

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2009-277

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/64	(2006.01)
C07H 15/16	(2006.01)
C12R 1/565	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)
C12N 15/31	(2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.05.2009**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.11.2010**
(Věstník č. 46/2010)

(71) Přihlašovatel:

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:

Ulanova Dana Mgr., Praha 7, CZ

Novotná Jitka Ph.D., Praha 4, CZ

Smutná Yvona Mgr., Jevany, CZ

Kameník Zdeněk Mgr., Kunštát, CZ

Gažák Radek Ing. Ph.D., Vlkavčice, CZ

Janata Jiří Ing. CSc., Psáry, CZ

Kopecký Jan Ing., Praha 1, CZ

Spížek Jaroslav Prof. RNDr. DrSc., Praha 7, CZ

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v. v. i.; Patentové
a licenční služby, Národní 1009/3, Praha 4, 14000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob biotechnologické přípravy derivátů
linkomycinu**

(57) Anotace:

Způsob přípravy derivátů linkomycinu biotechnologickou
kultivací kmene *Streptomyces lincolnsensis* ATCC 25466,
který má inaktivovaný alespoň jeden gen z lmb shluku
kódujícího biosyntézu 4-L-propylprolinu. Do kultivačního
média je dodávána náhrada za složku, jejíž syntéza je
inaktivací zablokována. Biosyntézou tak vznikají nové,
biologicky účinné deriváty linkomycinu.

Způsob biotechnologické přípravy derivátů linkomycinu a jeho použití

Oblast techniky

Vynález se týká využití mutantních kmenů producentů linkomycinu defektních v biosyntéze linkomycinu k výrobě hybridních látek na bázi linkosamidových antibiotik.

Dosavadní stav techniky

V poslední době vzhledem k vysokému počtu patogenních mikroorganismů, rezistentních ke známým antimikrobiálním látkám narůstá zájem o výzkum a vývoj nových, účinných antibiotik. Jednou z možností vedoucí ke vzniku mnoha potenciálně účinných látek je kombinatorní biosyntéza. Tímto způsobem lze pomocí genetické úpravy již známých genů, kódujících biosyntézu účinných látek nebo celých shluků genů získat mikroorganismus, produkující sloučeniny s novou strukturou a novými vlastnostmi. Jednou z takových to biologicky účinných látek je linkomycin a jeho deriváty. Linkomycin je metabolit produkovaný různými druhy aktinomycet včetně kmenu *Streptomyces lincolnensis* a je využíván k léčbě infekcí způsobených grampozitivními patogeny. Klindamycin je nejznámějším semisyntetickým derivátem linkomycinu a jeho antimikrobiální spektrum je rozšířeno o grampozitivní anaerobní bakterie a původce malárie *Plasmodium falciparum*. Ostatní deriváty linkomycinu byly připraveny převážně chemicky. Zároveň byly prováděny obohacovací pokusy kmenu *S.lincolnensis* na principu přidávání různých prekurzorů do kultivačního media vedoucí ke vzniku nových látek na bázi linkomycinu. Nové látky byly testovány *in vitro* a *in vivo* vůči různým patogenním mikroorganismům.

V biosyntéze linkomycinu dochází k oddělené syntéze dvou prekurzorů 4-L-propylprolinu (dále PPL) a methylthiolinkosamidu (MTL), které jsou kondenzací spojeny na N-demethyllinkomycin (NDL) a ten je dále methylován na výsledný linkomycin.

V roce 1995 byla publikována sekvence shluku genů kódujících proteiny pro biosyntézu linkomycinu v nadprodukčním kmenu – *lmb* shluk. Tento shluk obsahuje geny pro biosyntézu obou prekurzorů, geny pro kondenzační reakci, regulační geny a geny pro rezistenci k antibiotiku. Nedávno byla publikována sekvence linkomycinového shluku pro typový kmen *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466.

Ke dnešnímu dni byla experimentálně prokázána a publikována pouze funkce proteinů LmbB1 a B2 zodpovědných za první kroky biosyntézy PPL části molekuly. Funkce ostatních

genů jsou buď neznámé, nebo byly navrženy na základě homologií s jinými geny z databáze BLAST.

