(19) HU

MAGYAR NÉPKÖZTÁRSASÁG

ORSZÁGOS TALÁLMÁNYI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
193516 B

(22) A bejelentés napja: 82.01.15. (21) 114/82
(33) US:
(32) 81.01.15.
(31) 225287
(83) ATCC 31195, ATCC 31196, ATCC 31197
ATCC 31198, ATCC 31199, ATCC 31783
ATCC 31789, ATCC 31788, ATCC 31792
ATCC 31791, ATCC 31790, ATCC 23724
ATCC 31789, ATCC 31786, ATCC 31784

(41) (42) A közzététel napja: 1984.03.28.
(45) Megjelent: 1989.04.16.

(51) Int. Cl4
C 12 N 15/00
C 12 N 9/28

Országos Találmányi Hivatal
Szabadalmi Tár.
TULAJDONA

(72) Feltalálók:
MIELENZ Jonathan, Newberry, MICKEL Susan Morgan, Illinois, US

(73) Szabadalmas:
CPC International Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, US

(54) ELJÁRÁS HŐSTABIL ALFA-AMILÁZ KÓDOLÓ GÉN KLÓNOZÁSÁRA ESCHERICHIA COLI ÉS BACILLUS SUBTILIS TÖRZSEKBE

(57) KIVONAT

A találmány tárgya javított eljárás hőstabil alfa amiláz enzim előállítására. Az alfa amilázt kódoló gént egy kiméra plazmidba építik be, amely sokszorozott kópiákat képez egy gazda mikroorganizmusban.

A találmány hőstabil alfa-amiláz enzimet kódoló génnel rendelkező kiméra plazmidokkal és előállításukkal foglalkozik. A gén klónozása Escherichia coli vagy Bacillus subtilis mikroorganizmusba, és az így keletkezett mikroorganizmusok alkalmazása hőstabil alfa-amiláz termeléséhez szintén a találmány tárgyát képezi.

A találmány háttere.

Nagyipari mennyiségben gyártanak glükóztartalmú szirupot a kukoricakeményítő hidrolízisével. A folyamat első lépését általában a keményítő-víz keverék alfa amilázos kezelésével végzik el a víz forráspontjához közeli hőmérsékleten. Ezen hőmérsékleten a hőstabil alfa-amilázok a leghatásosabbak. Ezért valóban ösztönző feladat alacsony költségű forrást találni ilyen hőstabil enzim előállításához.

A gyártásban használt alfa-amilázokat különböző mikroorganizmusok termelik. Ismeretes, hogy ezek a mikroorganizmusok olyan genetikai anyagot tartalmaznak, amelyek kódolják az enzim termelését ebben az organizmusban. Ez a genetikai anyag dezoxiribo-nukleinsavak formájában van jelen a sejten belül. A dezoxiribo-nukleinsavakat ezután DNS-nek rövidítjük.

Egy baktériumban legtöbb genetikai anyag óriási DNS molekulák formájában, a sejt kromoszómájaként van jelen. A genetikai anyag egy bizonyos mennyisége azonban kisebb, zárt köralakú DNS molekulák formájában is jelen lehet, amelyeket plazmidoknak nevezünk.

A genetikai technikának (genetic engineering) nevezett műveletek segítségével a DNS egy szakaszát lehetséges átvinni egyik organizmusból a másikba. Több kutató kísérletezett azzal, hogy felhasználja ezt a technikát olyan mikroorganizmusok kifejlesztésére, amelyek kiemelkedő alfa-amiláz termelő képességet mutatnak.

Az egyik felhasznált technika az, hogy eltávolítják a teljes (vagyis kromoszómális és plazmid) DNS készletet az amiláz termelőnek ismert mikroorganizmusból. Az ebből a DNS-ből nyert fragmenseket összekapcsolják bakteriofágok DNS-ével. A kombinált DNS-t tartalmazó bakteriofágokkal más mikroorganizmusokat fertőznek meg, így ez a bakteriofág átviszi a genetikai anyagot a megfertőzött mikroorganizmusok kromoszómális DNS-ébe. A megfertőzött mikroorganizmus sejtjei, amelyek aktív amiláz-gént tartalmazó DNS-t fogadtak be, amiláz termelővé válnak. Ezeket a sejteket szelektálják és további alkalmazásokhoz növesztik.

Egy másik, hőstabil alfa-amilázhoz használt genetikai technika abban áll, hogy az ilyen amilázok termelőjeként ismert mikroorganizmusokból kivonják a DNS teljes mennyiségét, majd a DNS bizonyos fragmenseit transzformálják egy új gazda-mikroorganizmusba, amely által ezek a fragmensek beépülnek a gazda-mikroorganizmusok kromoszómájába. Ezután azokat a sejteket, amelyekbe az aktív amilázt kódoló genetikai anyag beépült, szelektálják és növesztik.

Arra jöttünk rá, hogy a hőstabil alfa-amilázt kódoló gén egy természetesen előforduló plazmidban is létezik. Sőt, arra is rájöttünk, hogy az ilyen természetesen előforduló, hőstabil alfa-amilázt kódoló gént tartalmazó genetikai anyag közvetlenül kombinálható egy másik, vektor plazmidnak nevezett plazmiddal. Ez a kombináció egy szintetikus, a továbbiakban kiméra plazmidnak nevezett plazmidot eredményez. Ezt a kiméra plazmidot be lehet iktatni egy új mikroorganizmusba, és ott megsokszorozni.

Ez lehetővé teszi olyan mikroorganizmus kifejlesztését, amely kiemelkedő alfa-amiláz termelőképességgel rendelkezik, és amely könnyen növeszthető ipari méretekben. A jelen találmány az újonnan felfedezett, természetesen előforduló, alfa-amilázt kódoló génekkel rendelkező plazmidokkal, az ezek genetikai anyagát tartalmazó kiméra plazmidok előállításával és az ezeket a plazmidokat tartalmazó mikroorganizmusok kifejlesztésével foglalkozik.

A találmányt röviden a következőképpen foglalhatjuk össze: a jelen találmánnyal kapcsolatban egy hőstabil alfa-amilázt kódoló gént tartalmazó kiméra plazmid készítésének folyamatát mutatjuk be. Ennek első lépése egy természetesen előforduló, hőstabil alfa-amilázt kódoló gént tartalmazó plazmid DNS elhasítása, amely lépés során alfa-amiláz gént kódoló lineáris DNS szekvencia alakul ki. Egy vektort elhasítva egy másik lineáris DNS szekvenciát alakítunk ki. Végül a két lineáris DNS szekvenciát összekapcsoljuk, így kapjuk meg a kiméra plazmidot.

A nyert kiméra plazmid is szerepelhet hőstabil alfa-amilázt kódoló gént tartalmazó donorként. Az új kiméra plazmidot a donor DNS-ének elhasításával és a keletkezett DNS fragmensek hasonlóképpen elhasított vektorral kombinálásával nyerjük.

