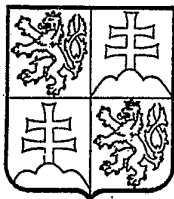


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

272 753

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C 12 N 9/40

(21) PV 3635-82

(22) Přihlášeno 18 05 82

(30) Právo přednosti od 04 06 81 DE  
(P 31 22 216.1)

(40) Zveřejněno 13 06 90

(45) Vydáno 02 12 91

(72) Autor vynálezu

MATTES RALF dr., OBERHAUSEN,  
BEAUCAMP KLAUS dr., TUTZING (DE)

(73) Majitel patentu

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM-  
-WALDHOF (DE)

(54)

Způsob výroby  $\alpha$ -galaktosidázy

(57) Řešení se týká způsobu výroby  $\alpha$ -galaktosidázy kultivací mikroorganismů v živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí s následnou izolací a čištěním výsledného produktu, tím že se ke zvýšení čistoty enzymu snížením obsahu invertázy izoluje z kmene *Escherichia coli* DSM 2092 DNA s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, tato DNA se rozštěpí endonukleázou Sal I za získání frakce DNA s molekulovou hmotností přibližně 4 megajednotky s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, získaný fragment se inkubuje s vektorem pBR 322 po jeho rozštěpení restriktaázou Sal I s obsahem genu pro odolnost proti ampicilinu, za přítomnosti DNA-ligázy fágu T4 za přítomnosti ATF, dithioerythritu a chloridu hořečnatého, získaná rekombinantní DNA se inkubuje s bunkami *E. coli*, transformované buňky se pěstují na živých prostředcích s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy, vzniklé kolonie, odolné proti ampicilinu se izolují a rozruší, ze získaného materiálu se izoluje DNA plasmidu s molekulovou hmotností 6,9 až 12,4 megajednotek, tato DNA se rozštěpí restrikční endonukleázou Hind III a zpracuje působením DNA-ligázy, získané renaturované plasmidy pBT 102 se uvedou do suspenze s bunkami *E. coli*, transformované buňky se znovu kultivují na živném prostředí s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy a ampicilinu, kolonie *E. coli*, využívající rafinózu se izolují a získané klony mikroorganismů se pěstují.

Vynález se týká způsobu výroby  $\alpha$ -galaktosidázy kultivací mikroorganismu, který produkuje  $\alpha$ -galaktosidázu, avšak neprodukuje invertázu.

Extrakty z cukrové řepy obsahují kromě sacharózy malé množství rafinózy, což je trisacharid, sestávající z monosacharidů galaktózy, glukózy a fruktózy. Tato rafinóza má tu nepříjemnou vlastnost, že se hromadí nad krystalickým produktem a při množství vyšším než 1 % celkového cukru ztěžuje krystalizaci. V každém cukrovaru se nachází denně v průběhu přibližně tříměsíční kampaně 5 až 10 tun rafinózy v matečném louhu po krystalizaci. Jen v NSR je denní množství rafinózy více než 200 tun.

Převedení rafinózy na sacharózu by bylo velmi hospodárné, protože toto množství nebylo až dosud možno dostatečně zpracovat, protože nebyla k dispozici technologie. Nejvýhodnější by bylo selektivní štěpení galaktózy z molekuly rafinózy tak, aby použité činidlo neštěpilo dále vznikající sacharózu. To nebylo až dosud chemickým způsobem možné.

Jsou známé enzymatické metody, při kterých se užívá přírodních enzymů, například  $\alpha$ -galaktosidázy. Tento enzym by měl odštěpit kvantitativně galaktózu z molekuly rafinózy. Všechny známé preparáty  $\alpha$ -galaktosidázy jsou však znečištěny enzymem invertázou, který štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Vzhledem k vysoké koncentraci sacharózy v poměru k rafinóze, která se obvykle pohybuje v rozmezí 60 až 80:1, je i malé znečištění  $\alpha$ -galaktosidázy invertázou velmi nepříjemné, protože dochází k rozštěpení velkého množství sacharózy, a tím i k nežádoucímu znečištění těmito cukry. Z tohoto důvodu nebylo možno štěpení  $\alpha$ -galaktosidázou použít v praxi.