Podstata vynálezu

Pro přípravu nových látek na bázi linkosamidových antibiotik lze využít soubor kmenů producentů linkomycinu defektních v jednom či více krocích v biosyntéze.

Pro tyto účely byly provedeny v typovém kmenu *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 mutace určitých genů pro biosyntézu linkomycinu. Byl vytvořen soubor kmenů *S.lincolnensis* defektních v biosyntéze PPL (geny *lmbA*, *B1*, *B2*, *W*, *X*, *Y*) a závěrečné methylaci (gen *lmbJ*).

Takto připravené kmeny jsou určeny k dalšímu testování na produkci nových látek a to i v závislosti na zvolených kultivačních podmínkách. Podle toho co kóduje konkrétní gen, který byl přípravou kmene zablokován, je do kultivačního média potřeba přidávat komponenty, které jsou schopny toto nahradit, což jsou deriváty linkomycinových prekurzorů, biosyntéza tak není zablokována a probíhá za vzniku naprosto nových látek, biologicky aktivních derivátů linkomycinu.

V těchto kmenech je biosyntéza linkomycinu kódována *lmb* shlukem, který obsahuje geny *lmbA*, *B1*, *B2*, *W*, *X*, *Y* kódující proteiny pro tvorbu prekurzoru 4-L-propylprolinu a gen *lmbJ*, kódující závěrečnou methylaci N-demethyllinkomycinu. Zablokováním tvorby 4-L-propylprolinu lze do kultivačního média přidávat jiný derivát prolinu, který bude mikroorganismus schopen v biosyntéze využít a 4-L-propylprolin jím nahradit. Tímto způsobem lze připravit celou řadu nových derivátů linkomycinu aniž by se musely připravovat synteticky.

Přehled obrázků

Obr.1: Primery pro syntézu inaktivačních kazet

Obr.2: Chromatogram analýzy UPLC, detekovány jsou piky butyllinkomycinu a pentyllinkomycinu

Obr. 3: Struktura linkomycinu

Obr. 4: Seznam použitých kmenů E.coli včetně obsaženého plasmidu a antibiotika přítomného v jeho kultivačním médiu případně potřebná kultivační teplota

Obr. 5: Seznam použitých antibiotik včetně jejich používané zkratky a koncentrace

v kultivačních médiích

Obr.6: Seznam použitých médií včetně jejich složení

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Pro získání kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 defektního v biosyntéze linkomycinu byla provedena inaktivace jednoho z genu účastnícího se syntézy propylprolinu za použití kitu pro cílenou mutagenezi streptomycet (REDIRECT PCR targeting system, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(4), 1541-1546. 2003).

Kosmid LK6, který je uchováván v *E. coli* BW25113/pIJ790, pochází ze *Streptomyces lincolnensis* a nese celý *lmb* shluk. V tomto kmeni byl gen *lmbX* nahrazen inaktivační kazetou *aac(3)IV/oriT* kódující rezistenci k apramycinu. Tato inaktivační kazeta byla vytvořena PCR reakcí s pomocí primeru Xf a Xr obsahujících homologní úseky okolí genu *lmbX*. Jako templát byl použit 1383 pb fragment vzniklý štěpením plazmidu pIJ773 restrikcí enzymy EcoRI a HindIII. Kmen *E. coli* BW25113 obsahující kosmid LK6 a plazmid pIJ790 s geny potřebnými pro rekombinaci byl elektroporačně transformován inaktivační kazetou a selektován na rezistenci k apramycinu (50 mg/L), kanamycinu (50 mg/L) a karbamycinu (100 mg/L) na LB médiu. Kazeta byla rekombinačně integrována do kosmidu LK6 výměnou za gen *lmbX*.

Takto připravený kosmid byl konjugálně vnesen do kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466 podle protokolu Kieser T., Bibb M.J., Bittner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. : Practical *Streptomyces* genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, England. (2000)

Transformace *S. lincolnensis* plasmidovou DNA mezidruhovou konjugací s *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* ET12567/pUZ8002 byly elektroporací transformovány kosmidem pLK6 s inaktivační kazetou a selektovány na LB médiu s apramycinem (50 µg/ml) a karbenicilinem (100 µg/ml). Jedna z kolonií byla zaočkována do 10 ml LB média obsahujícího apramycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml) a kultivována přes noc. 100 µl přes noc narostlé kultury bylo přeočkováno do 10 ml čerstvého LB média obsahujícího apramycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml) a inkubováno na třepačce do dosažení OD₆₀₀ = 0,4 (cca 4 h). Antibiotika byla z kultury odstraněna dvojnásobným promytím buněk 10 ml LB média centrifugací (1000 g, 10 min,

20°C) a buňky byly poté resuspendovány v 1 ml LB média.

