az itt keletkező fluoreszcens, kénnel szubsztituált izoindolokat [Jones et al., J. Chrom. 266, 471-482 (1983)] kombinált előoszlop (40x4 mm, Hypersil ODS 5) és főoszlop (Hypersil ODS 5, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland) rendszeren keresztül, növekvő nem-poláros fázis (metanol) gradiensprogrammal bontottuk fel. A poláros eluens nátrium-acetát (0,1 mól, pH 7,2), az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt. Az aminosav származékok fluoreszcens detektálása 230 nm gerjesztési hullámhossznál és 450 nm emissziós hullámhossznál történt. Az aminosav koncentrációkat külső standarddal és kiegészítő belső standardként aszparaginnal összehasonlítva számítottuk ki.

Az eredményeket a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. táblázat

Törzs	L-treonin (g/l)			
	0. óra	24. óra	48. óra	72. óra
DM368-2 pZ1	0	0,46	1,27	1,50
DM368-2 pZ1thrE	0	0,68	1,71	2,04

6. példa

A pEC-Tl8mob2thrE vektor előállítás

1. pEC-Tl8mob2 összeállítása

A szakmában ismert módon állítottuk össze a pEC-Tl8mob2 *E. coli*-C. glutamicum ingavektort.

A vektor tartalmazza a pGAl vektor rep replikációs régióját, beleértve a per replikációs effektort [US-A 5,175,108 számú szabadalmi irat; Nesvera et al., J. Bacteriol. 179, 1525-1532 (1997)], a pAG1 plazmid tetraciklin rezisztenciáért felelős tetA(Z) génjét [US-A 5,158,891 számú szabadalmi irat; NCBI, Bethesda, MD, USA; AF121000 letéti számon], a pMB1 plazmid oriV replikációs régióját [Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 43, 77-90 (1979)], a lacZ α génfragmentumot, beleértve a lac promótert és egy többszörös klónozó helyet (multiple cloning site = mcs) [Norlander et al., Gene 26, 101-106 (1983)] és az RP4 plazmid mob régióját [Simon et al., Bio/Technol. 1, 784-791 (1983)].

Az összeállított vektort az *E. coli* DH5 α törzsbe [Hanahan DNA Cloning, A Practical Approach Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA (1985)] transzformáltuk. A plazmidot hordozó

sejtek kiválogatását a transzformációs tételnek 5 mg/l tetraciklinnel kiegészített LB agarra történő szélesztésével [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] végeztük el. Egy transzformátumból plazmid DNS-t izoláltunk a QIAprep Spin Miniprep Kit segítségével (Qiagen) és az EcoRI és HindIII restriktációs enzimekkel történő hasítást követően agaróz gélelektroforézissel (0,8%) vizsgáltuk. A plazmidot pEC-T18mob2-nek neveztük el és a 3. ábrán mutatjuk be.

2. A pEC-T18mob2thrE összeállítása

A 2. példában leírt, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 törzsből származó thrE gént kifejezés céljából a pEC-T18mob2 vektorba klónoztuk. Ehhez a pUC18thrE plazmidból SacI és XbaI restriktációs enzimekkel kivágtunk egy 1881 bp nagyságú, a thrE gént magában foglaló DNS fragmentumot. Az eredményül kapott DNS fragmentumot az előzőleg SacI és XbaI restriktációs enzimekkel linearizált és defoszforilezett pUC18mob2 vektorba ligáltuk. A teljes ligációs tétellel transzformáltuk az *E. coli* DH5 α mcrr törzset [Grant et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649 (1990)]. A transzformátumokat 5 μ g/ml tetraciklint tartalmazó LB agaron mutatott tetraciklin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk. Két transzformátumból kinyertük a plazmidot és restriktációs analízissel megvizsgáltuk az 1881 bp ScaI/XbaI fragmentum inszertumként való jelenlétére. Az ily módon előállt rekombináns plazmidot pEC-T18mob2thrE jelzéssel láttuk el (4. ábra).

A pEC-T18mob2 és pEC-T18mob2thrE plazmidokat elektroporá-

cióval [Haynes et al., FEMS Microbiol. Lett. 61, 329-334 (1989)] a treonint termelő *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B-DR17 törzsbe [Reinscheid et al., Appl. Environ. Microbiol. 60, 126-132 (1994)] juttattuk be. A transzformátumokat 15 µg/ml kanamicint és 5 µg/ml tetraciklint tartalmazó LBHIS agarlemezekben mutatott kanamicin és tetraciklin rezisztenciájuk alapján azonosítottuk [Liebl et al., FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-304 (1989)]. Ily módon keletkeztek a *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B-DR17/pEC-T18mob2 és MH20-22B-DR17/pEC-T18mob2thrE törzsek.