Végül a jelen találmánnyal kapcsolatban a hőstabil alfa-amiláz nagy teljesítményű készítésének folyamatát mutatjuk be. Legalább egy alfa-amiláz gént tartalmazó kiméra plazmidot vezetünk be egy mikroorganizmusba. A kiméra plazmidot tartalmazó mikroorganizmust megfelelő tápközegben tenyésztjük, majd a tenyésztés során a mikroorganizmus által termelt alfa-amilázt izoláljuk.

Ez a találmány tehát olyan eljárást mutat be, amelynek segítségével egy sejten belül hőstabil alfa-amilázt kódoló gének többszörös másolatát lehet előállítani. Ez az eljárás arra is lehetőséget nyújt, hogy amiláz géneket vigyünk át egy olyan mikroorganizmusba, amely sokkal könnyebben nő, mint a donor mikroorganizmus. Így könnyen érhető el fokozott enzimtermelés.

A találmány részletes leírása.

A pontosabb értelmezés kedvéért megadjuk a különböző szakkifejezések definícióit.

1.) Természetesen előforduló plazmid.

Az itt alkalmazott „természetesen előforduló plazmid" szakkifejezés bármely, természetben

előforduló mikroorganizmusban jelen levő plazmid DNS-re vonatkozik.

2.) Kiméra plazmid

Az ebben a tudományágban általában alkalmazott „kiméra plazmid" szakkifejezés egy rekombináns plazmid DNS-re vonatkozik, amely egy donor mikroorganizmusból és egy megfelelő vektor plazmidból keletkezett, a genetikai technika valamely formájának segítségével.

3.) Hőstabil alfa-amiláz.

Az itt alkalmazott „hőstabil alfa-amiláz" szakkifejezés bármely olyan alfa-amiláz készítményre vonatkozik, amely 90°C-on, pH 6 értéken, kalcium ion jelenlétében 45 percen át tartva megőrzi eredeti aktivitásának legalább 60%-át.

4.) Alfa-amiláz gén.

Alfa-amiláz génnek nevezünk egy olyan DNS darabot, amely a sejten belül termelt alfa-amilázt kódolja, valamint magába foglalja a katalitikusan aktív alfa-amiláz szintézisének szabályozásához szükséges információkat is.

A találmány szerinti kiméra plazmid előállításához olyan természetesen előforduló donor mikroorganizmus DNS-ét alkalmazzuk, amely mikroorganizmus tartalmaz hőstabil alfa-amiláz enzimet kódoló gént.

Megfelelő donor mikroorganizmusok találhatók a termofil baktériumok körében, amelyeket *Bacillus stearothermophilus*-ként (rövidítve *B. stearothermophilus*) és *Thermus flavus*-ként (rövidítve *T. flavus*) osztályoztak. A *Bacillus licheniformis* (rövidítve *B. licheniformis*) törzsek szintén megfelelő donor mikroorganizmusok. A *B. stearothermophilus* törzsek köréből különösen alkalmasak donor-DNS forrásként a következő *B. stearothermophilus* törzsek: ATCC 31 195, 31 196, 31 197, 31 198, 31 199 és 31 783, valamint ezek variánsai és mutánsai, valamint ezek mutánsainak almutánsai.

Arra a felfedezésre jutottunk, hogy hőstabil alfa-amiláz enzimeket kódoló génnel rendelkező plazmidok számtalan mikroorganizmusban jelen vannak. A plazmid DNS különösen alkalmas donor DNS-ként, mivel ultracentrifugálás segítségével könnyen tisztítható. Ezt tehát DNS forrást jelent ahhoz a folyamathoz, amelyben az amiláz géneket nagy mértékben koncentráljuk, nagyobb mennyiségű idegen és nem kívánatos genetikai anyagoktól mentesen.

Bármilyen vektort, amely összeférhető a gazda mikroorganizmussal, fel lehet használni a találmány szerinti kiméra plazmid képzéséhez. Ezek a plazmidok sokkal könnyebben felismerhetők, ha a vektor hordoz egy markert. Különösen hasznos vektorok azok, amelyek antibiotikum-rezisztencia markert hordoznak.

Az *Escherichia coli* (rövidítése *E. coli*) ilyen antibiotikum rezisztenciát hordozó plazmidjai készen rendelkezésre állnak. Alkalmas plazmidok a pBR 322, pBR 325 és pWL 625 plazmidok. A *Bacillus subtilis* (rövidítése *B. subtilis*) plazmidjai, mint pl. a pC 194, amely kloramfenikol rezisztenciát átruházó gént tartalmaznak, szintén használhatók.

Az ilyen vektorok alkalmazásának az az előnye, hogy sokszorozott másolatban léteznek a sejten belül. Ezért ha az alfa-amilázt kódoló gént bevezetjük ezekbe a vektorokba, a gén is sokszorozott másolatban lesz jelen a sejten belül. Ez nagyobb sejtenkénti alfa-amiláz termelést eredményez. Amikor E. coli törzset használunk gazda-organizmusként, további gén-felerősítés is lehetsége. Ezt D. B. Clewel gén-felerősítési módszerével lehet végrehajtani. (J. Bacteriology, *110*, 667-676 (1972)).

A jelen találmány szerinti kiméra plazmidok létrehozásának első lépése a természetesen előforduló, hőstabil alfa-amiláz enzimet kódoló gént tartalmazó DNS elhasítása a megfelelő restrikciós endonukleázt használva. A donor DNS, amelyet az endonukleázzal elhasítunk, előnyösen plazmid DNS. Ezt a plazmidot el lehet hasítani akár a kromoszómális DNS-től történő szeparálás előtt, akár az után. Az endonukleáznak olyannak kell lennie, amely a donor DNS-t elhasítja, míg érintetlenül hagyja azt a gént, amely az alfa-amiláz enzimet kódolja. Erre a célra alkalmas endonukleáznak találtuk a *Hind* III enzimet.

A vektort, amely szállítóeszközként működik, és amelybe az alfa-amilázt kódoló gént beillesztjük, szintén el kell hasítani. Ezeknek a vektoroknak az elhasítására ugyanaz az endonukleáz is alkalmas, amelyet a donor DNS hasításához használunk. A vektort azonban bármilyen endonukleázzal el lehet hasítani, amely lineáris DNS-t alakít ki olyan végekkel, amelyek alkalmasak a donor DNS fragmensek végeivel összekapcsolásra.

Az elhasítást a donor DNS és a vektor keverékén is végre lehet hajtani, de az is lehetséges, hogy a donor DNS-t és a vektort külön-külön hasítjuk el. Minden esetben lineáris DNS szekvenciák keverékét nyerjük. A donor mikroorganizmusból származó lineáris szekvenciák némelyike tartalmazza az alfa-amilázt kódoló gént.

A donor DNS és a vektor elhasításával nyert lineáris DNS szekvenciákat összekeverjük és összekapcsoljuk, így alakítunk ki egy új plazmidot, a kiméra plazmidot. A lineáris DNS szekvenciák összekapcsolását ligáz segítségével hajthatjuk végre, ez a technika jól ismert ezen a szakterületen. Erre a célra szolgáló hagyományos ligáz a kereskedelemben is rendelkezésre álló T_4DNS ligáz.