Je nutno se zmínit o tom, že v případě  $\alpha$ -galaktosidáz, znečištěných invertázami, které byly až dosud technologicky použity, šlo především o enzymy z hub, které byly použity v technologii cukrů vzhledem ke své snadné přístupnosti. Tyto enzymy mají kromě znečištění ještě tu nevýhodu, že jako všechny enzymy z hub mají maximum účinnosti při poměrně kyselém pH, což působí při zpracování velkých množství, například v továrně, která zpracovává několik set m<sup>3</sup>/h za nutného okyselení a opětné neutralizaci velké problémy.

Je znám jediný typ  $\alpha$ -galaktosidázy, která je po čištění prostá invertázy. Tato  $\alpha$ -galaktosidáza však vyžaduje jako kofaktory ionty manganu a NAD a mimoto je málo stálá a nachází se v biologickém materiálu jen v nízké koncentraci. Z tohoto důvodu je použití tohoto typu  $\alpha$ -galaktosidázy v podmínkách kontinuálního provozu cukrovarů nemyslitelné.

Vynález si klade za úkol nalézt  $\alpha$ -galaktosidázu, která je přírodního původu a naprosto prostá invertázy. Kromě toho by měl enzym mít ještě následující vlastnosti:

Nejvyšší účinnost enzymu by měla být v blízkosti neutrální reakce, enzym by měl být stálý proti teplotě a v poměrně koncentrovaném roztoku cukru nebo rostlinného extraktu by měl mít dlouhou dobu působení, mimoto by nemělo být potřebné použití žádného kofaktoru.

Vynález vychází z toho, že při použití nové kombinace DNA by mělo být možné na jedné straně odstranit část genu, která je kódem pro enzym invertázy, a to ireversibilním způsobem, na druhé straně by mělo být možno tu část genu, která je kódem pro

$\alpha$ -galaktosidázu rozmnožit ve vhodném vektoru a změnou regulace takto získat požadovaný enzym, prostý invertázy v nejvyšší možné koncentraci. Žádoucí by bylo, aby byl použitelný již surový bakteriální extrakt nebo jeho imobilizovaná forma. Mělo by tedy jít o způsob, proveditelný při použití vhodného operonu a vhodné restriční endonukleázy.

Předmětem vynálezu je způsob výroby  $\alpha$ -galaktosidázy kultivací mikroorganismů v živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí s následnou izolací a čištěním výsledného produktu, vyznačující se tím, že se ke zvýšení čistoty enzymu snížením obsahu invertázy izoluje z kmene *Escherichia coli* DSM 2092 DNA s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, tato DNA se rozštěpí endonukleázou Sal I za získání frakce DNA s molekulovou hmotností přibližně 4 megajednotky s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, získaný fragment se inkubuje s vektorem pBR 322 po jeho rozštěpení restriktázou Sal I s obsahem genu pro odolnost proti ampicilinu, za přítomnosti DNA-ligázy fágu T4 za přítomnosti ATF, dithioerythritu a chloridu hořečnatého, získaná rekombinantní DNA se inkubuje s buňkami *E. coli*, transformované buňky se pěstují na živých prostředcích s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy, vzniklé kolonie, odolné proti ampicilinu se izolují a rozruší, ze získaného materiálu se izoluje DNA plasmidu s molekulovou hmotností 6,9 až 12,4 megajednotek, tato DNA se rozštěpí restriční endonukleázou Hind III a zpracuje působením DNA-ligázy, získané renaturované plasmidy pBT 102 se uvedou do suspenze s buňkami *E. coli*, transformované buňky se znovu kultivují na živném prostředí s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy a ampicilinu, kolonie *E. coli*, využívající rafinózu se izolují a získané klony mikroorganismů se pěstují.

Jako DNA, obsahující gen pro  $\beta$ -galaktosidázu se s výhodou užije materiál z *E. coli* MNTU 2743, DSM 2092 při pěstování tohoto kmene na vhodném živném prostředí při vyšší teplotě, s výhodou 37 až 42 °C po vysrážení polyethylenglykolem a čištění například hustotním gradientem s extrakcí fenolu.

Štěpení DNA, obsahující gen pro  $\alpha$ -galaktosidázu i vektoru se provádí známým způsobem, působením restriční endonukleázy Sal I, obvykle při teplotě 35 až 37 °C až do úplného rozštěpení molekuly DNA. Potom se endonukleáza denaturuje, obvykle zahřátím. Potom se frakcionují elektroforézou získané zlomky DNA, obsahující gen pro  $\alpha$ -galaktosidázu, a izoluje se fragment s relativní molekulovou hmotností přibližně 4 megadaltony.

