

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 184

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴
C 12 N 15/00

(21) PV 2839-88. M

(22) Přihlášeno 27 04 88

(40) Zveřejněno 12 09 89

(45) Vydáno 15 03 91

(75)

Autor vynálezu

PETŘÍČEK MIROSLAV ing.,
TICHÝ PAVEL RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Rekombinovaný plasmid pPM882

(57) Řešení se týká nového rekombinovaného plasmidu pPM882 s obsahem snadno vydělitelné genetické informace v 6925 kp velkém HindIII fragmentu kodujícím resistenci k antibiotikům neomycinu a thioestreptonu. Charakteristickými znaky rekombinovaného plasmidu pPM882 je mol. hmotnost 11,3 kb a schopnost zvyšovat svůj počet kopií v bunce hostitelského kmene E. coli pro přidání chloramfenikolu. Rekombinovaný plasmid pPM882 je množen a uchováván v buňkách kmene E. coli HB101 uloženého v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4007.

Vynález se týká nového rekombinovaného plasmidu pPM882 o velikosti 11,3 kb s obsahem genetické informace, kodující resistenci k neomycinu a thiostreptonu v buňkách streptomycet.

Rozvojem genetického inženýrství vznikla rozsáhlá potřeba vyčlenit genetickou informaci na snadno manipulovatelný extrachromosomový replikon, který potom alouží jako vektorová molekula pro přenos genetické informace do zvolené hostitelské buňky nebo jako snadný zdroj genetické informace při rekombinačních pokusech in vitro. Nejvhodnější extrachromosomovými molekulami DNA pro genetické inženýrství ve streptomycetách jsou ve streptomycetových buňkách přirozeně se vyskytující molekuly plasmidů. V letech 1980 až 1986 byla z různých streptomycetových kmenů izolována řada plasmidů a i když tyto plasmidy neobsahovaly žádné snadno detekovatelné geny, byla většina z nich okamžitě patentově chráněna. Námátkou uvádíme kryptické streptomycetové plasmidy patentované v letech 1983 až 1985. Plasmid pOA29 ze *Streptomyces griseus*-japonský patent 5914593, plasmid pOA19 ze *S. griseus*-japonský patent 59143588, plasmid pSJ2 ze *S. jumonjinensis*-japonský patent 59213391, plasmid pSJ1 ze *S. jumonjinensis*-japonský patent 59220188, plasmid pSAN181 ze *S. fulvoviridis*-US patent 4517300, plasmid pATM3 ze *S. castaneoglobisporus*-US patent 4518698.

K účinnému genetickému inženýrství ve streptomycetách je však bezpodmínečně nutné provést označení kryptických plasmidů snadno selektovatelnými znaky. Takovými znaky mohou být i geny kodující resistenci k antibiotikům thiostreptonu (*tsr* gen) a neomycinu (*aph* gen). Tyto geny byly v John Innes Institute v Anglii vyčleněny z chromosomu *Streptomyces antibioticus* a *Streptomyces fradiae* na několik streptomycetových plasmidů (Hopwood et al. Genetic Manipulation of *Streptomyces*, Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich 1985), z kterých jsou však manipulací in vitro těžko vyčlenitelné a izolované plasmidové DNA při izolaci často kontaminovány chromosomovou DNA streptomycet.

Pokusy o klonování celého streptomycetového plasmidu v *E. coli* konstruováním tzv. shuttle vektoru vedou při přenosech do streptomycet k značnému poškození shuttle vektoru způsobeného rozsáhlými deletcemi, majícími počátek v plasmidu pBR322, který zajišťuje replikace shuttle vektoru v buňkách *E. coli*.

Klonování *aph* a *tsr* genů kodujících syntézu enzymů aminoglykosidofosfotransferázy a 16S RNA metylázy, (jejichž produkce streptomycetovou buňkou zajišťuje resistenci streptomycetové buňky k antibiotiku neomycinu a thiostreptonu) v plasmidovém vektoru pBR322, podle vynálezu umožňuje bezpečné uchování *aph* a *tsr* genu v rekombinačně deficientním hostiteli *E. coli*. Odtud lze oba geny snadno přenést na streptomycetové replikony a přenesení podstatně kratších úseků DNA, navíc streptomycetového původu, překonává problém deletcí nalezených při použití shuttle vektorů.

Rekombinovaný plasmid pPM882 je množen a uchováván v buňkách kmene *Escherichia coli* HB101, kde vykazuje vysokou stabilitu. Přítomnost rekombinovaného plasmidu v buňkách *E. coli* HB101 je snadno detekovatelná resistencí kmene k ampicilinu a jeho citlivostí k tetracyklinu.

Kmen *E. coli* HB101, ve kterém je rekombinovaný plasmid uchováván je uložen v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 4007.