7. példa

L-treonin előállítás *Corynebacterium glutamicum*-mal

Treonin termelésük vizsgálatához a *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B-DR17/pEC-T18mob2 és MH20-22B-DR17/pEC-T18mob2thrE törzseket 25 µg/ml kanamicint és 5 µg/ml tetraciklint tartalmazó 100 ml agy-szív infúziós tápközegben (Difco Laboratories, Detroit USA) 14 órán keresztül 30 °C-on előszaporítottuk. Ezt követően a sejteket fiziológiás sóoldattal egyszer mostuk és ezzel a szuszpenzióval 60-60 ml CGXII tápoldatot oly módon oltottunk be, hogy a 600 nm-en mért optikai denzitás (OD_{600}) 0,5 legyen. A tápközeg azonos volt a Keilhauer és munkatársai által leírttal [J. Bacteriol. 175, 5593-5603 (1993)], kiegészítésként azonban ml-ként 25 µg kanamicint és 5 µg/ml tetraciklint tartalmazott. Mindkét törzset 30 °C-on 72 órát szaporítottuk. Kezdetkor, 24, 48 és 72 óra elteltével mintákat vettünk és a sejteket röviden lecentrifugáltuk (5 perc 13000 fordulat/perc

mellett, Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland).

A tenyészet felülúszójából az extracelluláris aminosav koncentrációk kvantitatív meghatározását az 5. példában *Brevibacterium flavum*-ra már leírtak szerint reverz fázisú HPLC-vel [Lindroth et al., Analytical Chemistry 51, 1167-1174 (1979)] végeztük. Az aminosav koncentrációkat külső standarddal és kiegészítő belső standardként aszparaginnal összehasonlítva számítottuk ki.

Az eredményeket a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat

Törzs	L-treonin (g/l)			
	0. óra	24. óra	48. óra	72. óra
MH20-22B-DR17/ pEC-T18mob2	0	3,42	5,82	5,78
MH20-22B-DR17/ pEC-T18mob2thrE	0	4,16	7,53	8,05

A következő ábrákat mellékeljük:

1. ábra: A Tn5531 transzpozont tartalmazó pCGL0040 plazmid térképe. A transzpozont nem vonalkázott nyílként jelöljük.
2. ábra: A thrE gént tartalmazó pZ1thrE plazmid térképe.
3. ábra: A pEC-T18mob2 plazmid térképe.
4. ábra: A thrE gént tartalmazó pEC-T18mob2thrE plazmid térképe.

A hosszúságok közelítő adatokként értendők. Az alkalmazott rövidítések a következők:

- Amp: ampicillin rezisztencia gén
- Kan: kanamicin rezisztencia gén

- 'amp: az ampicillin rezisztencia gén 3' -része
- oriBR322: a pBR322 plazmid replikációs régiója
- Tet: tetraciklin rezisztencia gén
- oriV: *E. coli* plazmid által kódolt replikációs origója
- RP4mob: mob régió a plazmid mozgósításához
- rep: plazmid által kódolt replikációs origó *C. glutamicum*
pGAl plazmidból
- per: másolatok kontroll génje pGAl-ből
- lacZ-alpha: a β -galaktozidáz gén lacZ α -génfragmentuma
(N-terminus)

A restrikciós enzimek rövidítéseinek jelentése:

- BamHI: restrikciós endonukleáz *Bacillus amyloliquefaciens*-ből
- BglII: restrikciós endonukleáz *Bacillus globigii*-ből
- EcoRI: restrikciós endonukleáz *Escherichia coli*-ből
- EcoRV: restrikciós endonukleáz *Escherichia coli*-ből
- HindIII: restrikciós endonukleáz *Haemophilus influenzae*-ből
- KpnI: restrikciós endonukleáz *Klebsiella pneumoniae*-ből
- PstI: restrikciós endonukleáz *Providencia stuartii*-ből
- PvuI: restrikciós endonukleáz *Proteus vulgaris*-ből
- SacI: restrikciós endonukleáz *Streptomyces achromogenes*-ből
- SalI: restrikciós endonukleáz *Streptomyces albus*-ből
- SmaI: restrikciós endonukleáz *Serratia marcescens*-ből
- XbaI: restrikciós endonukleáz *Xanthomonas badrii*-ből
- XhoI: restrikciós endonukleáz *Xanthomonas holcicola*-ből

Szekvenciák jegyzéke

AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 2817 bázispár
(B) TÍPUS: DNS

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*
(B) TÖRZS: ATCC14752

(ix) JELLEMZŐK:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
(B) ELHELYEZKEDÉS: 398..1864
(C) EGYÉB INFORMÁCIÓ: thrE gén

(xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

```

aatgaaataa tcccctcacc aactggcgac attcaaacac cgtttcattt ccaaacatcg 60
agccaaggga aaagaaagcc cctaagcccc gtgttattaa atggagactc tttggagacc 120
tcaagccaaa aaggggcatt ttcattaaga aaatacccct ttgacctggt gttattgagc 180
tggagaagag acttgaactc tcaacctacg cattacaagt gcgttgcgct gccaatcgcg 240
ccactccagc accgcagatg ctgatgatca acaactacga atacgtatct tagcgtatgt 300
gtacatcaca atggaattcg gggctagagt atctggtgaa ccgtgcataa acgacctgtg 360
attggactct ttttccttgc aaaatgtttt ccagcgg atg ttg agt ttt gcg acc 415
                                Met Leu Ser Phe Ala Thr
                                1                      5

ctt cgt ggc cgc att tca aca gtt gac gct gca aaa gcc gca cct ccg 463
Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala Ala Lys Ala Ala Pro Pro
                                10                      15                      20

cca tcg cca cta gcc ccg att gat ctc act gac cat agt caa gtg gcc 511
Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr Asp His Ser Gln Val Ala
                                25                      30                      35

ggt gtg atg aat ttg gct gcg aga att gcc gat att ttg ctt tct tca 559
Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly Asp Ile Leu Leu Ser Ser
                                40                      45                      50

ggt acg tca aac agt gat acc aag gtg caa gtt cga gcg gtg acc tct 607
Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln Val Arg Ala Val Thr Ser
                                55                      60                      65                      70

gcg tat ggc ctg tac tat acg cat gtg gat atc acg ttg aat acg atc 655
Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp Ile Thr Leu Asn Thr Ile
                                75                      80                      85

acc atc ttc acc aac atc ggt gtg gag agg aag atg ccg gtc aac gtg 703
Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg Lys Met Pro Val Asn Val
                                90                      95                      100

```

54 174

ttt cat gtt gtg ggc aag ttg gac acc aac ttc tcc aaa ctg tct gag Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn Phe Ser Lys Leu Ser Glu 105 110 115	751
gtt gac cgt ttg atc cgt tcc att cag gct ggt gct acc ccg cct gag Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala Gly Ala Thr Pro Pro Glu 120 125 130	799
gtt gcc gag aaa att ctg gac gag ttg gag caa tcg cct gcg tct tat Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu Gln Ser Pro Ala Ser Tyr 135 140 145 150	847
ggc ttc cct gtt gcg ttg ctt ggc tgg gca atg atg ggt ggc gct gtt Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala Met Met Gly Gly Ala Val 155 160 165	895
gct gtg ctg ttg ggt ggt gga tgg cag gtt tcc cta att gct ttt att Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val Ser Leu Ile Ala Phe Ile 170 175 180	943
acc gcg ttc acg atc att gcc acg acg tca ttt ttg gga aag aag ggt Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser Phe Leu Gly Lys Lys Gly 185 190 195	991
ttg cct act ttc ttc caa aat gtt gtt ggt ggt ttt att gcc acg ctg Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly Gly Phe Ile Ala Thr Leu 200 205 210	1039
cct gca tcg att gct tat tct ttg gcg ttg caa ttt ggt ctt gag atc Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu Gln Phe Gly Leu Glu Ile 215 220 225 230	1087
aaa ccg agc cag atc atc gca tct gga att gtt gtg ctg ttg gca ggt Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Leu Leu Ala Gly 235 240 245	1135
ttg aca ctt gtg caa tct ctg cag gac ggc atc acg ggc gct ccg gtg Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly Ile Thr Gly Ala Pro Val 250 255 260	1183
aca gca agt gca cga ttt ttt gaa aca ctc ctg ttt acc gcc gcc att Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu Leu Phe Thr Gly Gly Ile 265 270 275	1231
gtt gct gcc gtg ggt ttg gcc att cag ctt tct gaa atc ttg cat gtc Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu Ser Glu Ile Leu His Val 280 285 290	1279
atg ttg cct gcc atg gag tcc gct gca gca cct aat tat tcg tct aca Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala Pro Asn Tyr Ser Ser Thr 295 300 305 310	1327
ttc gcc cgc att atc gct ggt ggc gtc acc gca gcg gcc ttc gca gtg Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Ala Phe Ala Val 315 320 325	1375
ggc tgt tac gcg gag tgg tcc tcg gtg att att gcg ggc ctt act gcg Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile Ile Ala Gly Leu Thr Ala 330 335 340	1423
ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt gtt tat tta gcc ccc Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly Pro 345 350 355	1471
gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt ggt Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly Gly 360 365 370	1519

54.174

ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att gcc 1567
 Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile Ala
 375 380 385 390

ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg tac 1615
 Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met Tyr
 395 400 405

gcc acc ttg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg gtt 1663
 Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala Val
 410 415 420

gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt gag 1711
 Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly Glu
 425 430 435

tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac cca tac cgt 1759
 Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr Arg
 440 445 450

gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag cag 1807
 Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu Gln
 455 460 465 470

aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat caa aga ttc ggt 1855
 Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe Gly
 475 480 485

aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtctttcgc ttaaatagcg 1904
 Asn Lys Arg

tagaatatcg ggtcgatcgc ttttaaacac tcaggaggat ccttgccggc caaaatcacg 1964

gacactcgtc ccacccaga atcccttcac gctgttgaag aggaaaccgc agccggtgcc 2024

cgcaggattg ttgccaccta ttctaaggac ttcttcgacg gcgtcacttt gatgtgcatg 2084

ctccggcgttg aacctcaggg cctgcgttac accaaggctcg cttctgaaca cgaggaagct 2144

cagccaaaaga aggctacaaa gcggactcgt aaggcaccag ctaagaaggc tgctgctaag 2204

aaaacgacca agaagaccac taagaaaact actaaaaaga ccaccgcaaa gaagaccaca 2264

aagaagtctt aagccggatc ttatatggat gattccaata gctttgtagt tgttgctaac 2324

cgtctgccag tggatatgac tgtccacca gatggtagct atagcatctc cccagcccc 2384

ggtggccttg tcacggggct tcccccggt ctggaacaac atcgtggatg ttgggtcgga 2444

tggcctggaa ctgtagatgt tgcaccgaa ccatttcgaa cagatacggg tgttttgctg 2504

caccctgttg tcctcactgc aagtgactat gaaggcttct acgagggtt tcaaacgca 2564

acgctgtggc ctcttttcca cgatttgatt gttactccgg tgtacaacac cgattggtgg 2624

catgcgtttc gggaagtaaa cctcaagttc gctgaagccg tgagccaagt ggcggcacac 2684

ggtgccactg tgtgggtgca ggactatcag ctggtgctgg ttccctggcat ttgcgccag 2744

atgcgcctg atttgaagat cggttttctc ctccacattc ccttccttc cctgatctg 2804

ttccgtcagc tgc 2817

A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 489 aminosav

(B) TÍPUS: fehérje

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(B) TÖRZS: ATCC14752

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met Leu Ser Phe Ala Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10 15

Ala Lys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr
 20 25 30

Asp His Ser Gln Val Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly
 35 40 45

Asp Ile Leu Leu Ser Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln
 50 55 60

Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp
 65 70 75 80

Ile Thr Leu Asn Thr Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg
 85 90 95

Lys Met Pro Val Asn Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn
 100 105 110

Phe Ser Lys Leu Ser Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala
 115 120 125

Gly Ala Thr Pro Pro Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu
 130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ser Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala
 145 150 155 160

Met Met Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val
 165 170 175

Ser Leu Ile Ala Phe Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser
 180 185 190

Phe Leu Gly Lys Lys Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly
 195 200 205

Gly Phe Ile Ala Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu
 210 215 220

Gln Phe Gly Leu Glu Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile
 225 230 235 240

Val Val Leu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly
 245 250 255

Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270

B. 17.

Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285

Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300

Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320

Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335

Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350

Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365

Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 370 375 380

Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 385 390 395 400

Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415

Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430

Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445

Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 450 455 460

Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 465 470 475 480

Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485

A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZ: 1909 bázispár
(B) TÍPUS: DNS

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*
(B) TÖRZS: ATCC13032

(ix) JELLEMZŐK:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
(B) ELHELYEZKEDÉS: 280..1746
(C) EGYÉB INFORMÁCIÓ: thrE gén

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

```

agcttgcatg cctgcaggtc gactctagag gatccccccc ctttgacctg gtgttattga 60
gctggagaag agacttgaac tctcaaccta cgcattacaa gtgcggttgcg ctgccaattg 120
cgccactcca gcaccgcaga tgctgatgat caacaactac gaatacgtat cttagcgtat 180
gtgtacatca caatggaatt cggggctaga gtatctggtg aaccgtgcat aaacgacctg 240

tgattggact ctttttcctt gcaaaatggt ttccagcgg atg ttg agt ttt gcg      294
                               Met Leu Ser Phe Ala
                               1                      5

acc ctt cgt ggc cgc att tca aca gtt gac gct gca aaa gcc gca cct      342
Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala Ala Lys Ala Ala Pro
                               10                      15                      20

ccg cca tcg cca cta gcc ccg att gat ctc act gac cat agt caa gtg      390
Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr Asp His Ser Gln Val
                               25                      30                      35

gcc ggt gtg atg aat ttg gct gcg aga att ggc gat att ttg ctt tct      438
Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly Asp Ile Leu Leu Ser
                               40                      45                      50

tca ggt acg tca aat agt gac acc aag gta caa gtt cga gca gtg acc      486
Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln Val Arg Ala Val Thr
                               55                      60                      65

tct gcg tac ggt ttg tac tac acg cac gtg gat atc acg ttg aat acg      534
Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp Ile Thr Leu Asn Thr
                               70                      75                      80                      85

atc acc atc ttc acc aac atc ggt gtg gag agg aag atg ccg gtc aac      582
Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg Lys Met Pro Val Asn
                               90                      95                      100

gtg ttt cat gtt gta ggc aag ttg gac acc aac ttc tcc aaa ctg tct      630
Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn Phe Ser Lys Leu Ser
                               105                      110                      115