Rekombinace tohoto zlomku s rozštěpeným vektorem nastává jednoduchým smísením roztoku s přísadou vhodné DNA ligázy. Výhodné je použití DNA ligázy fágu T4 (EC 5.5.1.1), je však možno užít i ligázu jiného původu.

Tímto způsobem se získá rekombinanta DNA, která se běžným způsobem smísí s buňkami, schopnými transformace a se schopností přijmout DNA, čímž dochází k transformační reakci.

Jako buňky, schopné transformace, se užívají buňky nejrůznějšího původu. Příkladem vhodných buněk mohou být buňky *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Bacillus subtilis*. Zvláště výhodné je použití *E. coli*, například kmene BMTU 2744 DSM 2093.

Uvedené poznámky platí zejména pro první transformační stupeň způsobu podle vynálezu. Ve druhém transformačním stupni způsobu podle vynálezu se volí buňky, schopné transformace s ohledem na další vlastnosti těchto buněk, jako je použitelnost částí buněk po získání  $\alpha$ -galaktosidázy, růstové vlastnosti a dostupnost. Zvláště vhodnými buňkami pro druhý transformační stupeň jsou opět buňky *E. coli* a *Pseudomonas putida*.

Volba vektoru závisí především na volbě buněk, schopných transformace. Při použití kmenů *E. coli* jako buněk, schopných transformace se jako vektor s výhodou užije plasmid pBR-322, (DSM 2089), který se běžně dodává a byl popsán v publikaci Nucl. Acid. Res. (1976) 5, 2721 až 2728.

Pro buňky *Sacharomyces* se jako vektor používá například plasmid pFL1, popsáný v publikaci Marcereau-Pujalon a další, Gene, sv. 11, 163 až 167 (1980). Pro buňky *Bacillus subtilis* je zvláště vhodný jako vektor plasmid pHB 23, popsáný v publikaci B. Michel a další, Gen. sv. 12, 147 až 154 (1980). Pro všechny další svrhu uvedené mikroorganismy a také pro *E. coli* je vhodný plasmid pBSF 1010. Totéž platí pro plasmid pKT 230, oba tyto plasmidy jsou popsány v publikaci "Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds" Eds. Hütter und Leisinger, Acad. Press. (1981) Londýn).

Z buněk, schopných transformace, padající v úvahu jsou výhodné ty, které samy neobsahují žádný plasmid, například shora uvedený kmen *E. coli* BM TU 2744 DSM 2093.

Při provádění způsobu podle vynálezu se nejprve provádí štěpení DNA s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu působením *Sal I* a potom štěpení plasmidové DNA po první transformaci enzymem *Hind III* nebo *Eco RI*, protože tyto restriční endonukleázy odpovídají místům, obsaženým v DNA. Pro rekombinaci zlomku o hmotnosti 4 megadaltony s rozštěpeným vektorem je zásadně možno užít jakoukoli vhodnou DNA-ligázu. Výhodná je DNA ligáza fágu T4. Opětná vazba nastává smísením roztoků v přítomnosti adenosintrifosfátu, sulphydrylové sloučeniny a hořčnatých iontů.

V případě, že má být stanoveno, které buňky obsahují vektor s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, je nutno provést pěstování na prostředí, které jako jediný zdroj uhlíku obsahuje rafinózu a mimoto obsahuje potřebné soli. Při použití vektoru s rezistencí proti antibiotikům se přidává do živného prostředí ještě antibiotikum, proti kterému mají být buňky s obsahem vektoru odolné. Postupuje se například tak, že plasmid pBR 322 obsahuje gen pro odolnost proti ampicilinu a tetracyklinu, takže v tomto případě s výhodou včleňuje do živného prostředí jedno z těchto antibiotik, které potlačuje růst těch buněk, které po transformaci uvedený gen neobsahují. Jako prostředí se užije prostředí s minimálním množstvím živin, které kromě naprosto nezbytných solí obsahuje pouze rafinózu.

Štěpení takto získané hybridní plasmidové DNA působením enzymu *Hind III* nebo *Eco RI* má za následek zničení sledu, který je kódem pro expresi rafinózopermeázy a invertázy. Při renaturaci působením DNA-ligázy se tímto způsobem získají vektory, které již neobsahují nežádoucí geny a je možno jich užít pro transformaci ve druhém stupni způsobu podle vynálezu, pro který jinak platí údaje, uvedené pro první stupeň.