A találmány szerinti kiméra plazmidokat úgy lehet biológiailag aktívvá tenni, hogy átvisszük ezeket egy megfelelő mikroorganizmus gazdasejtbe. Alkalmas gazdaszervezetek pl az amiláz-negatív *E. coli* törzsek (RR1 és C600), és az amiláz-negatív *B. subtilis* törzsek (ATCC 31 785 és Bacillus Genetic Stock Center 1 A 289). A transzformáció jól ismert módszerekkel hajtható végre. Ezek a módszerek magukba foglalják a plazmid abszorpcióját a megfelelő sejtben, azaz a $CaCl_2$-vel kezelt *E. coli* sejtekben történő protoplaszt fúziót és abszorpciót.

A kívánt plazmidokat tartalmazó sejteket

szelektáljuk, a donor amiláz aktivitása szerint osztályozva. Ha a vektor tartalmaz antibiotikum rezisztencia markert, könnyen el lehet végezni egy előzetes osztályozást is, a sejteket olyan agar lemezre szélesztve, amelynek táptalajában antibiotikum található. Csak a kívánt rezisztenciát tartalmazó sejtek növekednek. Oldható keményítőt adva a lemezhez az amiláz aktivitás határozható meg. Növesztés után a lemezeket híg jódoldattal kezeljük, vagy jódgőzzel hívjuk elő. Csak azok a telepek, amelyek rendelkeznek a megfelelő amiláz aktivitással, mutatnak világos területeket, ahol a keményítő elbomlott és ennek megfelelően nem festődik a jóddal.

Ha a rekombináns plazmidot tartalmazó sejtek az alfa amilázt intracellulárisan termelik, a sejteket lizisnek kell alávetni, hogy az enzim jelenléte kimutatható legyen. Az *E. coli* sejtjei legkényelmesebben T_4 bakteriofággal vagy D-cikloszerinnel lizálhatók.

Azt figyeltük meg, hogy amikor *B. subtilist* használunk a kiméra plazmidhoz gazda organizmusként, a sejt által termelt alfa-amiláz enzim kijut a sejtből a tápközegbe. Ez a felismerés igen fontos az enzim nagyipari termelése szempontjából, mivel a sejt lízisének költséges lépését el lehet kerülni. A *B. subtilis* amiatt is különösen alkalmas gazdaszervezet, mert olyan fajba tartozik, amely könnyen alkalmazható az ipari fermentációkhoz.

A kiméra plazmid, amelyet a gazdasejt képez, könnyen izolálható ismert módszerekkel. Ilyen módszer pl. Clewell és Helinski standard derített lizátum módszere (Biochemistry, *9*, 4428-4440, =1970)). Ezeket CsCl sűrűséggradiens ultracentrifugálással lehet tisztítani.

Az alfa amiláz gént tartalmazó kiméra plazmidot ezeknek a géneknek a donorjaként is használhatjuk. A plazmidokat egy megfelelő restrikciós endonukleázzal elhasítva alfa-amiláz gént tartalmazó lineáris DNS keletkezik. A lineáris DNS-t ezután szacharóz gradiens ultracentrifugálással tisztítjuk. Ez a genetikai anyag kombinálható ezután egy másik vektorral, egy újabb kiméra plazmidot alakítva ki.

A kiméra plazmidot tartalmazó gazdasejt által termelt alfa amiláz megtartja hőstabil tulajdonságait. Ez igaz még abban az esetben is, ha a gazda mikroorganizmus mezofil, és nem termofil. Sőt, a termék is, amely a klónozott mikroorganizmusból származó amiláz segítségével keletkezik keményítőből, azonosnak látszik azzal a termékkel, amelyet a donor mikroorganizmus amilázа termel.

A találmány szerinti eljárást fel lehet használni két vagy több különböző, hőstabil alfa-amilázt kódoló gént tartalmazó plazmid bevitelére is azonos mikroorganizmusba. Pl. *E. coli* RR_1-et módosítani lehet olyan kiméra plazmidok beiktatásával, amelyet egy hőstabil alfa-amiláz génnek pBR 325 és pWC 625 vektorokkal történő kombinálásával nyertünk. A gazda sejt mindkét plazmidot beépíti, replikálja és kifejezésre juttatja.

A következő példák bemutatják jelen találmány néhány alkalmazását. Hacsak másképpen nem jelezzük, minden arány és százalék súlyban értendő.

Minden törzs, amely ATCC számot visel, rendelkezésre áll az American Type Culture Collection-nál, Rockville, Maryland, Egyesült Államok.

1. példa

Alfa-amiláz gént és antibiotikum rezisztencia markert tartalmazó plazmidok készítése.

Alfa-amiláz gént tartalmazó teljes DNS készletet izolálunk *B. stearothermophilus* ATCC 31 783 törzs sejtjeiből, Berns és Thomas általános módszere szerint (J. Molec. Biol. *11*, 476-490 (1965)).

A jelen eljárásban a sejteket tris-(hidroximetil)-amino metán-hidrokloridra 50 mmólos (a továbbiakban Tris-HCl) (pH 8) puffer etilén-diamin-tetraecetsavra 0,6 mmólos (a továbbiakban EDTA) és szacharózra 25 %-os keverékben szuszpendáljuk, a standard konyhasós citrát helyett. 1 órán át 0°C-on lizozimmal (2 mg/ml) kezeljük emésztés előtt.

Az eljárásban felhasznált pBR 322 DNS, a *Hind* III restrikciós enzim és a T_4DNS ligáz a Bethesda Research Laboratories (Bethesda, Maryland, Egyesült Államok) termékei.

7,5 mikrogramm *B. stearothermophilus*ból nyert teljes DNS, 7 egység *Hind* III restrikciós enzim és 10 mikrogramm bovin szérumalbumin 100 mikroliter, NaCl-re 50 mmólos, Tris-HCl-re 6 mmólos (pH 7,5) és $MgCl_2$-re 6 mmólos oldatban képzett keverékét 37°C-on 30 percen át inkubáljuk. 2,2 mikrogramm pBR 322 plazmid DNS-t és 7 egység *Hind* III-t 20 mikroliter fent leírt oldatban 1 órán át 37°C-on emésztünk. A DNS analízise agaróz gélen megmutatja, hogy az emésztés teljessé vált.

Ezután 6,75 mikrogramm emésztett *B. stearothermophilus* DNS-t és 1,8 mikrogramm emésztett pBR 322 DNS-t összekeverünk 0,3 ml, Tris-HCl-re 66 mmólos (pH 7,6), $MgCl_2$-re 6,6 mmólos, ditiotreitolra 10 mmólos és adenozin-trifoszfátra 0,067 mmólos oldatban, és összekapcsoljuk T_4DNS ligáz segítségével. A kapcsolás után a DNS analízise agaróz gélen mutatja ki, hogy a kapcsolás teljes, és kimutatható mennyiségben nincs maradék lineáris pBR 322 DNS.