```

54 174

gag gtt gac cgt ttg atc cgt tcc att cag gct ggt gcg acc ccg cct	678
Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala Gly Ala Thr Pro Pro	
120 125 130	
gag gtt gcc gag aaa atc ctg gac gag ttg gag caa tcc cct gcg tct	726
Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu Gln Ser Pro Ala Ser	
135 140 145	
tat ggt ttc cct gtt gcg ttg ctt ggc tgg gca atg atg ggt ggt gct	774
Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala Met Met Gly Gly Ala	
150 155 160 165	
ggt gct gtg ctg ttg ggt ggt gga tgg cag gtt tcc cta att gct ttt	822
Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val Ser Leu Ile Ala Phe	
170 175 180	
att acc gcg ttc acg atc att gcc acg acg tca ttt ttg gga aag aag	870
Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser Phe Leu Gly Lys Lys	
185 190 195	
ggt ttg cct act ttc ttc caa aat gtt gtt ggt ggt ttt att gcc acg	918
Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly Gly Phe Ile Ala Thr	
200 205 210	
ctg cct gca tcg att gct tat tct ttg gcg ttg caa ttt ggt ctt gag	966
Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu Gln Phe Gly Leu Glu	
215 220 225	
atc aaa ccg agc cag atc atc gca tct gga att gtt gtg ctg ttg gca	1014
Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Leu Leu Ala	
230 235 240 245	
ggt ttg aca ctc gtg caa tct ctg cag gac ggc atc acg ggc gct ccg	1062
Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly Ile Thr Gly Ala Pro	
250 255 260	
gtg aca gca agt gca cga ttt ttc gaa aca ctc ctg ttt acc ggc ggc	1110
Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu Leu Phe Thr Gly Gly	
265 270 275	
att gtt gct ggc gtg ggt ttg ggc att cag ctt tct gaa atc ttg cat	1158
Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu Ser Glu Ile Leu His	
280 285 290	
gtc atg ttg cct gcc atg gag tcc gct gca gca cct aat tat tcg tct	1206
Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala Pro Asn Tyr Ser Ser	
295 300 305	
aca ttc gcc cgc att atc gct ggt ggc gtc acc gca gcg gcc ttc gca	1254
Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Ala Phe Ala	
310 315 320 325	
gtg ggt tgt tac gcg gag tgg tcc tcg gtg att att gcg ggg ctt act	1302
Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile Ile Ala Gly Leu Thr	
330 335 340	
gcg ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt gtt tat tta ggc	1350
Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly	
345 350 355	
ccc gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt	1398
Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly	
360 365 370	

54 174

ggt ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att 1446
 Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile
 375 380 385

gcc ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg 1494
 Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met
 390 395 400 405

tac gcc acc ctg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg 1542
 Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala
 410 415 420

gtt gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt 1590
 Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly
 425 430 435

gag tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac cca tac 1638
 Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr
 440 445 450

cgt gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag 1686
 Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu
 455 460 465

cag aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat cag aga ttc 1734
 Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe
 470 475 480 485

ggt aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtctttcgc ttaaataagcg 1786
 Gly Asn Lys Arg

tagaatatcg ggtcgatcgc ttttaaacac tcaggaggat ccttgccggc caaaatcacg 1846

gacactcgtc ccaccccaga atcccttcac gctgttgaag aggaaaccgc agccggggta 1906

ccg 1909

A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZ: 489 aminosav

(B) TÍPUS: fehérje

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) SZERVEZET: *Corynebacterium glutamicum*

(B) TÖRZS: ATCC13032

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Met	Leu	Ser	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Gly	Arg	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Ala	1	5	10	15
Ala	Lys	Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ile	Asp	Leu	Thr	20	25	30	
Asp	His	Ser	Gln	Val	Ala	Gly	Val	Met	Asn	Leu	Ala	Ala	Arg	Ile	Gly	35	40	45	
Asp	Ile	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Asp	Thr	Lys	Val	Gln	50	55	60	
Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Thr	His	Val	Asp	65	70	75	80
Ile	Thr	Leu	Asn	Thr	Ile	Thr	Ile	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Val	Glu	Arg	85	90	95	
Lys	Met	Pro	Val	Asn	Val	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Leu	Asp	Thr	Asn	100	105	110	
Phe	Ser	Lys	Leu	Ser	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Ile	Arg	Ser	Ile	Gln	Ala	115	120	125	
Gly	Ala	Thr	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Glu	130	135	140	
Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Tyr	Gly	Phe	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Trp	Ala	145	150	155	160
Met	Met	Gly	Gly	Ala	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Gly	Gly	Trp	Gln	Val	165	170	175	
Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	Ile	Thr	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Ala	Thr	Thr	Ser	180	185	190	
Phe	Leu	Gly	Lys	Lys	Gly	Leu	Pro	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Val	Val	Gly	195	200	205	
Gly	Phe	Ile	Ala	Thr	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Tyr	Ser	Leu	Ala	Leu	210	215	220	
Gln	Phe	Gly	Leu	Glu	Ile	Lys	Pro	Ser	Gln	Ile	Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	225	230	235	240
Val	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Thr	Leu	Val	Gln	Ser	Leu	Gln	Asp	Gly	245	250	255	

