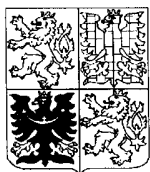


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.11.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.11.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19751242**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/07397**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/25869**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1874

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/68

C 12 N 15/70

(71) Přihlašovatel:

PHARMA-ZENTRALE GMBH, Herdecke, DE;

(72) Původce:

Malinka Jürgen, Selm, DE;

Hacker Jörg, Gerbrunn, DE;

Blum-Oehler Gabriele, Würzburg, DE;

Sonnenborn Ulrich, Bochum, DE;

Schulze Jürgen, Bergholz-Rehbrücke, DE;

Proppert Hans, Hagen, DE;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Sekvence DNA

(57) Anotace:

Řešení se týká sekvence DNA a použití této sekvence v mikrobiologii k analytice a/nebo diagnostice, v lékařství, ve fyziologii výživy nebo v biotechnologiích, zvláště jako vektor pro expresi.

Sekvence DNA

Oblast techniky

Vynález se týká sekvence DNA z genu fimbríí kmene *Escherichia coli* DSM 6601.

Dosavadní stav techniky

Escherichia coli je gramnegativní bakterie, která se vyskytuje ve střevech u lidí i jiných živočichů i v jiném prostředí. Tento mikroorganismus má velké množství variant, které se od sebe liší antigeny pouzdra, povrchovými antigeny a antigeny bičíků, takže může být rozdělen na celou řadu serologických typů. Zařazení podle serotypů však nevypovídá téměř nic o virulenci jednotlivých kmenů, takže i v případě téhož serotypu je mikroorganismus rozdílně patogenní pro člověka i pro jiné živočichy, tyto rozdíly se mohou v extrémních případech pohybovat od avirulence až po vysokou patogenitu. Kmen *E. coli* DSM 6601 patří do serologické skupiny O6:K5 a je hodnocen jako nepatogenní pro člověka i pro jiné živočichy.

Tento kmen má dva chromosomálně kódované geny pro fimbrie, a to typ I (fim) a typ F1C (foc). Je známo, že fimbrie tohoto kmene nesou adhesin. Adhesiny jsou struktury, které hrají podstatnou úlohu při přilnutí bakteriálních buněk na jiné buňky.

Geny fimbríí mají převážné použití v analytice a diagnostice. Použít je však možno tyto geny také v lékařství a ve fyziologii výživy nebo v biotechnologiích.

Geny fimbrií nebo jejich hlavní podjednotky je možno využít např. k charakterizaci určitého kmene, takže je možno získat další informace o sekvencích těchto genů.

Podstata vynálezu

Nyní byly prováděny výzkumy kmene *E. coli* DSM 6601 a byly získány sekvence DNA pro hlavní podjednotku fimbrií *fimA*, která je znázorněna na obr. 1 a pro podjednotku *focA*, která je znázorněna na obr. 2. Tyto sekvence DNA, získané z uvedeného kmene byly podrobeny analýze sekvence pomocí programu banky dat a byly srovnávány se sekvencemi DNA známých kmenů. Při analýze podjednotky *focA* kmene DSM 6601 se sekvencí z kmene AD 110, byly prokázány odchylky v jediném místě, kdežto při srovnání sekvence DNA kmene DSM 6601 (gen *fimA*) se srovnávacím kmenem HB 101, byly prokázány odchylky na větším počtu míst, jak je zřejmé z obr. 1 a 2.

Pro analýzu obou hlavních podjednotek genů fimbrií *fimA* a *focA* kmene DMS 6601 a srovnávacích kmenů AD 110 a HB 101, byly odpovídající fragmenty DNA nejprve zpracovány působením PCR z chromosomů uvedených kmenů.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení jeho rozsahu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Získání genu *fimA* z kmenů DSM 6601 a HB 101

Pro PCR-reakci byly použity následující páry primerů:

*fimA*1: 5'-GTG TAC AGA ACG ACT GCC-3'

*fimA*2: 5'-GTA ATG ACG TCC CTG AAC-3'

Podmínky PCR: Stupeň 1: 3 min při 95 °C denaturace
 Stupeň 2: 45 s při 95 °C
 Stupeň 3: 45 s při 53 °C
 Stupeň 4: 45 s při 72 °C
 Stupeň 5: 5 min při 72 °C

Stupně 2 až 4 se opakují 30krát.