Buňky, získané ve druhém transformačním stupni se podrobí selekci tak, že se pěstují na úplném živném prostředí s indikátorem pH a s obsahem rafinózy jako zdroje

uhlíku a odpovídajícího antibiotika. Úplné živné prostředí obsahuje kromě těchto látek ještě pepton a extrakt z kvasnic. Ty transformované buňky, ve kterých se vzhledem k předchozímu zpracování již nenachází gen pro rafinózopermeázu a při invertázu, nemohou využívat rafinózu a z tohoto důvodu zůstává pH živného prostředí v neutrální oblasti a v prostředí tedy dochází ke změně zbarvení. Kolonie těchto buněk je tedy možno snadno odlišit od kolonií, ve kterých ke zničení genu nedošlo, které využívají rafinózu a produkují kyselinu na základě odlišného zbarvení živného prostředí v okolí těchto kolonií vzhledem ke změně barvy indikátoru pH.

Protože takto zpracované buňky, které stále ještě produkují  $\alpha$ -galaktosidázu, již neprodukují rafinózopermeázu, která rafinózu štěpí, vznikají kolonie, jejichž buňky již nevyužívají rafinózu. K odlišení kolonií, které obsahují nebo neobsahují gen pro rafinózopermeázu a invertázu je výhodné použití ploten podle Mac Conkeyho (Difco), tyto plotny obsahují neutrální červen jako indikátor pH. Kolonie, využívající rafinózu, se zbarvují červeně, kolonie, které rafinózu nevyužívají, zůstávají bílé. Bílé kolonie se izolují a je možno je pěstovat způsobem, který odpovídá použitému výchozímu mikroorganismu.

Nové mikroorganismy je možno pěstovat v technickém měřítku a měly by zůstat stálé. Z nových mikroorganismů je možno získat enzym, jehož účinnost je o několik desítek vyšší, než účinnost enzymu z původního kmene.

Získaný enzym je prostý stop invertázy a štěpí rafinózu v matečném louhu při krystalizaci sacharózy při neutrálním pH a za použití teploty. Enzym nevyžaduje žádné kofaktory jako ionty manganu nebo NAD, je stálý a je možno jej fixovat na nosič, například na nerozpustné polysacharidy aktivované bromkyanem. Místo izolovaného enzymu je možno fixovat na vhodný nosič i mikroorganismus jako takový a je možno jej použít v této formě. Fixací se stává pro rafinózu znovu propustná buněčná membrána, která se původně stala nepropustnou pro rafinózu v důsledku zničení genu pro permeázu. Je samozřejmé, že je nutno použít vhodných fixačních metod.

Izolaci  $\alpha$ -galaktosidázy z nových mikroorganismů je možno provádět běžným způsobem. S výhodou se tato izolace provádí tak, že se biologická hmota podrobí tlaku, zpracování ultrazvukem a podobně. Tyto metody se volí v závislosti na výchozím mikroorganismu.

Po rozrušení buněčné stěny se s výhodou provádí srážení působením polyaniontů, při kterém  $\alpha$ -galaktosidáza obvykle zůstává v supernatantu. Jako polyaniontů se s výhodou užívá polyethylenaminů, zvláště sloučenin se střední molekulovou hmotností.

Z takto získané sraženiny je možno enzym získat působením síranu amonného, přičemž se užívá zejména koncentrace 0,8 až 1,6 M síranu amonného. Dialýzou a lyofilizací je možno ve vysokém výtěžku získat  $\alpha$ -galaktosidázu o čistotě větší, než 90 %, vhodnou pro technické užití.

Při použití plazmidu pBR 322 jako vektoru a *E. coli* BMTU 2744, DSM 2093 jako buňek schopných transformace se získá svrchu uvedeným způsobem nový mikroorganismus *E. coli* BMTU 2742, DSM 2091.

Tento nový mikroorganismus má následující vlastnosti:

Mikroorganismus obsahuje plazmid pBT 102, je odolný proti ampicilinu v koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  a produkuje nitrobuněčnou  $\alpha$ -galaktosidázu, která nevyžaduje přítomnost kofaktoru, neprodukuje žádnou invertázu. Zásadně se kromě uvedených znaků neliší od *E. coli* kmene K-12 a je možno jej pěstovat při teplotě 37 °C ve standardním živném prostředí, s výhodou za provzdušňování.