54 174

Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270
 Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285
 Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300
 Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335
 Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350
 Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365
 Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 370 375 380
 Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 385 390 395 400
 Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415
 Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430
 Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445
 Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 450 455 460
 Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 465 470 475 480
 Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485

Szabadalmi igénypontok

1. Coryneform mikroorganizmusokban replikációra képes, előnyösen *Corynebacterium* eredetű rekombináns DNS, amely legalább egy thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti replikációra képes DNS, amely

(i) az 1. számú vagy 3. számú szekvenciában bemutatott, thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciát, vagy

(ii) legalább egy szekvenciát, amely a genetikai kód degeneráltságán belül megfelel az (i) szekvenciáknak, vagy

(iii) legalább egy szekvenciát, amely az (i) vagy (ii) szekvenciákkal komplementer szekvenciával hibridizál, és/vagy adott esetben

(iv) (i)-ben működés szempontjából semleges szenz mutációkat tartalmaz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti nukleotid-szekvenciákból levezetett fehérje aminosav-szekvenciája, amelyet a 2. számú és 4. számú szekvenciák szemléltetnek.

4. Coryneform baktériumok, különösen a *Corynebacterium* nemzetségből, amelyeket egy vagy több, az 1. vagy 2. igénypont szerinti replikációra képes DNS bevezetésével transzformáltunk.

5. *Corynebacterium glutamicum* DM368-2 pZ1thrE, amelyet a DSM 12840 szám alatt helyeztünk letétbe.

6. Eljárás L-treonin előállítására coryneform baktériumok fermentációjával, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben a thrE gént kódoló nukleotid-szekvenciákat felerősítjük, túlzottan kifejezzük.

54.174

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan baktériumokat alkalmazunk, amelyekben kiegészítésként a treonin bioszintézis utak egy vagy több génjét felerősítjük.

8. A 6. és 7. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy plazmidvektorral transzformált törzset alkalmazunk és a plazmidvektor a thrE gént kódoló nukleotidszekvenciát hordozza.

9. A 6-8. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a thrE gént olyan mikroorganizmusokban fejezzük ki túlzottan, amelyek további metabolit- illetve antimetabolit-rezisztencia mutációval rendelkeznek.

10. A 6-9. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmusokat a túlzott kifejeződés eléréséhez megváltoztatott tápoldatban fermentáljuk és/vagy a fermentáció körülményeit változtatjuk.

11. A 6-10. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyekben a treonin képződést csökkentő anyagcsere útvonalakat legalább részben kikapcsoltuk.

12. A 6-11. igénypontok szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan mikroorganizmusokat alkalmazunk, amelyekben a thrE génen túl a treonin képződés anyagcsere útvonalának többi génjét egyenként vagy együttesen felerősítjük (túlzottan kifejezzük).

13. Eljárás L-treonin előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

a) az előző igénypontok szerinti mikroorganizmusok - amelyekben legalább a thrE gént, adott esetben további génekkel

54.178

kombinálva felerősítjük (túlzottan kifejezzük) - fermentációját;

b) L-treonin felhalmozását a tápoldatban vagy a mikroorganizmusok sejtjeiben; és

c) L-treonin izolálását.

14. Az előző igénypontok közül egy vagy több szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Corynebacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmust alkalmazunk.

15. Eljárás a thrE gén izolálására, azzal jellemezve, hogy indikátor törzsekként olyan thrE génben hibás mutánsokat, előnyösen coryneform baktériumokat nyerünk, amelyek treonin tartalmú oligopeptidet tartalmazó tápközegben nem, vagy csak csekély mértékben szaporodnak és

a) a thrE gént génbank létesítése után azonosítjuk és izoláljuk, vagy

b) transzpozon mutagenézis esetében az előnyösen antibiotikum rezisztenciával rendelkező transzpozonra szelektálunk és így kapjuk meg a thrE gént.