2. példa

Alfa amiláz gént és antibiotikum rezisztencia markert tartalmazó plazmidok transzformálása *E. coli*-ba.

E. coli RB_1 (amely PRC 399 törzs néven all rendelkezésre a Plasmid Reference Centerben, Stanford University Medical Center,, Stanford, Kalifornia, Egyesült Államok) törzsek tenyészetét a következő összetételű tápközegben növesztjük.

	g/liter
Tripton	10,0
Élesztőkivonat	5,0
Nátriumklorid	5,0
Glükóz	1,0

A tenyészetet egy éjszakán át kémcsőben növesztjük 37°C-on. Ez után 9 rész azonos összetételű tápközeggel hígítjuk, és 37°C-on további 135 percen át inkubáljuk élénk rázás mellett. A sejteket centrifugálással kinyerjük, és hideg, 0,1 mólos NaCl oldattal mossuk. Az így nyert sejteket a transzformációhoz előkészítjük, Cohen és munkatársainak kalciumkloridos módszerével (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *69*, 2110-2114 (1972)).

Az 1. példa szerint készített, összekapcsolt DNS egyik felét transzformáljuk *E. coli* RR_1 sejtbe. A sejteket ugyanolyan táptalajt tartalmazó lemezen tenyésztjük, mint amilyenen az *E. coli* sejtek nőttek, azzal a kivétellel, hogy a táptalaj ampicillint is tartalmaz 50 mikrogramm/ml koncentrációban. Ezáltal csak azok az *E. coli* sejtek jelennek meg, amelyek tartalmazzák az ampicillin rezisztencia génnel rendelkező pBR 322 plazmidot.

A rekombináns DNS-t tartalmazó sejtek számának meghatározása érdekében az ampicillin-rezisztens sejteket ellenőrizzük tetraciklin rezisztenciára. Mivel egy DNS darab beiktatása pBR 322-be a *Hind* III elhasítási helynél általában inaktiválja a plazmid tetraciklin rezisztencia génjét, a tetraciklin érzékenység gyakorisága megadja a sejt populációban jelenlevő rekombináns DNS-t tartalmazó sejtek számát. A transzformáció után $3{,}6 \cdot 10^4$ ampicillin rezisztens sejt és $3{,}0 \cdot 10^4$ tetraciklin rezisztens sejt keletkezik milliliterenként. Tehát a sejtek mint egy 16 %-a érzékeny tetraciklinre, ezek rendelkeznek a rekombináns DNS-t tartalmazó plazmiddal.

3. példa

Alfa-amiláz termelő *E. coli* telepek izolálása.

Az *E. coli* növesztéséhez használt összetételű tápközeget készítjük el, azzal a kivétellel, hogy 15 g/l agart és 50 mikrogramm/ml ampicillint is adunk hozzá. A tápközeget 130 petricsészébe helyezzük el és inokuláljuk a 2. példa szerint előállított transzformált *E. coli* hígított tenyészetével. Átlagban 113 telep keletkezik lemezenként. A telepeket addig hagyjuk nőni, amíg 1-2 mm átmérőjűek lesznek, majd replika módszerrel átvisszük a következő összetételű tápközegre:

	g/liter
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0,5
NH_4Cl	1
Élesztőkivonat	1
Pepton	10
Agar	15
Lintner féle keményítő	10

A növekedés 3 órájában T_4 bakteriofágot amely ATCC 11303-B_4 számon áll rendelkezésre — rétegezünk rá a keményítőtartalmú lemezre. Mintegy $1 \cdot 10^7$ T_4 et alkalmazunk lemezenként, hogy bekövetkezzék a növekvő *E. coli* sejtek lízise, és ilyen módon felszabaduljanak az intracelluláris enzimek. Egy éjszakán át tartó növesztés és lízis után 2,5 %-os Lugol jódoldatot öntünk a lemezekre, hogy kimutassuk az amiláz-aktivitás által termelt világos zónákat.

A jelenlévő mintegy 15 000 telepből 18 telep termel világos zónákat, jelezve az amiláz jelenlétét. Az amiláz aktivitást mutató telepeket replika módszerrel átvisszük egy másik lemezre, és ismét elvégezzük az amiláz aktivitás mérést. Az amiláz aktivitás azonban csak a sejt lízisét elősegítő T_4 hozzáadása után jelentkezik, jelezve, hogy az amiláz intracellulárisan termelődik. Más kísérletekben kimutatható, hogy a D-cikloszerin éppen olyan hatásosan idézi elő a sejtek lízisét, mint a T_4, ha a D-cikloszerint 600 mikrogramm/ml koncentrációban használjuk táptalaj felülrétegezésére.

Az amiláz génnel rendelkező pBR 322 vektort tartalmazó *E. coli* törzs ATCC 31789 számon áll rendelkezésre.

4. példa

Alfa-amiláz gént és antibiotikum rezisztencia markert tartalmazó plazmidok átvitele egy másik *E. coli* törzsbe.

E. coli C 600 törzs (ATCC 23 724) tenyészetét növesztjük, a sejteket kinyerjük, és a 2. példa szerint előkészítjük a transzformációhoz. A 3. példa szerint nyert öt különböző amiláz klónt növesztünk, és a rekombináns plazmidokat Clewell és Helinski standard derített lizátum módszerével (Biochemistry, *9*, 4428-4440 (1970)) vonjuk ki. A részben tisztított plazmid DNS-t Tris HCl-re 10 mmólos, EDTA-ra 1 mmólos keverékben (pH 7,5) szuszpendáljuk, mielőtt átvisszük $CaCl_2$-vel kezelt *E. coli* sejtekbe. A DNS szuszpenziót sterilitási vizsgálatnak is alávetjük, hogy olyan telepek ne zavarják a képet, amelyek esetleg a DNS-el együtt bekerült idegen sejtek amiláz-aktivitását mutatják. A transzformált sejteket ampicillintartalmú táptalajon növesztjük, hogy csak azok a sejtek legyenek képesek nőni, amelyek a plazmidot tartalmazzák. Miután a telepeket amiláz-aktivitásra megvizsgáltuk, 100 %-os korreláció áll fenn a plazmid jelenléte és az amiláz-aktivitás között. Ilyen módon a plazmid DNS-ről ki tudjuk mutatni, hogy képes transzformálódni mindkét *E. coli* törzsbe, amiláz-termelővé téve azokat, vagyis azt tudjuk kimutatni, hogy a jelenség nem a törzstől függ, hanem rekombináns plazmid szükséges hozzá.

Az amiláz génnel rendelkező pBR 322 plazmid vektort tartalmazó *E. coli* törzs az ATCC 31 788 számon áll rendelkezésre.

5. példa

Az alfa-amiláz hőstabilitása.