Mikroorganismy, pěstované způsobem podle vynálezu, se vyznačují vysokým obsahem  $\alpha$ -galaktosidázy, až 30 % celkové rozpustné bílkoviny sestává z  $\alpha$ -galaktosidázy a mohou přenášet své nové vlastnosti na další mikroorganismy.

Možnost přenosu spočívá například v tom, že se mikroorganismus, vypěstovaný způsobem podle vynálezu, pěstuje společně s dalším mikroorganismem, například na agaru. V případě, že se ve druhém transformačním stupni způsobu podle vynálezu užije kmen *E. coli*, který obsahuje plazmid RP 4, jak je uvedeno například v *J. Bacteriol.* 108, 1244 až 1249 (1971), vzniká mikroorganismus, který kromě plasmidu RP 4 obsahuje také hybridní vektor, například pBT 103, obsahuje tedy 2 plazmidy. Tento mikroorganismus přenášší při společném pěstování s kmeny *Pseudomonas* plazmid pBT 103 na tyto kmeny.

Buňky mikroorganismů, schopné transformace, může snadno zvolit každý odborník. Buňky se získávají s výhodou na konci exponenciální růstové fáze, potom se buňky izolují a uvedou v suspenzi v roztoku chloridu vápenatého, který je chlazen ledem. V této formě jsou buňky připraveny k příjmu DNA.

Při použití buněk *E. coli* je výhodným prostředím pro pěstování standardní živný bujón II (Merck, Darmstadt).

Vynález poskytuje způsob pěstování mikroorganismů, které vytvářejí enzym  $\alpha$ -galaktosidázu s velmi vysokou účinností, aniž by současně docházelo k výrobě invertázy. Získává se tedy zdroj  $\alpha$ -galaktosidázy, která je daleko vhodnější ke štěpení rafinózy nebo obdobných cukrů, například při krystalizaci cukru z řepného extraktu, než dosud známé přípravky  $\alpha$ -galaktosidázy. Tímto způsobem je tedy možné ve velkém technickém měřítku vyřešit problém získávání sacharózy z rafinózy. Mikroorganismus, pěstovaný způsobem podle vynálezu nebo tímto způsobem získanou  $\alpha$ -galaktosidázu je možno užít v potravinářské technologii i k jiným účelům, při kterých je zapotřebí rozštěpit uhlohydráty, štěpitelné  $\alpha$ -galaktosidázou. Příkladem může být odstranění Stachyózy ze sojové mouky, toto odstranění se požaduje v případě, že sojová mouka má být použitelná pro potravinářské účely.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

#### P ř í k l a d 1

Z kmene *E. coli* BMU 2743, DSM 2092, který jako DNA s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu obsahuje Pl raf je možno získat jiné kmeny s vysokou produktivitou  $\alpha$ -galaktosidázy následujícím způsobem:

## 1) Výroba Pl raf DNA s gentickou informací pro raf-operon z Pl raf-lyzátu

Kmen *E. coli* BMTU 2743, ( $\text{thr}^-$ ,  $\text{leu}^-$ ,  $\text{thi}^-$ ,  $\text{lacY}$ ,  $\text{tonA}$ ,  $\text{raf}^+$ , Plts-Lysogen), který je odvozen od *E. coli* K-12, BMTU 2744, DMS 2093, se pěstuje 4 hodiny při teplotě 30 °C za stálého třepání v 1 litru bujónu, který obsahuje 1 % tryptonu, 0,5 % extraktu z kvasnic, 0,2 % glukózy a 0,5 % chloridu sodného při pH 7,8 a po dosažení optické hustoty 0,5 OD<sub>650</sub>, měřeno při 650 nm při teplotě 40 °C, se k indukci represoru fágu, citlivého na teplotu, dále třepe 2 hodiny. Ze supernatantu se získávají uvolněné fágy vysrážením polyethylenglykolem a čistí se hustotním gradientem při použití chloridu cezného. Po extrakci fenolem a dialýze proti tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 10 mmolů a pH 8,0 se tímto způsobem získá 0,6 mg čisté DNA-fágu.