A meghatalmazott:


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

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

41 oldal
 42 oldal

43 oldal

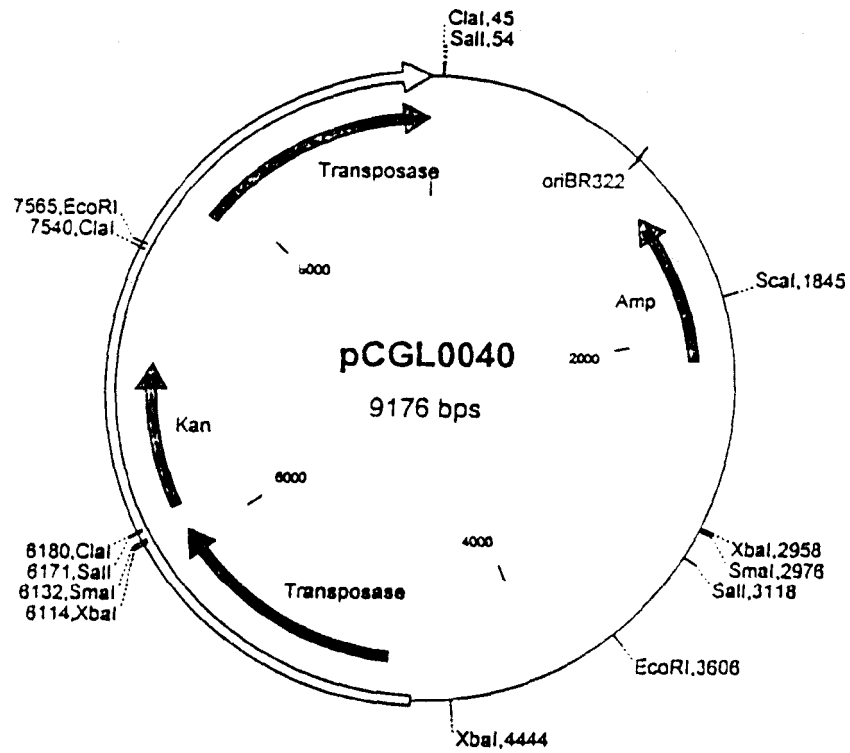
44 oldal

70003445

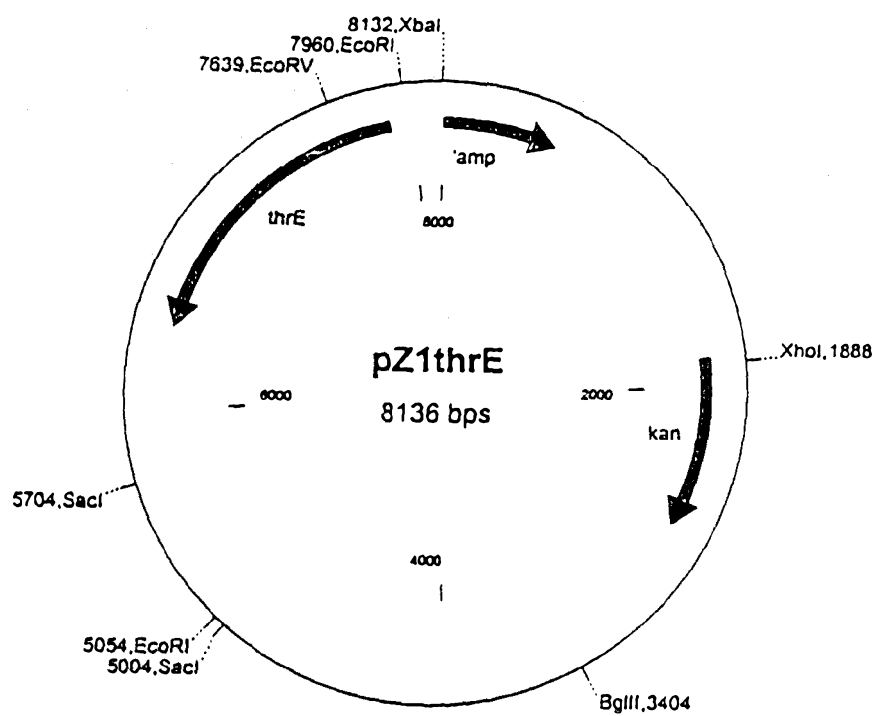
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