K 10 µl sporové suspenze *Streptomyces lincolnensis* (10^8 cfu) bylo přidáno 500 µl $2 \times$ YT média a spory byly podrobeny tepelnému šoku v 50°C po dobu 10 min a ochlazeny na laboratorní teplotu.

0,5 ml suspenze buněk *E. coli* ET12567/pUZ8002 bylo smícháno s 0,5 ml sporové suspenze *Streptomyces lincolnensis* a centrifugováno (10 000 g, 5 s, 20°C). Sediment byl resuspendován v 50 µl reziduálního média. Ze suspenze byla připravena ředící řada od 10^{-1} do 10^{-4} (suspenze byla ředěna sterilní destilovanou H_2O). 100 µl každého ředění bylo vyseto na MS agar s 10 mmol/l $MgCl_2$ bez selekce a inkubováno ve 30°C. Po 16 – 20 h byla každá miska o průměru 8 cm rovnoměrně přelita 1 ml sterilní destilované H_2O obsahující 0,5 mg kyseliny nalidixové a 1,25 mg apramycinu a dále inkubována při 30°C 3 – 5 dnů.

Klony *S. lincolnensis* obsahující inaktivační kazetu ve své DNA byly selektovány na rezistenci k apramycinu (50 mg/L) nejdříve na MS agaru, pak na DNA agaru.

Pro eliminaci vlivu inaktivační kazety na transkripci genů ve stejné transkripční jednotce bylo v kmenu *E. coli* DH5α provedeno v kosmidu LK6 vyštěpení kazety pomocí FLP rekombinázy, kódované genem neseným na plazmidu pBT340. FLP rekombináza odstranila centrální část inaktivační kazety a na jejím místě zanechala 81 pb dlouhý úsek DNA – „jizvu“ (teplota nutná pro indukci exprese rekombinázy je 42°C, buňky *E. coli* DH5α s plazmidem BT340 a kosmidem LK6 byly proto pěstovány při této teplotě).

Mutovaný kosmid s jizvou byl pak vnesen transformací protoplastů podle protokolu Jandová Z., Tichý P.: Transformation of *Streptomyces lincolnensis* protoplasts with plasmid vectors, in Folia Microbiol (Praha), 37(3), 181-7. (1992) do buněk streptomycetového kmene, které měly již funkční gen *lmbX* nahrazen za inaktivační kazetu.

Příprava protoplastů *S. lincolnensis*

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 50 ml YEME média s 10 % sacharózou a 5 mmol/l $MgCl_2$ sporama kmene *Streptomyces lincolnensis* s inaktivační kazetou ze šikmého agaru a inkubací na třepačce při 30°C po dobu 24 h. Poté byl 1 ml inokula přeočkován do čerstvého YEME média s 10 % sacharózou, 5 mmol/l $MgCl_2$ a 0,5 % glycinem a kultura byla inkubována na třepačce při 28°C po dobu 16-17 hod. Buňky byly sklizeny centrifugací (10 min, 12°C, 6000 g), dvakrát promyty 15 ml P pufru za týchž podmínek a resuspendovány v 10 ml P pufru s lyozymem (2 mg/ml). Suspenze buněk byla inkubována při 30°C s občasným promícháním. Tvorba protoplastů byla sledována mikroskopicky. Zbytky mycelia byly odstraněny centrifugací (10 min, 20°C, 1 000 g). Protoplasty byly přefiltrovány přes

sterilní vatový filtr, centrifugovány (10 min, 20°C, 3000 g) a dvakrát promyty P pufrem za týchž podmínek. Nakonec byly sedimentované protoplasty resuspendovány ve 200 μ l P pufru a ihned použity pro transformaci.