Négy, a 3. példa szerint előállított amiláz klónt és kontrollként *E. coli* RR_1 tenyészetet növesztünk 15 ml, a 2. példában alkalmazott tápközegben. A sejteket lizáljuk D-cikloszerin hozzáadásával, majd a sejtmaradékot centrifugálással eltávolítjuk. A felülúszóhoz nátriumacetátot és kalciumkloridot adunk 50 mmól, illetve 2,5 mmól koncentráció eléréséig, és a pH t 6,0 ra állítjuk be. Az enzimoldatot csavaros kupakkal ellátott kémcsőbe helyezzük, amelyet

teflon szalaggal is lezárunk. Az oldatot amiláz aktivitásra megvizsgáljuk hőkezelés előtt, majd 90°C on, 45 percen át történő hőkezelés után. Az amiláz aktivitást a keményítő hidrolízisének arányában határozzuk meg, ez az arány a jód-festési kapacitás spektrofotometriásan mérhető csökkenésével mutatható ki B.W. Smith és J.H. Rowe általános módszere szerint (J. Biol. Chem., *179*, 53 (1949)). Az *E. coli* kontroll nem mutatott amiláz aktivitást. *B. stearothermophilus*ból (ATCC 31 783) nyert tisztított amilázt, *B. subtilis*ból nyert Sigma A 6380 amilázt (Sigma Chemical Co. St.Louis, Missisipi, Egyesült Államok) és Termanyl nevű hőstabil alfa-amilázt (Novo Laboratories Inc, Wilton, Connectitut, Egyesült Államok) adunk az *E. coli* kontroll lizátumához, ez szolgál standardként a hőstabilitás méréséhez. (Bár a Sigma Chemical Company katalógusa ezt az enzimet *B. subtilis*ből származó alfa-amilázként nevezi meg, H. Chung és F. Freiberg kimutatták, hogy ez *Bacillus amyloliquefaciens*ből származik (Biochem. J. *185*, 387-395 (1980)). A vizsgálat eredménye az I. Táblázatban látható.

I. Táblázat

Hőstabilitási adatok

A sejt lizátum eredete	Kezdeti aktivitás egység/ml	Aktivitás 45 perces 90°C-on történő hőkezelés után egység/ml	Maradék aktivitás %
E coli RR_1 (kontroll)	0	0	
Kontroll + *B. stearothermophilus* (ATCC 31783) törzsből származó alfa amiláz	0,21	0,15	71,4
Kontroll + Termamyl	0,39	0,34	87,2
Kontroll + *B. subtilis* törzsből származó alfa-amiláz (Sigma A 6380)	0,21	0,01	4,8
Kontroll + 1. Klón	0,45	0,38	84,4
Kontroll + 2. Klón	0,22	0,18	81,8
Kontroll + 3. Klón	0,36	0,29	81,0
Kontroll + 4. Klón	0,42	0,35	83,3

A klónok által termelt amiláz legalább annyira hőstabilnak látszik, mint a *B. stearothermophilus* donortörzs által termelt amiláz. A klónok által termelt amiláz hőstabilitása mintegy azonos a Termamyl nevű kereskedelmi hőstabil alfa amiláz hőstabilitásával, és feltétlenül jobb a *B. subtilis*ből nyert alfa amiláz hőstabilitásánál.

A különböző amilázokkal emésztett keményítők hidrolizátumait vékonyréteg kromatográfiával analizáljuk, hogy azonosítsuk a termelt kis molekulasúlyú cukrokat. Az *E. coli* klónokkal nyert amilázok alkalmazásával képződött kis molekulasúlyú cukrok relatív mennyisége hasonló a kontrollként használt ismert alfa-amilázok alkalmazásával képződött cukrok mennyiségéhez.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a rendkívül termofil törzsekből nyert hőstabil enzim génjei megbízhatóan kifejeződnek a mezofil gazda-baktériumban, hőstabil enzim terméket adva. Arra jöttünk rá tehát, hogy a rendkívül termofil baktérium génjeit kifejezésre lehet juttatni mezofil baktériumokban, rekombináns DNS technikát használva. Sőt, az aktív hőstabil enzim szintézise normál mezofil hőmérsékleten (20°C-40°C) történik.

6. példa

Alfa-amiláz gént tartalmazó, természetesen előforduló plazmid izolálása.

Az 1. példában megadott módon *B. stearothermophilus* ATCC 31 783 sejtjeiből a teljes DNS-t izoláljuk. A plazmid DNS-t a teljes DNS-ből CsCl-etidium bromid ultracentrifugálással választjuk ki R. Radloff, W. Bauer és J. Vinograd módszere szerint (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., *57*, 1514-1621 (1967)). Azt, hogy ez a plazmid tartalmaz-e alfa-amilázt, a következő eljárással mutatjuk ki:

Plazmid DNS-t hasítunk el *Hind* III restrikciós enzimmel az 1. példában leírtak szerint. Klónokat képezünk, ezt a DNS-t *E. coli*ba bejuttatva az 1-3. példák szerint leírt módon. A tetraciklin-rezisztencia fenotípus-analízis szerint a sejtek 3,3 % a tetraciklin-rezisztens, tehát tartalmaz klónozott DNS-t. A sejtek osztályozása alfa-amiláz aktivitásra azt mutatja, hogy 0,42 %, vagyis a klónozott DNS-t tartalmazók közül kb. minden nyolcadik sejt tartalmazott amiláz gént. A *B. stearothermophilus* plazmidokat *Hind* III-al hasítva lineáris DNS darabok keletkeznek, amelyek 8 detektálható csíkká szeparálódnak agaróz gélen történő elektroforézissel. Az amiláz darab klónozásának frekvenciája (1/8) körülbelül megfelel az elvárásnak, ha feltételezzük, hogy a nyolc jellegzetes csíkból egy rendelkezik az amiláz génnel. Sőt, ezeknek a plazmid-csíkoknak az analízise azt mutatja, hogy a csíkok egyike kb. 3,6 Md nél van, vagyis azonos méretű, mint annak a DNS-nek a

klónozott darabja, amelyet az 1 példa plazmidjainak analíziséből nyertünk.

Ez a kísérlet világosan jelzi, hogy legalább egy alfa-amiláz gén helyezkedik el az alkalmazott *B. stearothermophilus* természetesen előforduló plazmidjaiban.

7. példa

Különböző kiméra plazmidokat tartalmazó *E. coli* törzsek készítése és izolálása

A A 3. példa szerint izolált amiláz termelő *E. coli* (ATCC 31 789) törzs tenyészetét egy éjszakán át növesztjük a 2. példában alkalmazott tápközegben. A plazmid DNS-t megsokszorozzuk D.B. Clewell módszere szerint (J. Bacteriology, *110*, 667–676 (1972)), 170 mikrogramm kloramfenikolt használva milliliterenként.

	g/liter
Na_2HPO_4	6,0
KH_2PO_4	3,0
NaCl	0,5
NH_4Cl	1,0
Kazein aminosavak (hidrolizátum)	5,0
Glükóz	2,0
$CaCl_2.2H_2O$	0,015
$MgSO_4.7H_2O$	0,246
B_1 vitamin	0,001

A plazmid DNS-t ezután Clewell és Helinski standard tisztított lizátum módszerével izoláljuk (Biochemistry *9*, 4428–4440 (1970)). Az izolált plazmidot a 6. példa szerinti CsCl etidiumbromid módszerrel, majd izopropanolos extrakcióval, végül Tris-re 10 mmólos, EDTA-ra 1 mmólos (pH 7,5) oldatba történő extenzív dialízissel tisztítjuk.