04.174

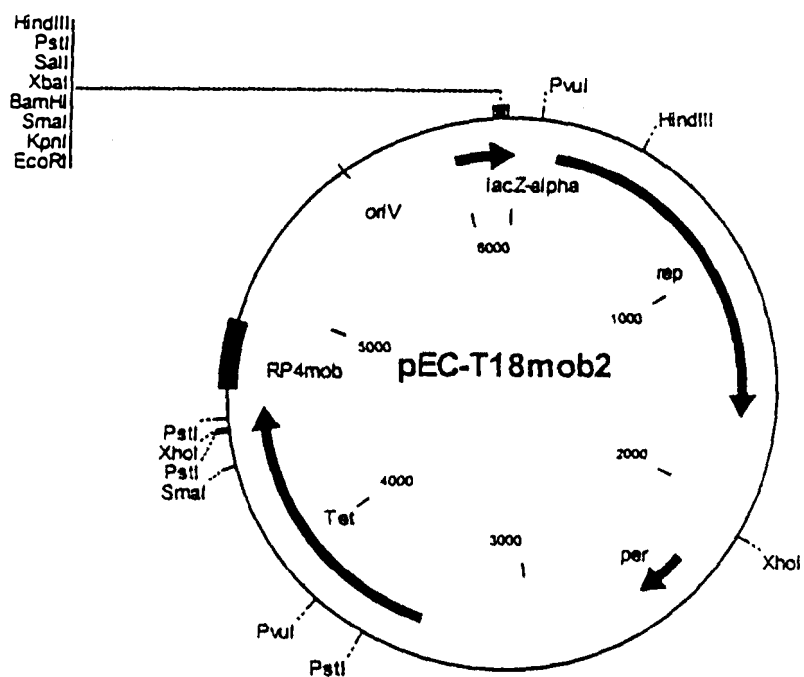
1/4



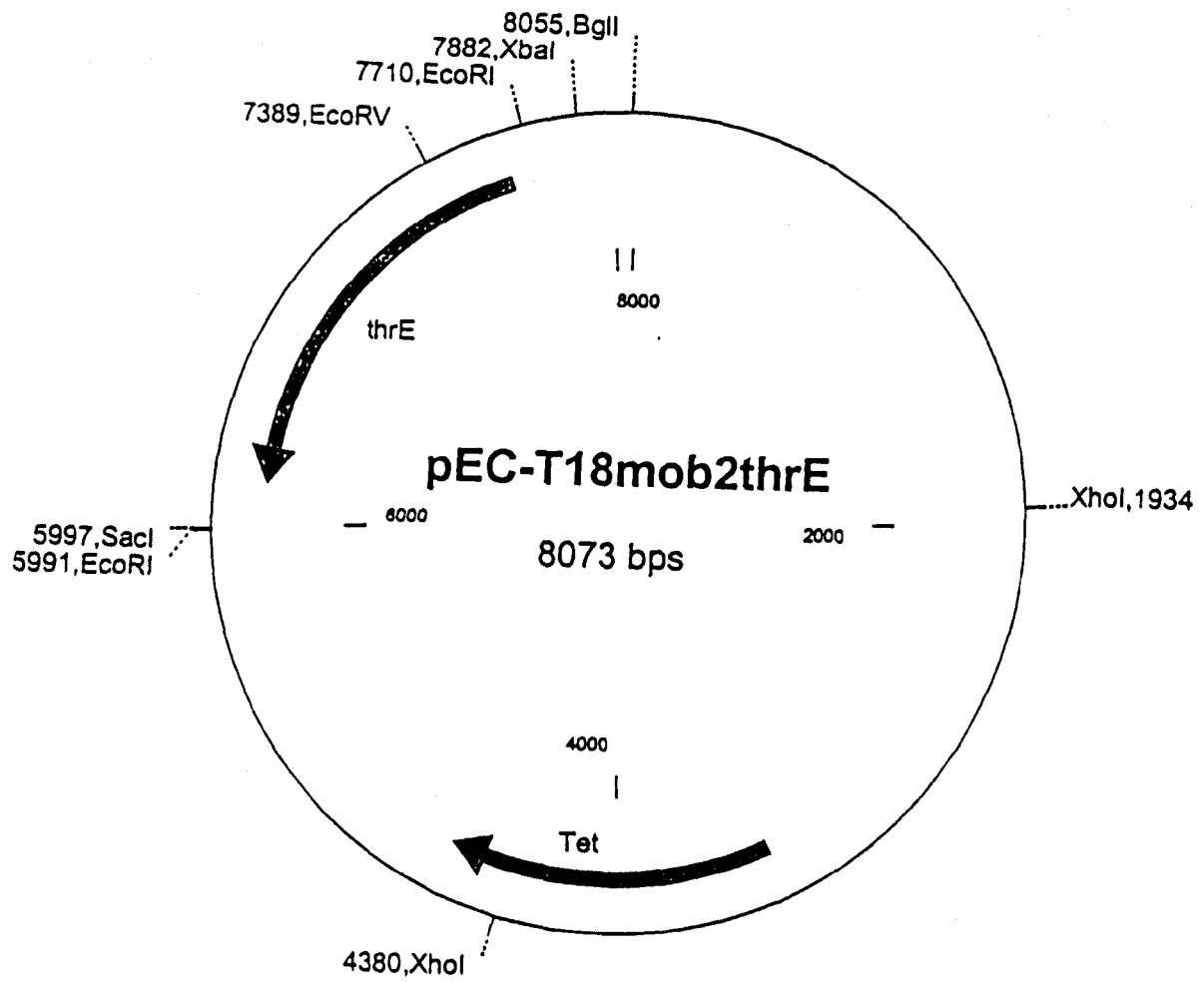
1. ábra



2. ábra



3. ábra



4. ábra