Příklad 2

Získání genu *focA* z kmenů DSM 6601 a AD 110

Pro PCR-reakci byly použity následující páry primerů:

*focA*1: 5'-CTC ACA TTG CAT TTA TGA AC-3'

*focA*2: 5'-GGT ATA TAT CCG TTA CAC TG-3'

Podmínky PCR: Stupeň 1: 3 min při 95 °C denaturace
 Stupeň 2: 45 s při 95 °C
 Stupeň 3: 45 s při 51 °C
 Stupeň 4: 45 s při 72 °C
 Stupeň 5: 5 min při 72 °C

Stupně 2 až 4 se opakují 30krát.

Příklad 3

Klonování a izolace plasmidu

PCR-produkty, získané v příkladu 1 a 2 byly klonovány způsobem podle publikace Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, druhé vydání 1989, Cloning, Transformation, 1.53-18.84, PCR: 14.00 - 14.35 ve vektoru pUC 18 a výsledná DNA plasmidu byla použita k transformaci kmene *E. coli* K12, DH5alpha.

Izolace DNA plasmidu byla prováděna způsobem podle publikace Birnboim A. C., a Doly J., 1979, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Postup byl prováděn tak, že 3 ml prostředí LB byly naočkovány kolonií bakterií a živný roztok byl přes noc protřepáván při teplotě 37 °C. Pak byla kultura odstředěna v Eppendorfově nádobce a střední část byla odstraněna pipetou. Usazenina byla znovu uvedena do suspenze ve 100 mikrolitrech roztoku I, který obsahoval 50 mM glukózy, 10 mM EDTA o pH 8, 25 mM Tris-HCl o pH 8. Po 5 minutách inkubace při teplotě místnosti bylo přidáno 200 mikrolitrů roztoku II, obsahujícího 0,2 N hydroxidu sodného s 1 % SDS, směs byla míchána až do vyčeření a nádobka byla uložena na dalších 5 minut do ledu. Pak bylo přidáno 150 mikrolitrů roztoku III, obsahujícího 3 M octanu sodného o pH 4,8, směs byla krátkou dobu protřepávána až do vysrážení chromosomální DNA ve formě vloček a směs byla na dalších 5 minut uložena do ledu. Vysrážená chromosomální DNA a zbytky buněk byly ještě 5 minut odstředěny a supernatant, obsahující DNA plasmidu, byl přenesen do jiné nádoby. K čištění DNA plasmidu bylo přidáno 50 mikrolitrů fenolu a 150 mikrolitrů směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1 a po krátkém protřepání byla směs na 2 minuty odstředěna. Vodná fáze byla pipetou přenesena do jiné nádoby. DNA plasmidu byla vysrážena přidáním dvou objemů ledového ethanolu, načež byla směs odstředěna 10 minut. Usazenina byla promyta 70% ethanolem a vysušena. DNA plasmidu byla znovu uvedena do suspenze ve 20 mikrolitrech bidestilované vody a pak uložena při teplotě -20 °C.

Příklad 4

Analýza sekvence DNA

Analýza sekvence DNA byla provedena způsobem podle publikace Sanger F., Nicklen S., a Coulson, A. R., 1977 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467: DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Analýza sekvence DNA byla prováděna při použití balíčku T7 (Pharmacia LKB) pro analýzu sekvence.