Transformace protoplastů *S. lincolnensis*

500 ng v objemu 5 μ l plazmidové DNA mutovaného kosmidu s jizvou bylo smícháno s 5 μ l 50 % sacharózy a ke směsi bylo přidáno 100 μ l suspenze protoplastů. Po promíchání bylo k suspenzi přidáno 200 μ l T pufru, suspenze protoplastů byla opět promíchána a ihned vyseta na R2YE agar. Po 16 hodinách inkubace při 30°C byly obě misky přelity 2 ml vodného roztoku kanamycinu o koncentraci 200 μ g/ml R2YE agaru a inkubována při 30°C po dalších 7-10 dnů.

Homologní rekombinací se inaktivační kazeta vyměnila za jizvu. Dvojitě rekombinanty získaného kmene *Streptomyces lincolnensis* Δ *lmbX* byly selektovány na ztrátu apramycinové rezistence.

Buňky *E. coli* byly kultivovány v tekutých nebo na pevných médiích (LB, SOC) při 37°C. Kmen BW25113/LK6/pIJ790 byl kultivován při 30°C. Po transformaci kazetou daný kmen byl pěstován při 37°C. Kmen DH5 α obsahující plazmid pBT340 byl pěstován při 30°C. Tekuté kultury byly inkubovány na rotační třepačce při 200 RPM.

Buňky *Streptomyces lincolnensis* byly kultivovány v tekutých nebo na pevných médiích (R2YE, MS, DNA, YT) při 28–30°C. Tekuté kultury byly inkubovány na rotační třepačce při 230 RPM a byly zakládány v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml, které byly opatřeny vlisy pro zabránění tvorby shluků mycelia. Pro selekci buněk nesoucích vektor byla do kultivačních médií přidána odpovídající antibiotika.

Příklad 2

Kmen *Streptomyces lincolnensis* Δ *lmbX* defektní v biosyntéze PPL byl v koncentraci 10^8 spor naočkován do 50 ml inokulačního média YEME a kultivován 30 hod při 28°C. Poté bylo do 20 ml produkčního média AVM s přísadkou 4-L-butyl prolinu (100 mg/l) naočkováno 5 % inokulační kultury. Kultivace trvala 120 hod při 28°C. Po jejím ukončení byla kultivační kapalina od narostlé kultury oddělena centrifugací a získaný supernatant byl použit na analýzu pro stanovení produkovaného derivátu linkomycinu – butyllinkomycinu.

Příklad 3

Kmen *Streptomyces lincolnensis* ΔmbX defektní v biosyntéze PPL byl v koncentraci 10^8 spor naočkován do 50 ml inokulačního média YEME a kultivován 30 hod při 28°C. Poté bylo do 20 ml produkčního média AVM s přídatkem 4-L-pentyl prolinu (100 mg/l) naočkováno 5 % inokulační kultury. Kultivace trvala 120 hod při 28°C. Po jejím ukončení byla kultivační kapalina od narostlé kultury oddělena centrifugací a získaný supernatant byl použit na analýzu pro stanovení produkovaného derivátu linkomycinu – pentyllinkomycinu.

Příklad 4

Pro analýzu butyllinkomycinu (dále BuLIN) byl použit Acquity UPLC systém (Waters, Milford, Massachusetts) s 2996 PDA detektorem nastaveným na 194 nm. Výsledky byly zpracovány pomocí počítačového programu Empower 2 (Waters). Supernatant kultivačního média byl přečištěn pomocí SPE Oasis HLB 3cc extrakčních kolonek. Vzorek (4 ml) byl nanesen na kolonku předem kondicionovanou a ekvilibrovanou methanolem (3 ml) a vodou (3 ml). Část matrice vzorku byla vymyta vodou (3 ml) a 10% methanolem (v/v, 1 ml). Frakce obsahující deriváty linkomycinu byly vymyty 80% methanolem (v/v, 1ml), odpařeny do sucha a znovu rozpuštěny ve 200 μ l methanolu. Vzorky byly analyzovány na chromatografické koloně BEH C18 column (50 x 2.1 mm, průměr částic 1.7 μ m, Waters); mobilní fáze byla složena ze složky A, 1 mmol/l mravenčan amonný (pH 9,0), a složky B, acetonitril; izokratická eluce (24 % B); průtoková rychlost: 0,4 ml min⁻¹, teplota kolony: 35°C, rychlost sběru dat: 20 pts s⁻¹, dávkovaný objem: 5 μ l, čas analýzy: 3,5 min. Po každé analýze následoval výplach kolony (100% acetonitrem, 1 min) a její ekvibrace (1,5 min). Eluent za kolonou obsahující BuLIN (retenční čas 5,05 min) byl odebrán, vysušen do sucha a použit pro MS analýzu, která přítomnost butyllinkomycinu ve vzorku potvrdila.