3,9 Md-vel jellemezhető pBR 325 plazmidot tartalmazó *E. coli* RR_1 (PRC 399) tenyészetét növesztjük és a plazmid DNS-t sokszorozzuk, izoláljuk és tisztítjuk az előző bekezdés szerinti módszerrel.

A két forrásból származó plazmid DNS-t *Hind* III restrikciós enzimmel elhasítjuk. Az elhasított plazmidok oldatait összekeverjük, és 0 C on 18 órán át összekapcsoljuk az 1. példa szerinti általános eljárással.

Az összekapcsolt DNS-t *E. coli* RR_1-be transzformáljuk a 2. példában leírt módszer szerint. A sejteket higítjuk, és 25 mikrogramm/ml koncentrációban kloramfenikolt tartalmazó agar lemezre szélesztjük. Ezzel a módszerrel csak azokat az *E. coli* sejteket nyerjük ki, amelyek tartalmazzák a kloramfenikol rezisztenciával rendelkező pBR 325 plazmidot. A sejtek megjelent telepeit osztályozzuk amiláz aktivitásra a 3. példában leírt módszer szerint, D cikloszerint használva a sejt lízisére.

Három telepből, amely amiláz aktivitást mutat és kloramfenikolra rezisztens, rekombináns plazmid DNS-t vonunk ki a 4. példa szerinti tisztított lizátum módszerrel. A rekombináns plazmidok szétválasztása agaróz gélen azt mutatja, hogy ezek a plazmidok egy pBR 325 plazmid + egy amiláz gént tartalmazó 3,6 Md fragmens kombinációjának megfelelő méretűek. A plazmid *Hind* III enzimmel végzett emésztésével 3,6 Md fragmenst és a pBR 325 lineáris formáját nyerjük. Ez a példa azt mutatja be, hogy az amiláz gént át lehet klónozni egy másik vektorra, pBR 325-re anélkül, hogy elveszítené amiláz-termelő aktivitását. Az így nyert *E. coli* törzs ATCC 31 792 számon áll rendelkezésre.

B. Az *A.* részben kialakított, klóramfenikol és ampicillin rezisztens kiméra plazmidot használjuk, mint olyan DNS fragmens donort, amely tartalmazza az alfa-amiláz gént. Ezt a fragmenst kombináljuk a 10 Md-vel jellemezhető pWL 625 vektor-plazmiddal, az *A* részben leírt általános módszerrel. A pWL 625 plazmidot W. Goebel és munkatársai írták le (Molec. Gen. Genet. *157*, 119–129 (1977)). Ezt az *E. coli* (ATCC 31 787) törzs tenyészetéből izoláljuk ennek a példának az *A* részében alkalmazott plazmid-izolálási módszerrel. Ez a vektor ampicillin és kanamacin antibiotikum rezisztenciát visel. DNS beiktatása pWL 625 be *Hind* III helynél megsemmisíti a kanamicin rezisztenciát.

Az *E. coli* RR1 sejtek, amelyeket rekombináns DNS-el transzformáltunk, növekednek ampicillintartalmú agar lemezeken. Azokat a telepeket, amelyek rezisztensek kloramfenikora a pBR 325 miatt, ugyanakkor amiláz aktivitást mutatnak, szelektáljuk vizsgálat céljából. A plazmid DNS-t izoláljuk a telepekből. Az analízis agaróz gélen *Hind* III-al történő emésztés előtt és után azt mutatja, hogy az amiláz gént tartalmazó DNS fragmenst ráklónoztuk a pWL 625 plazmidra, ilyen módon új plazmidot alakítva ki. Ez a kiméra plazmidot tartalmazó *E. coli* törzs ATCC 31 791 számon áll rendelkezésre.

8. példa

Két különböző kiméra plazmid transzformációja *E. coli* törzsbe.

A 7. példa *B* része szerint készített amiláz termelő *E. coli* törzset növesztjük és előkészítjük transzformációhoz a 2. példa szerinti eljárással. A 7. példa *A* része szerint készített tisztított plazmidot transzformáljuk ezekbe a sejtekbe. Amikor a képződött sejteket kloramfenikolt tartalmazó agar lemezen növesztjük, minden telep mutat amiláz aktivitást. Plazmid DNS-t izolálunk az egyik telepből és agaróz gélen analizáljuk. A 7. példa *A* és *B* részében leírt kiméra plazmid mindegyikét megtaláljuk. Ez a kísérlet azt demonstrálja, hogy az *E. coli* növekedhet és fenntarthat egyidejűleg két különböző, alfa-amiláz gént tartalmazó kiméra plazmidot. (A plazmidok kombinációjának hosszú időtartamú vizsgálatát nem végeztük el.) Ezt a két kiméra plazmidot tartalmazó *E. coli* törzs az ATCC-nél 31 790 számon áll rendelkezésre.

9. példa

Alfa-amiláz gént és antibiotikum rezisztencia markert tartalmazó plazmidok transzformációja *B. subtilis* törzsbe.

A. Donor DNS készítése. A 7. példa *B* része szerint készített kiméra plazmidot használjuk alfa amiláz gént tartalmazó DNS fragmens donorként. Ezt Clewell és Helinski tisztított lizátum

eljárásával vonjuk ki (Biochemistry *9*, 4428-40 (1970)). Ezt a plazmid DNS-t *Hind* III restrikciós enzimmel hasítjuk el. Az emésztett plazmid DNS-t kis mennyiségű etidium bromiddal keverjük össze és szeparáljuk El-Gewely és Helling szacharóz-grádiens módszerével (Anal. Biochem *102*, 423-428 (1980)). Az alfa-amiláz gént tartalmazó 3,6 Md fragmenst extraháljuk kétszer n-butilalkohollal, kicsapjuk azonos térfogatú izopropil-alkohollal és szuszpendáljuk Tris-re 10 mmólos, EDTA-ra 1 mmólos (pH 7,5) keverékben, majd felhasználásig 20°C-on tartjuk

B Vektor készítése. Egy *B. subtilis* törzset — amely a Bacillus Genetic Stock Centerben (Department of Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio Egyesült Államok) 1 E 17 számon áll rendelkezésre, és amely klóramfenikol rezisztenciát átvivő génnel rendelkező, 2,0 Md vel jellemezhető pC 194 plazmidot tartalmaz — tripton-szója agart (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, a továbbiakban Difco) és 50 mikrogramm klóramfenikolt tartalmazó lemezre szélesztünk. A sejteket ezután 1 l-es lombikban levő 150 ml Penassay tápközegbe inokuláljuk, és a sejteket egy éjszakán át növesztjük 37 °C on rázatva. A sejteket ezután elválasztjuk és újra szuszpendáljuk 10 ml protoplaszt készítő pufferban, amely szacharózra 25 % os, NaCl re, 0,1 mólos, Tris HCl-re 0,05 mólos (pH 7,5) és EDTA-ra 0,05 mólos (pH 8,13). 5 mg tojásfehérje lizozimot (Sigma Chemical Company) adunk hozzá és 30 percig 37 °C on tartjuk. Ezután finoman hozzákeverunk 13 ml 2 % os nátrium dodecilszulfátot (NaCl re 0,7 mólos oldatban) majd 2,4 ml 5 mólos NaCl oldatot. A keveréket jeges vízben lehűtjük és 12 100 g vel 20 percen át centrifugáljuk