Charakteristickým znakem rekombinovaného plasmidu pPM882 je molekulová hmotnost 11,3 kb a přítomnost 6 925 bp velkého HindIII restričního fragmentu izolovaného ze streptomycetového plasmidu pIJ61 (Thompson et al. J. Bacteriol. 151:668, 1982), který obsahuje geny determinující resistenci k neomycinu a thiostreptonu v buňkách streptomycet a dále zachovává schopnost plasmidů zvyšovat jeho počet kopií v hostitelské buňce *E. coli* po přidání chloramfenikolu. Zvýšení počtu kopií rekombinovaného plasmidu pPM882 výrazně zjednoduší proces izolace úseků deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která koduje resistenci k neomycinu a thiostreptonu v buňkách streptomycet, a tím umožňuje rychlé a spolehlivé značení konstruovaných extrachromosomových vektorů používaných pro genové manipulace v široké škále průmyslově významných streptomycet. Rekombinovaný plasmid byl získán násled-

důležitým postupem: z kmene *E. coli* byla izolována plasmidová DNA mnohokopiového plasmidu pBR322 (Bolívar et al., Gene 2:95, 1977) o velikosti 4 363 bp (Paen, Gene 22:277, 1978) kodující resistenci k antibiotikům ampicilinu a tetracyklinu. DNA plasmidu pBR322 byla štěpena restrikční endonukleázou HindIII, pro kterou je její jediné zásahové místo v molekule DNA plasmidu pBR322 situováno v oblasti kodující resistenci k antibiotiku tetracyklinu. Do tohoto HindIII restrikčního místa byl vpraven ligací in vitro pomocí enzymu T4-DNA ligázy 6 935 bp velký HindIII fragment, izolovaný z molekuly DNA plasmidu pIJ6', jehož přirozeným hostitelem jsou buňky kmene *Streptomyces lividans*.

Po vytvoření rekombinovaných molekul plasmidu pPM882 byly tyto molekuly transformovány do kompetentních buněk kmene *E. coli* HB101 a buňky obsahující rekombinovaný plasmid byly detekovány na základě své citlivosti k antibiotikům ampicilinu a tetracyklinu. Buňky kmene *E. coli* HB101 transformované plasmidem pPM882 byly detekovány jako ampicilin rezistentní a tetracyklin senzitivní. Takto připravený rekombinovaný plasmid si uchoval schopnost vektorové molekuly plasmidu pBR322 zvyšovat svůj počet kopií v hostitelské buňce *E. coli*, jestliže byl přidán chloramfenikol k exponenciálně rostoucím kulturám hostitele.

K ověření celistvosti klonované genetické informace byly z klonů *E. coli* HB101 obsahujících rekombinovaný plasmid pPM882 izolovány DNA rekombinovaného plasmidu a podrobeny restrikční analýze. Restrikční analýza prokázala, že rekombinované plasmidové DNA pPM882 izolované ze sledovaných klonů, obsahují 6 925 bp velký HindIII restrikční fragment.

Ligace 6 925 bp velkého plasmidu pIJ61 do vektorové molekuly pBR322 dává možnost použít zvýšený počet restrikčních endonukleáz k vyštěpení restrikčních fragmentů s genetickou informací pro syntézu neomycinfosfotransferázy a 16sRNA metylázy, jejichž syntéza ve streptomycetové buňce determinuje resistenci k neomycinu a thiostreptonu. Restrikční fragmenty získané štěpením rekombinované plasmidové molekuly pPM882 vhodné k zavedení genu kodujícího resistenci k neomycinu do streptomycetových replikonů jsou uvedeny v tabulce 1 a k zavedení genu kodujícího resistenci thiostreptonu do streptomycetových replikonů v tabulce 2.

Rekombinovaný plasmid pPM882 působí jako zdroj snadno izolovatelných selekčních znaků pro označení plasmidových a fágových vektorů používaných jako vektorů k přenosu genetické informace ve streptomycetách. Další možnost využití rekombinovaného plasmidu pPM882 je při konstrukci shuttle vektorů pro přenos genetické informace z *E. coli* do streptomycetové buňky a vice versa.

Tabulka 1

Restrikční fragment	Inserce	Velikost v bp
SatII - SstII	+	1 564
ClaI - XhoI	+	3 106
ClaI - KpnI	+	3 026
ClaI - HindIII	+	3 756
ClaI - EcoRI	+	3 785
ClaI - PstI	+	4 506
ClaI - BamHI	-	4 102
EcoRV - XhoI	+	2 833
EcoRI - SphI	+	2 753
EcoRV - KpnI	+	2 273
EcoRV - HindIII	+	3 483
EcoRV - EcoRI	+	3 512
EcoRV - PstI	+	4 262
EcoRV - BamHI	-	3 829
HindIII - HindIII	+	6 925

HindIII - BglII	+	4 925
HindIII - XhoI	+	6 275
HindIII - SphI	+	6 195
XhoI - BglII	+	
SpH - BglII	+	

SphI - SphI	+	6 572
PstI - BglII	+	5 374
EcoRI - BglII	+	4 324

EcoRI - XhoI	-	6 304
EcoRI - SphI	-	6 224

Tabulka 2

Restrikční fragment	Inserce	Velikost v bp

BglII - BamHI	+	2 420
HindIII - BamHI	+	5 050
BamHI - BamHI	+	5 396
SpHI - BamHI	+	5 587
EcoRI - BamHI	-	5 079
PstI - BamHI	-	5 800

BglII - SstI	+	2 326
HindIII - SstI	+	4 956
SphI - SstI	+	5 307
EcoRI - SstI	-	4 985
PstI - SstI	-	5 706

BglII - PstI	+	2 677
HindIII - PstI	+	5 307
SpHI - PstI	+	5 844
EcoRI - PstI	-	5 336
PstI - PstI	-	6 057

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Rekombinovaný plasmid pPM882 s obsahem genetické informace, kodující resistenci k neomycinu a thioestreptonu, charakterizovaný uvedenou restrikční enzymovou mapou, mající molekulovou hmotnost 11,3 kb a uchovávaný v kmenu *Escherichia coli* HB101 CCM 4007.