V denaturačním stupni bylo smíseno 8 mikrolitrů (1,5 až 2 mikrogramy) DNA plasmidu a 2 mikrolitrů, 2 N roztoku hydroxidu sodného, po krátkém odstředění byla směs inkubována při teplotě místnosti. Pak byla DNA vysrážena přidáním 3 mikrolitrů 3 M octanu sodného o pH 4,8, 7 mikrolitrů bidestilované vody a 60 mikrolitrů ledového absolutního ethanolu, srážení trvalo 15 minut při teplotě -70 °C. Vysrážená DNA byla odstředěna 10 minut, promyta 70% ethanolem a usušena.

Při vazné reakci byla denaturovaná DNA uvedena do suspenze v 10 mikrolitrech bidestilované vody, bylo přidáno 2 mikrolitry pufru pro vazbu a 2 mikrolitry primeru (40 ng). Směs byla inkubována 20 minut při teplotě 37 °C tak, aby bylo možno uskutečnit vazbu primeru na matrici DNA. Reakční směs byla na 10 minut zchlazena na teplotu místnosti a pak byla okamžitě použita pro značení nebo byla zchlazena na teplotu -20 °C a uložena. Při značení byla vytvořena směs 3 mikrolitry značící směsi, 1 mikrolitr [alfa-³²P]dATP a 2 mikrolitry T7-polymerázy (T7-polymeráza byla zředěna puftrem pro ředění enzymů v poměru 1:5) a po krátkém promíchání byla směs inkubována 5 minut při teplotě místnosti. V průběhu této doby byla předeheřata směs pro analýzu a pro terminační reakci na teplotu 37 °C

(na 1 nádobku 2,5 mikrolitrů směsi 'G'-, 'A'-, 'T'- a 'C'-). Po ukončení značící reakce byly vždy 4 mikrolitry této směsi přidány do 4 směsí pro analýzu sekvence a směsi byly krátce promíchány pipetou. Terminační reakční směsi byly inkubovány 5 minut při teplotě 37 °C. K ukončení reakce bylo přidáno vždy 5 mikrolitrů roztoku pro přerušení reakce. Směsi byly přeneseny do inkubátoru s teplotou 95 °C, 2 minuty denaturovány a pak uloženy do ledu. Vždy 2,5 mikrolitrů reakční směsi bylo nanášeno na gel pro analýzu sekvence se složením 25,2 g močoviny, 22 ml bidestilované vody, 6 ml 10x TBE, 10 ml 40% polyakrylamidu, 2 ml persíranu amonného s koncentrací 16 mg/ml a 60 mikrolitrů TEMED v pořadí 'G', 'A', 'T', 'C'. Elektroforéza probíhala při 40 W a napětí 1500 V celkem 4,5 hodin.

Tyto sekvence DNA je také možno známým způsobem připravit synteticky a určité úseky sekvence pak použít jako primery, což umožní identifikaci kmene *E. coli* DSM 6601. Rovněž je možno uložit odpovídající sekvence DNA tohoto kmene genetickou technologií do jiných kmenů *E. coli*, a tím např. modifikovat přilnutí buněk nebo vlastnosti kolonií jiných kmenů.

Údaje o sekvenci fimadsm:

Vlastnosti sekvence:

Délka	549 párů bazí
Typ	DNA
Druh řetězce	dvojitý
Topologie	lineární

Původ sekvence:

Organismus	<i>Escherichia coli</i>
Kmen	DSM 6601
Typ buněk	jednobuněčný organismus

Popis sekvence fimadsm:

```
1  ATGAAAATTA AAACCTCTGGC AATCGTTGCT CTGTCGGGCTC TGTCCCTCAG
51  TTCCGCAGCG GCTCTGGCCG AACTACGAC GGTAAATGGT GGGGCCGTTG
101 ACTTTAAAGG GGAAGTTGTT AACGCCGCTT GCGCAGTTGA TGCAGGCTCT
151 GTTGATCAAA CCGTTCAGTT AGGCCAGGTT CGTACCGCTA GCCTGAAGCA
201 GGAAGGAGCA ACCAGCTCTG CCGTTGGTTT TAACATTCAG GTGAATGATT
251 GCGATACCAC TGTGCCCACA AAAGCTGCTG TTGCCTTCTT AGGTACGGCA
301 ATTGATGCTA CCGATACTGA TGTACTGGCT CTGCAGAGTT CAGCTGCGGG
351 TAGCGCAACA AACGTTGGTG TGCAGATCCT GGACAGAACG GGTGCTGCGC
401 TGACGCTGGA CCGTGCGACA TTTAGTTCAG AAACAACCCT GAATAACGGA
451 ACCAATACCA TTCCGTTCCA GCGCGGTTAT TTTGCAACCG GTGCCGCAAC
501 CCGGGGTGCT GCTAATGCGG ATGCGACCTT CAAGGTTTCAG TATCAATAA
```