A DNS t azonos térfogatú izopropilalkohollal kicsapjuk. A szilárd anyagot 60 órán át jeges vízben tartjuk, majd centrifugálással kinyerjük és Tris hidrokloridra 0,01 mólos, EDTA-ra 0,001 mólos oldatban (pH 7,5) szuszpendáljuk. A plazmid DNS t CsCl etidium bromid ultracentrifugálással különítjük el Radloff és munkatársai módszere szerint (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., *57*, 1514 1521 (1967)). A 2 Md-vel jellemezhető plazmidot izopropilalkoholos extrakcióval és Tris-re 10 mmólos EDTA-ra 1 mmólos (pH 7,5) keverékbe történő extenzív dialízissel kezeljük.

C A kiméra plazmid készítése. A 2 Md-vel jellemezhető vektort, amelyet a *B* rész szerint nyerünk, *Hind* III restrikciós enzimmel elhasítjuk és összekeverjük az *A* rész szerint nyert, 3,6 Md-vel jellemezhető DNS fragmenssel. A vektor és a donor DNS koncentrációja 6 mikrogramm/ml, illetve 17 mikrogramm/ml. Az összekapcsolást az 1. példában leírt általános módszerrel végezzük. Mindenféle, 3,6 Md-vel jellemezhető lineáris fragmens távolléte az összekapcsolás után — amely agaróz gél elektroforézissel mutatható ki — jelzi, hogy az összekapcsolás teljes

D A kiméra plazmid transzformációja a *B. subtilis*be. Amiláz gént nem tartalmazó *B. subtilis* ATCC 31 785 törzs tenyészetét egy éjszakán át növesztjük egy tripton-vér agart (Tryptose-Blood Agar Base (Difco)) és 1 % oldható keményítőt tartalmazó lemezen. A lemezre 2 ml, következő összetételű tápközeget helyezünk:

	%
$(NH_4)_2SO_4$	0,2
K_2HPO_4	1,4
KH_2PO_4	0,6
Nátriumcitrát 2 H_2O	0,1
$MgSO_4.7H_2O$	0,12
Glükóz	0,5
Kazein-aminosavak (Casamino Acids (Difco))	0,02
L-triptofán	0,005

Az így nyert sejtszuszpenzió mintegy 0,1 ml-ét 10 ml azonos összetételű tápközegbe juttatjuk, amely 250 ml-es lombikban helyezkedik el, és 37°C-on élénken rázatjuk 4 órán át. Ezután a tenyészet 1 ml-ét 9 ml 37°C-on előmelegített transzformációs tápközegbe helyezzük, és folytatjuk a rázás közbeni inkubálást 90 percen át. A transzformációs tápközeg azonos a növesztő tápközeggel azzal a kivétellel, hogy a kazein-aminosavakból 0,01 %-ot és L-triptofánból 0,0005 %-ot tartalmaz. 0,25 ml sejthez, amely mintegy 1.10^8 sejtet tartalmaz milliliterenként, 5 mikroliter, a *C*. rész szerint nyert, 0,12 mg plazmidot tartalmazó oldatot adunk hozzá. A keveréket enyhén rázzuk 37 °C-on 30 percen át. A keveréket hígítjuk azonos térfogatú Penassay tápközeggel (Difco) és folytatjuk a rázatást 37°C-on további 90 percig. A sejteket 0,1 ml-es alikvotokban tripton-vér agart (Tryptose Blood Agar Base (Difco)), 1 % oldható keményítőt és 20 mikrogramm klóramfenikolt tartalmazó lemezre szélesztjük. Kontrollként egyrészt hozzáadott plazmid nélküli *B. subtilis*, másrészt pC 194 vektorplazmidot tartalmazó *B. subtilis* sejteket szélesztünk azonos tápközegre

A lemezeken nem láthatók azoknak a sejteknek a telepei, amelyek nem tartalmaznak hozzáadott plazmidot. Azokon a lemezeken, amelyekre pC 194 plazmidot tartalmazó sejteket vittünk fel, három kolónia helyezkedik el, de a telepek egyike sem mutat amiláz aktivitást.

Egy telep figyelhető meg azokon a lemezeken, amelyekre a *C*. rész szerint nyert kiméra plazmid DNS-el rendelkező sejteket szélesztettünk. Ez jódgőzös előhívással világos zónát ad, jelezve, hogy ezek a sejtek extra-celluláris amiláz enzimet termelnek. A sejtek láthatóan klóramfenikol jelenlétét igénylik stabilitásukhoz. Ez a tenyészet ATCC 31 786 számon áll rendelkezésre.

Az amilázt tartalmazó telepből származó DNS egy mintáját agaróz gél elektroforézissel különítjük el. 5,6 Md-nél figyelhető meg a plazmid sávja. Ez megfelel a *C*. rész szerint előállított kiméra plazmid méretének.

A tisztított kiméra plazmidot *Hind* III restrikciós enzimmel elhasítjuk és agaróz gél elektro forézisnek vetjük alá. Két fragmenst nyerünk, amelyek 2,0 Md-vel és 3,6 Md-vel jellemezhe-

tők. Ezek megfelelnek az *A.* rész szerint nyert donor DNS, illetve a *B.* rész szerint nyert vektor DNS méretének.

E. A kiméra plazmid transzformációja egy másik *B. subtilis* törzsbe. Az amiláz gént tartalmazó kiméra plazmidot a *D.* rész szerint nyert amiláz termelő telepek sejtjeiből izoláljuk a *B.* részben nyert pC 194 plazmid izolálásához használt módszerrel. Az izolált kiméra plazmidot transzformáljuk egy másik, amiláz negatív *B. subtilis* törzsbe, amely 1 A 289 számon áll rendelkezésre a Bacillus Genetic Stock Centerben (Dept. of. Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio, Amerikai Egyesült Államok). A transzformációt S. Chang és S. N. Cohen protoplaszt-fúziós módszerével végezzük (Molec. Gen. Genet. *118*, 111–115 (1979)). Amikor a sejteket a *D.* rész szerinti lemezeken növesztjük, mintegy 1.10^8 telep/ml látható azokon a lemezeken, amelyek nem tartalmaznak kloramfenikolt. Kb. 1.10^3 telep/ml látható a kloramfenikolt tartalmazó lemezeken. Mindegyik telep mutat amilázaktivitást a keményítő-jód vizsgálat szerint. Ez az amilázt tartalmazó *B. subtilis* ATCC 31 784 számon áll rendelkezésre.