Příklad 5

Pro analýzu pentyllinkomycinu (dále PeLIN) byl použit Acquity UPLC systém (Waters, Milford, Massachusetts) s 2996 PDA detektorem nastaveným na 194 nm. Výsledky byly zpracovány pomocí počítačového programu Empower 2 (Waters). Supernatant kultivačního média byl přečištěn pomocí SPE Oasis HLB 3cc extrakčních kolonek. Vzorek (4 ml) byl nanesen na kolonku předem kondicionovanou a ekvilibrovanou methanolem (3 ml) a vodou (3 ml). Část matrice vzorku byla vymyta vodou (3 ml) a 10% methanolem (v/v, 1 ml). Frakce obsahující deriváty linkomycinu byly vymyty 80% methanolem (v/v, 1ml), odpařeny do sucha

a znovu rozpuštěny ve 200 μ l methanolu. Vzorky byly analyzovány na chromatografické koloně BEH C18 column (50 x 2.1 mm, průměr částic 1.7 μ m, Waters); mobilní fáze byla složena ze složky A, 1 mmol/l mravenčan amonný (pH 9,0), a složky B, acetonitril; lineární gradientová eluce min/% B: 0/5, 10/52,5; průtoková rychlost: 0,4 ml min⁻¹, teplota kolony: 35°C, rychlost sběru dat: 20 pts s⁻¹, dávkovaný objem. 5 μ l, čas analýzy: 3,5 min. Po každé analýze následoval výplach kolony (100% acetonitrem, 1 min) a její ekvilibrace (1,5 min). Eluent za kolonou obsahující PeLIN (retenční čas 7,10 min) byl odebrán, vysušen do sucha a použit pro MS analýzu, která přítomnost pentyllinkomycinu ve vzorku potvrdila.

Příklad 6

Pro získání kmene *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 defektního v biosyntéze propylprolinu a v závěrečné methylaci N-demetyllinkomycinu byla současně provedena inaktivace genů *lmbX* a *lmbJ* za použití kitu pro cílenou mutagenezi streptomycet (REDIRECT PCR targeting system, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(4), 1541-1546. 2003). V kosmidu LK6 nesoucím celý *lmb* shluk byl gen *lmbX* nahrazen inaktivační kazetou *aac(3)IV/oriT* kódující rezistenci k apramycinu (50 mg/L). Tato inaktivační kazeta byla vytvořena PCR reakcí s pomocí primeru Xf a Xr (tab. 2.) obsahujících homologní úseky okolí genu *lmbX*. Jako templát byl použit 1383 pb fragment vzniklý štěpením plazmidu pIJ773 restrikcí enzymy EcoRI a HindIII. Další gen *lmbJ* byl nahrazen ve stejném kosmidu kazetou *vph*, kódující rezistenci k viomycinu (30 mg/L). Tato inaktivační kazeta byla vytvořena PCR reakcí s pomocí primeru Jf a Jr obsahujících homologní úseky okolí genu *lmbJ*. Jako templát byl použit 1622 pb fragment vzniklý štěpením plazmidu pIJ781 restrikcí enzymy EcoRI a HindIII. Kmen *E. coli* BW25113 obsahující kosmid LK6 a plazmid pIJ790 s geny potřebnými pro rekombinaci byl postupně transformován inaktivačními kazetami. Kazety byly rekombinačně integrovány do kosmidu LK6 výměnou za geny *lmbX* a *lmbJ*. Takto připravený kosmid byl konjugačně vnesen do kmene *S. lincolnensis* ATCC 25466. Klony *S. lincolnensis* obsahující kazety byly selektovány na rezistenci k apramycinu a viomycinu. Pro eliminaci vlivu inaktivačních kazet na transkripci genů ve stejné transkripční jednotce bylo provedeno vyštěpení kazet pomocí FLP rekombinázy, kódované genem neseným na plazmidu pBT340. FLP rekombináza odstranila centrální části inaktivačních kazet a zanechala 81 pb dlouhé úseky DNA – „jizvy“. Mutovaný kosmid s jizvami byl pak vnesen do buněk streptomycetového kmene, který měl již geny *lmbX* a *J* nahrazeny za inaktivační kazety. Homologní rekombinací se inaktivační kazety vyměnily za

jizvy. Kultivační, selekční a transformační podmínky byly shodné s podmínkami uvedenými v příkladu 1.