## 2) Výroba DNA vektoru

Ke klonování fragmentu Pl raf DNA se užije DNA plazmidu pBR 322, to jest vektoru, který jako označení obsahuje gen pro odolnost proti ampicilinu i proti tetracyklinu. Užije se plazmid, který se běžně dodává nebo se plazmid získá následujícím způsobem.

Kmen *E. coli*, který obsahuje plazmid pBR 322 se pěstuje při teplotě 31 °C v 1 litru živného bujónu stejného složení jako v prvním stupni za stálého třepání až do ukončení exponenciální růstové fáze. Potom se mikroorganismus dále třepe po přidání 150 µg/ml chloramfenikolu 15 hodin při téže teplotě. Tímto způsobem je možno plazmidovou DNA získat přibližně ve čtyřnásobném množství. Potom se bakteriální buňky izolují, rozruší se lysozymem nebo smáčedly neiontového typu a roztok s rozrušenými buňkami se odstřeďuje 30 minut při 48 000 g, supernatant se izoluje. Ze supernatantu se potom získá dvojnásobným odstředěním při použití hustotního gradientu chloridu cezného a ethidiumbromidu s následnou extrakcí fenolem a dialýzou proti tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 10 mmolů a pH 8,0 celkem 420 µg plazmidové DNA.

## 3) Včlenění raf-operonu z Pl raf do vektoru

Vždy 10 µg Pl raf DNA a DNA vektoru se zpracovává při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny působením restriční endonukleázy Sal I k úplnému rozštěpení molekuly DNA, potom se materiál zahřívá 5 minut na teplotu 65 °C.

Pl raf DNA se potom frakcionuje v 0,7 % agarózovém gelu elektroforézou, Fragment s relativní molekulovou hmotností 4 megadaltony se oddělí a po extrakci s fenolem a dialýze v tris-pufu s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 10 mmolů a pH 8,0 se získá ve formě roztoku.

Roztok takto získaného fragmentu Pl raf DNA se smísí s roztokem rozštěpeného vektoru pBR 322 a podrobí se za přidání ATP, dithioerythritu a chloridu hořečnatého po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C působení DNA ligázy z fágu 74. Takto získaný roztok obsahuje rekombinantní DNA.

4) Genetická transformace bakterií *E. coli* rekombinantní DNA, která obsahuje genetickou informaci pro  $\alpha$ -galaktosidázu

Kmen *E. coli* BMTU 2744, DSM 2093 se pěstuje v 50 ml živného bujónu za stálého třepání při teplotě 37 °C až do ukončení exponenciální růstové fáze. Buňky se izolují a uvedou se v suspenzi v roztoku chloridu vápenatého o koncentraci 50 mmolů v ledové lázni.

Tato suspenze se smísí s roztokem rekombinantní DNA ze stupně 3 a udržuje se 20 minut na ledové lázni, potom se zahřeje na 3 minuty na teplotu 37 °C. Buňky se přeočkují do živného bujónu a 40 minut se pěstují za třepání při teplotě 37 °C, čímž se dovrší transformační reakce. Potom se buňky izolují, promyjí a znovu uvedou v suspenzi. Malý podíl buněčné suspenze se nanese na agarovou plotnu, která obsahuje v 1 litru 10,5 g  $K_2HPO_4$ , 4,5 g  $KH_2PO_4$ , 1 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,5 g citrátu sodného x 2  $H_2O$ , 0,1 g  $MgSO_4$  x 7  $H_2O$ , 1 mg thiaminu, 2 g rafinózy, 25 mg ampicilinu a 15 g agaru při pH 7,2. Plotny se potom pěstují při teplotě 37 °C. Po 2 dnech pěstování vzniknou četné kolonie. Kolonie se odeberou, čistí a izolují.

Každá z takto získaných kolonií má schopnost využívat rafinózu jako jediný zdroj uhlíku a současně je odolná proti ampicilinu. Má tedy jiné vlastnosti, než původní kmen. To znamená, že se izolují pouze kolonie, které obsahují plasmid pBR 322, do kterého byl včleněn *Sal I* fragment z *P1* raf s genem pro  $\alpha$ -galaktosidázu.

Ze získaných kolonií se nejprve izoluje plazmidová DNA způsobem popsaným ve stupni 2. Plazmidy ze všech kolonií poskytují po zpracování působením restriční endonukleázy *Eco RI* nebo *Hind III* po analýze elektroforézou na agarózovém gelu dva fragmenty, které je možno zařadit podle původu kolonie hybridního plazmidu do dvou různých velikostí, celkově jsou však stejné.