Údaje o sekvenci focadsm:

Vlastnosti sekvence:

Délka	543 párů bazí
Typ	DNA
Druh řetězce	dvojité
Topologie	lineární

Původ sekvence:

Organismus	Escherichia coli
Kmen	DSM 6601
Typ buněk	jednobuněčný organismus

Popis sekvence focadsm:

1 atgaagttaa aattcatctc catggctgta ttttcagctc tgaccctggg
51 tgttgcgaca aatgcgtctg ctgtcaccac ggtaggtgt ggtacagttc
101 attttaaggg tgaagtgggt aatgctgcat gtgctgtaaa cactaactca
151 ttgatcaga cggttaatct tggacagggt cgttccgaaa gattgaaagt
201 agatggagct aaaagcaatc cagttggatt tacaattgaa ttaaattgatt
251 gtgactcgca ggtgtctgct ggtgcaggaa ttgtcttttc aggccagca
301 gttactggta aaacagatgt tcttgcttta caaagttctg cagcgggttc
351 tgcaacaaac ttcggcggtc agattactga ccataggccg aaggttgtac
401 ctttagatgg aactgcaagc tcaacgttta cattaactga cggaaccaac
451 aaaattccat ttcaggcggt ttactacgca actggacagg ccactgctgg
501 tattgccaac gccgacgcca cctttaaaagt tcagtaccag taa

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sekvence DNA se sledem nukleotidů, znázorněným na obr. 1 nebo část této sekvence.
2. Sekvence DNA se sledem nukleotidů, znázorněným na obr. 2 nebo část této sekvence.
3. Použití sekvence DNA podle nároku 1 nebo 2 v mikrobiologické analytice a/nebo diagnostice.
4. Použití sekvence DNA podle nároku 1 nebo 2 v lékařství a/nebo pro účely fyziologie výživy nebo probiotické účely.
5. Použití sekvence DNA podle nároku 1 nebo 2 v biotechnologii, zejména jako vektoru pro expresi.

Zastupuje:

DSM 1ATGA 4
6601
HB101 551 GACTGCCCATGTCGATTTAGAAATAGTTTTTTGAAAGGAAAGCAGCATGA 600
5 AAATTAAAACTCTGGCAATCGTTGCTCTGTCTGGCTCTGTCCCTCAGTTCC 54
601 AAATTAAAACTCTGGCAATCGTTGTTCTGTCTGGCTCTGTCCCTCAGTTCT 650
55 GCAGCGGCTCTGGCCG [ATACTACGACGGTAAATGGT] GGGGCCGTTCACTT104
651ACAGCGGCTCTGGCCG CTGCCACGACGGTTAATGGT GGGACCGTTCACTT700
105 TAAAGGGGAAGTTGTTAACGCCGCTTGCGCAGTTGATGCAGGCTCTGTTG 154
701 TAAAGGGGAAGTTGTTAACGCCGCTTGCGCAGTTGATGCAGGCTCTGTTG 750
155 ATCAAACCGTTTCAGTTAGGCCAGGTTTCGTACCGCTAGCCTGAAGCAGGAA 204
751 ATCAAACCGTTTCAGTTAGGACAGGTTTCGTACCGCATCGCTGGCACAGGAA 800
205 GGAGCAACCAGCTCTGCCGTTGGTTTTTAACATTCAGGTGAATGATTGCCA 254
801 GGAGCAACCAGTTCTGCTGTCTGGTTTTTAACATTCAGCTGAATGATTGCCA 850
255 TACCACTGTTGCCACAAAAGCTGCTGTTGCCTTCTTAGGTACGGCAATTG 304
851 TACCAATGTTGCATCTAAAGCCGCTGTTGCCTTTTTTAGGTACGGCGATTG 900
305 [ATGCTACCGATACTGATGTA] CTGGCTCTGCAGAGTTTCAGCTGCGGGTAGC354
901 ATGCGGGTCATACCAACGTT CTGGCTCTGCAGAGTTTCAGCTGCGGGTAGC950
355 GCAACAAACGTTGGTGTGCAGATCCTGGACAGAACGGGTGCTGCGCTGGC 404
951 GCAACAAACGTTGGTGTGCAGATCCTGGACAGAACGGGTGCTGCGCTGAC 1000
405 GCTGGACGGTGCGACATTTAGTTCAGAAACAACCCTGAATAACGGAACCA 454
1001 GCTGGATGGTGCGACATTTAGTTCAGAAACAACCCTGAATAACGGAACCA 1050
455 ACACCATTCCTGTTCCAGGCGCGTTATTTTGCAACCGGTGCCGCAACCCCG 504
1051 ATACCATTCCTGTTCCAGGCGCGTTATTTTG...CCGGGGCCGCAACCCCG 1097
505 GGTGCTGCTAATGCGGATGCGACCTTCAAGGTTTCAGTATCAATAA..... 549
1098 GGTGCTGCTAATGCGGATGCGACCTTCAAGGTTTCAGTATCAATAACCTAC 1157

Abb. 1 / 2

DSM 1-atgaagttaaaattcatctccatggctgtattttcagctctgaccctggg 50
6601 |||||
AD 110 1 atgaagttaaaattcatctccatggctgtattttcagctctgaccctggg 50

51 tgttgcgacaaatgCGTCTGCTGTCA[ccacgggttaggtgtggtacag]ttc 100
|||||
51 tgttgcgacaaatgCGTCTGCTGTCA ccacgggttaatggtggtacag ttc 100

101 attttaagggtgaagtgggttaaatgctgcatgtgctgtaaacactaactca 150
|||||
101 attttaagggtgaagtgggttaaatgctgcatgtgctgtaaacactaactca 150

151 ttCGATCAGACGGTTAATCTTGGACAGGTTCTTCCGAAAGATTGAAAGT 200
|||||
151 ttCGATCAGACGGTTAATCTTGGACAGGTTCTTCCGAAAGATTGAAAGT 200

201 agatggagctaaaagcaatccagttggatttacaattgaattaaatgatt 250
|||||
201 agatggagctaaaagcaatccagttggatttacaattgaattaaatgatt 250

251 gtgactcgCAGGTGTCTGCTGGTGCAGGAATTGTCTTTTCAGGCCAGCA 300
|||||
251 gtgactcgCAGGTGTCTGCTGGTGCAGGAATTGTCTTTTCAGGCCAGCA 300

301 gttactggtaaaacagatgttcttgctttacaaagttctgcagcgggttc 350
|||||
301 gttactggtaaaacagatgttcttgctttacaaagttctgcagcgggttc 350

351 tgcaacaaacttcggcggttcagattactgaccataggccgaagggtgtac 400
|||||
351 tgcaacaaacttcggcggttcagattactgaccataggccgaagggtgtac 400

401 ctttagatggaactgcaagctcaacgtttacattaactgacggaaccaac 450
|||||
401 ctttagatggaactgcaagctcaacgtttacattaactgacggaaccaac 450

451 aaaattccatttcaggcggtttactacgcaactggacaggccactgc [tgg500
|||||
451 aaaattccatttcaggcggtttactacgcaactggacaggccactgc tgg500

501 tattGCCAACGCCGACG]ccacctttaagttcagtaccagtaa 543
|||||
501 tattGCCAACGCCGACG ccacctttaagttcagtaccagtaa 543