Průmyslová využitelnost

Nově připravené deriváty linkomycinových antibiotik jsou využitelné pro vývoj nových účinných látek proti infekcím patogenních mikroorganismů. Tedy ve farmaceutickém průmyslu, lékařství.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob biotechnologické přípravy derivátů linkomycinu vyznačující se tím, že pro kultivaci je použit kmen *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, který má inaktivovaný alespoň jeden gen ze sluku *lmb* kódující biosyntézu 4-L-propylprolinu, přičemž do kultivačního média musí být dodána náhrada za složku, jejíž syntéza je inaktivací zablokována.
2. Způsob biotechnologické přípravy derivátů linkomycinu podle nároku 1 vyznačující se tím, že inaktivovaný je gen *lmbX* pro biosyntézu 4-L-propylprolinu.
3. Způsob biotechnologické přípravy derivátů linkomycinu podle nároku 2 vyznačující se tím, že jako náhrada za složku je do média přidáván derivát prolinu.
4. Použití kmene podle nároku 1 pro biotechnologickou přípravu biologicky aktivnějších derivátů linkomycinu.
5. Použití kmene podle nároku 4 který má inaktivované geny *lmbJ* a *lmbX* pro biotechnologickou přípravu biologicky aktivnějších derivátů linkomycinu.
6. Použití kmene podle nároku 4 který má inaktivovaný gen *lmbX* pro biotechnologickou přípravu biologicky aktivnějších derivátů linkomycinu.
7. Použití kmene podle nároku 4 který má inaktivovaný gen *lmbJ* pro biotechnologickou přípravu biologicky aktivnějších derivátů linkomycinu

Obr.1

Inaktivační primery

dJf

5'-CGAGTGGCCAACGTCCTGGTGAGGAAAGAGAATTCAATGATTCCGGGG
ATCCGTCGACC- 3'

dJr

5'-GCGCCCTAGTCACCGTGCGCCCGGGCGTAGACGGACACGTGTAGGCTGGA
GCTGCTTC- 3'

dXf

5'-CGCGCCCATCCTGCACAGCGCACCGGAGGAAGCATGATCATTCCGGGGA
TCCGTCGACC- 3'

dXr

5'-GAGAAAAGAGCCGCTGACGCAAGGGGCCCTCGGCGACTATGTAGGCTGG
AGCTGCTTC- 3'