10. példa

A kiméra plazmidot tartalmazó *B. subtilis* által termelt alfa amiláz hőstabilitása.

A 9. példa *E.* része szerint előállított kiméra plazmidot tartalmazó *B. subtilis* törzset (ATCC 31784) 2,8 literes Fernbach palackban 1 liter következő összetételű tápközegben növesztjük

	%
Kukoricakeményítő	9,0
Kukoricalekvár	6,0
Élesztőautolizátum ⊕	0,35
$(NH_4)_2HPO_4$	1,0
KH_2PO_4	0,1
$CaCl_2.2H_2O$	0,06
$MnCl_2.4H_2O$	0,05
Kukoricaolaj	L,0
Termamyl ⊕	(0,05 egység/ml)

⊕Prymex 154, az Amber Laboratories cégnél áll rendelkezésre (Juneau, Wisconsin).

A tápközeget 30 percig autoklávozzuk 121°C-on, amely hőmérséklet a Termomyl aktivitását elpusztítja, majd szobahőmérsékletre hűtjük. Ezután 0,01 mg kloramfenikolt milliliterenként adunk a tápközeghez, majd a sejtekkel inokuláljuk. A tenyészetet centrifugáljuk, és a felülúszó folyadék hígított mintáin végezzük el a hőstabilitási vizsgálatot az 5. példa szerinti általános módszerrel.

Összehasonlításul a *B. stearothermophilus*ból, *B. subtilis*ből nyert amilázok, valamint a Termamyl hőstabilitását is megmértük, nátriumacetára 50 mmólos és $CaCl_2$-re 2,5 mmólos inkubációs tápközegben. (Ezek az összehasonlító amilázok az 5. példában is.) Ennek a vizsgálatnak az eredménye a II. Táblázatban látható.

II. TÁBLÁZAT

Enzim minta	Kezdeti aktivitás egység/ml	Aktivitás 45 perces, 90°C-os hőkezelés után, Egység/ml	Maradék aktivitás %
B stearothermophilus	1,81	1.16	64
B subtilis	1,34	0	0
Termamyl	1,26	0,79	63
ATCC 31 784 ből származó enzim	1,58	1,07	68

Ebben a vizsgálatban a *B. subtilis* ATCC 31 784 klón által termelt amiláz láthatóan legalább olyan hőstabil, mint a *B. stearothermophilus* donor által termelt enzim. Hőstabilitásra vetekszik a Termamyl kereskedelmi hőstabil alfa-amiláz hőstabilitásával, és hőstabilitása szemmel láthatóan kiválóbb, mint a *B. subtilis* alfa-amilázé.

Az eddig leírtakból nyilvánvaló, hogy a találmány kapcsán olyan eljárást mutatunk be hőstabil alfa-amiláz enzimet kódoló gént tartalmazó kiméra plazmidok létrehozására és alkalmazásukkal hőstabil alfa-amiláz készítésére, amely teljesen megfelel a fent említett tárgynak, és amely teljesíti a fenti célt és előnyöket. Bár a jelen szabadalmi leírás csak bizonyos meghatározott kiviteli formákat ír le, nyilvánvaló, hogy alternatívák, módosítások és variációk kidolgozása nyilvánvaló az ezen a területen jártas szakemberek számára a jelen szabadalmi leírás alapján. Ezért a jelen szabadalmi leírás szerinti minden ilyen alternatíva, módosítás és variáció az ezt követő igénypontok oltalmi körébe tartozik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hőstabil alfa amiláz kódoló génnel rendelkező kiméra plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) a) Bacillus stearothermophilus mikroorganizmusban természetes formában előforduló, hőstabil alfa-amiláz kódoló gént tartalmazó plazmidot *Hind* III restrikciós enzimmel hasítunk, vagy

b) Bacillus stearothermophilus hőstabil alfa-amiláz kódoló génjét tartalmazó kiméra plazmidot *Hind* III restrikciós enzimmel hasítunk

alfa-amiláz kódoló gént tartalmazó lineáris DNS szekvenciát nyerve,

(ii) pBR322, pBR325, pWL625 vagy pC194 plazmidot *Hind* III restrikciós enzimmel hasítunk egy második lineáris DNS szekvenciát nyerve,

(iii) és az (i) és (ii) lépésben kapott lineáris DNS szekvenciákat T_4 DNS-ligáz segítségével összekapcsoljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hőstabil alfa-amiláz kódoló gént tartalmazó plazmidot ATCC 31783 letéti számú Bacillus stearothermophilus törzsből vagy annak valamely variánsából vagy mutánsából vagy mutánsának almutánsából nyerjük.

3. Eljárás Bacillus stearothermophilus hőstabil alfa-amiláz enzimjét termelni képes Escherichia coli vagy Bacillus subtilis mikroorganizmus előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított kiméra plazmidot valamely — adott esetben már másik alfa-amiláz kódoló génnel rendelkező kiméra plazmidot tartalmazó — Escherichia coli vagy Bacillus subtilis törzsbe transzformálunk, és a transzformálásokat izoláljuk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás ATCC 31788, illetve ATCC 31789 letéti számú Escherichia coli törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy pBR322 plazmidból indulunk ki, és Escherichia coli C600, illetve Escherichia coli RR1 törzset transzformálunk.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás ATCC 31791, illetve ATCC 31792 letéti számú Escherichia coli törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy pWL625, illetve pBR325 plazmidból indulunk ki és Escherichia coli RR1 törzset transzformálunk.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás ATCC 31790 letéti számú Escherichia coli törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 5. igénypont szerinti eljárással előállított ATCC 31791 letéti számú Escherichia coli törzsből plazmidot izolálunk, és az izolált kiméra plazmidot az 5. igénypont szerinti eljárással előállított, ATCC 31792 letéti számú Escherichia coli törzsbe transzformáljuk.

7. A 3. igénypont szerinti eljárás ATCC 31786 letéti számú Bacillus subtilis előállítására, *azzal jellemezve*, hogy pC194 plazmidból indulunk ki és ATCC 31785 letéti számú Bacillus subtilis törzset transzformálunk.

8. A 3. igénypont szerinti eljárás ATCC 31784 letéti számú Bacillus subtilis előállítására, *azzal jellemezve*, hogy pC194 plazmidból indulunk ki és Bacillus subtilis 1A289 törzset transzformálunk.

9. Eljárás hőstabil alfa-amiláz előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított kiméra plazmidot tartalmazó, a 3. igénypont szerinti eljárással előállított Escherichia coli vagy Bacillus subtilis mikroorganizmust alkalmas tápközegen tenyésztünk, és a termelt alfa-amilázt izoláljuk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ATCC 31788, ATCC 31789, ATCC 31790, ATCC 31791 vagy ATCC 31792 letéti számú Escherichia coli törzset vagy ATCC 31784 vagy ATCC 31786 letéti számú Bacillus subtilis törzset tenyésztünk.

Rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 2708. Nyomdaipari vállalat, Uzsgorod