Ověřovací primery

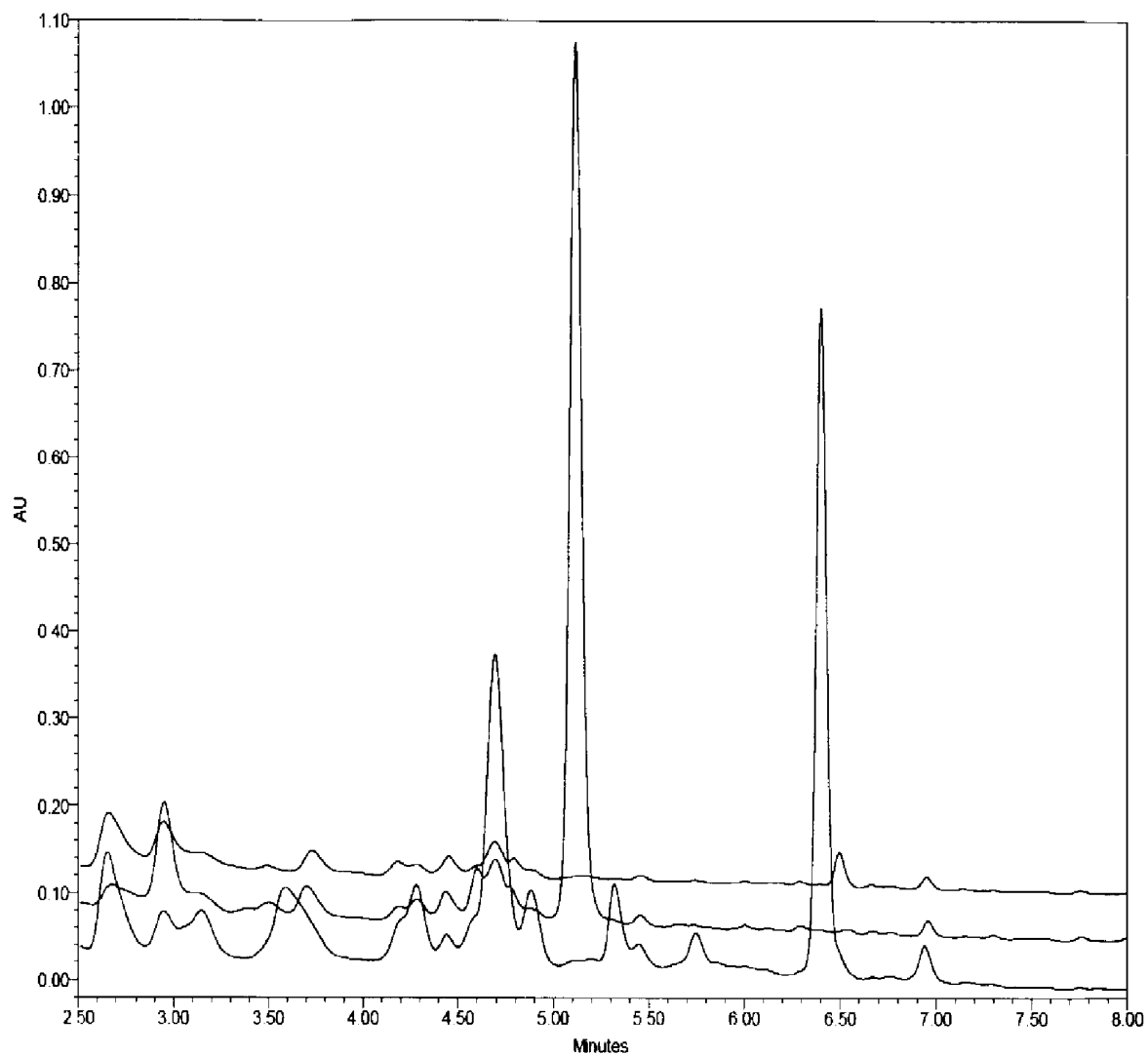
chJf 5'-TCCCGGTCGAAGAACAC- 3'

chJr 5'-GTCGCGCCCTAGTCAC- 3'

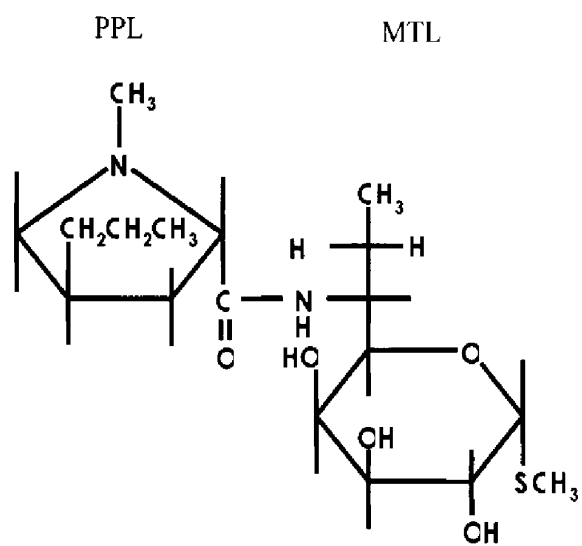
chXf 5'-CCGGCATCAACGACT- 3'

chXr 5'-CCAGATGGAACGAATTCA- 3'

Obr. 2



Obr. 3



Obr.4:

Použité kmeny E.coli:

Bakteriální kmen/plazmid/antb:

- DH5 α /pIJ773/apra a amp
- DH5 α /pIJ781/viomycin
- BW25113/pIJ790/cm (30 °C)
- BW25113/pIJ790+LK6 kosmid/karb + cm + kan (30 °C)
- BW25113/ LK6 kosmid+kazeta pIJ773/ apra + karb + kan
- BW25113/ pIJ790+LK6 kosmid+kazeta pIJ773/ apra + cm + kan (30 °C)
- BW25113/ LK6 kosmid+kazeta pIJ773+kazeta pIJ781/ apra + karb + kan + vio
- ET12567/pUZ8002/kan (25 μ g/ml) + cm
- ET12567/pUZ8002+ LK6 kosmid+kazeta pIJ773/apra + cm + kan
- DH5 α /BT340/cm (30 °C)
- DH5 α /LK6 kosmid s jizvou/kan

Obr.5:

selekční antibiotika:

Koncentrace antibiotik v médiu:

- Apramycin (apra) 50 µg/ml
- Ampicilin (amp) 100 µg/ml
- Karbenicilin (karb) 100 µg/ml
- Viomycin (vio) 30 µg/ml
- Chloramfenikol (cm) 25 µg/ml
- Kanamycin (kan) 50 µg/ml

Obr. 6

LB médium

trypton	10 g
kvasničný extract	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	ad 1 000 ml, pH 7,5

SOC médium:

kvasničný extract	5,5 g
trypton	20 g
NaCl 1 M	10 ml
KCL 1 M	2,5 ml
dH ₂ O	970 ml, pH 7,0
<i>po sterilizaci přidat</i>	
2 M MgCl ₂	10 ml
2 M glukóza	10 ml

YEME :

kvasničný extract	3 g
pepton	5 g
sladový extract	3 g
sacharóza	340 g
glukóza	10 g
dH ₂ O	ad 1 000 ml, pH 7,2
<i>po sterilizaci přidat:</i>	
2,5 M MgCl ₂	2 ml

AVM médium:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
kvasničný extract	2 g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	50 mg
CaCO ₃	5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	50 mg
MnSO ₄ 7H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	100 mg
dH ₂ O	ad 880 ml, pH 7,4
<i>po sterilizaci přidat:</i>	
25% glukóza	120 ml

2 x YT médium:

Difco Bacto tryptone	16 g
Difco Bacto yeast extract	10 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	ad 1 000 ml

LB agar

LB médium	1 litr
agar	15 g

MS agar:

agar	20 g
manitol	20 g
sójová mouka	20 g
vodovodní H ₂ O	ad 1 000 ml

BG agar:

kvasničný extract	4 g
sladový extract	10 g
glukóza	4 g
CaCO ₃	2 g
agar	12 g
dH ₂ O	do 1 000 ml, pH 7,2

DNA agar:

agar	10g
trypton	10g
NaCl	5g
glukóza	1g
dH ₂ O	do 1 000 ml

B1 agar:

Hovězí extract	10 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
dH ₂ O	ad 1000 ml, pH 7,2

R2YE agar:

Sacharóza	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	10,12 g
Glukóza	10 g
casamino acids	0,1 g
Agar	20 g
dH ₂ O	ad 800 ml, pH 7,2

Stopové prvky:

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	10 mg
dH ₂ O	ad 1 000 ml

Po sterilizaci přidat:

kvasničný extract (10%)	50 ml
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	10 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O (3,68 %)	80 ml
L-prolin (20%)	15 ml
TES (5,73%, pH 7,2)	100 ml
stopové prvky	2 ml
1M NaOH	5 ml

T pufr:

sacharóza	25 ml
H ₂ O	75 ml
stopové prvky (kap. 3.1.3.)	0,2 ml
K ₂ HPO ₄ (2,5%)	1 ml
K 9,3 ml směsi přidat:	
CaCl ₂	0,2 ml
1M Tris/kyselina maleinová, pH 8,0	0,5 ml

P pufr :

sacharóza	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,02g
stopové prvky (kap. 3.1.3.)	2 ml
Doplnit H ₂ O na 800ml	
<i>Po sterilizaci k 50 ml přidat:</i>	
K ₂ HPO ₄ (0,5%)	1 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O (3,68%)	10 ml
TES pufr (5,73%, pH 7,2)	10 ml