Obě velikostní skupiny se vyskytují v poměru 1:1. Odlišné analytické údaje pro fragmenty obou velikostí jsou zřejmě výsledkem odlišného směru zařazení fragmentu po působení *Sal I* z *P1* raf zpět do pBR 322.

Pro další zpracování se volí plazmid z kolonie, která po působení restričního enzymu *Eco RI* nebo *Hind III* poskytuje menší druhý fragment, než plazmidy jiných kolonií. Tento plazmid se označuje pBT 100 BMTU 2741 bakterií DSM 2090, tyto bakterie, nesoucí uvedený plazmid mohou využívat rafinózu jako jediný zdroj uhlíku a produkuje všechny enzymy raf-operonu.

5) Vždy 10  $\mu$ g DNA plazmidu pBT 100 z BMTU 2741 DSM 2090 se zpracovává působením restriční endonukleázy *Hind III* nebo *Eco RI* při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny k rozštěpení molekul DNA. Potom se směs zahřívá 5 minut na teplotu 65 °C.

Takto získané roztoky plasmidové DNA se zředí a způsobem podle odstavce 3 podrobí působení T4-ligázy.

Potom se buňky kmene *E. coli* ze stupně 4 uvedou ve styk s roztokem renaturované DNA z posledního stupně transformační reakce. Malý podíl takto zpracovaného genu se nanese na Mac Conkeyovu plotnu (Difco) s obsahem 25  $\mu$ g/ml ampicilinu. Na plotně po transformaci plasmidovou DNA předem zpracovanou enzymem *Hind III* je možno pozorovat

přibližně 20 kolonií po pěstování 24 hodin při teplotě 37 °C, na plotnu s použitím DNA, štěpené enzymem Eco RI je možno za stejných podmínek pozorovat přibližně 30 kolonií. Poměr bílých kolonií k červeným je v prvním případě 4:1, ve druhém 3:1.

Červené kolonie jsou schopny odbourávat rafinózu, obsahují tedy ještě úplná rafinóza-operon, bílé kolonie rafinózu neodbourávají. Tyto kolonie však ještě produkují enzym  $\alpha$ -galaktosidázy, jak je možno prokázat v textu v bezbuněčném extraktu při použití p-nitrofenyl- $\alpha$ -galaktosidu ( $\alpha$ -PNPG) jako barevného substrátu při pěstování buněk bez přísady rafinózy v živném bujónu při teplotě 37 °C do stacionární polohy. Tyto buňky mají tedy odlišné vlastnosti, než původní organismus nebo buňky MBTU 2741 DSM 2090, transformované pBT 100.

Plazmid, při jehož použití se po předchozím působení enzymu Hind III na plazmid pBT 100 na Mac Conkeyho plotnách získají bílé kolonie, se označuje pBT 101, plazmid, získaný po působení enzymu Eco RI, se označuje pBT 102. Kmen E. coli s obsahem pBT 102 se označuje BMU 2742 DSM 2091.

#### 6) Získání $\alpha$ -galaktosidázy z kmenů s obsahem pBT 102 BMU 2742

V tabulce 1 jsou uvedeny pokusné výsledky s bezbuněčnými extrakty na obsah  $\alpha$ -galaktosidázy při použití  $\alpha$ -PNPG při teplotě 25 °C po vypěstování kmene MBTU 2742 s klonem ze stupně 5. Buňky se očkují v 10 ml živného bujónu v baňkách o obsahu 100 ml

zím kmenem BMU 2743 za stejných podmínek, avšak s přísadou 0,2 % rafinózy k živnému prostředí.

Jak je z tabulky zřejmé, mají extrakty kmene BMU 2742 ve srovnání s extrakty kmene BMU 2743 vyšší obsah  $\alpha$ -galaktosidázy.

T a b u l k a 1

| Kmen č.                | $\alpha$ gal | jednotky/mg <sup>*</sup> |
|------------------------|--------------|--------------------------|
| BMU 2742<br>(DSM 2091) | 10           |                          |
| 2743<br>(DSM 2092)     | 0,4          |                          |

\* mg rozpustné bílkoviny v surovém extraktu

Za těchto podmínek je možno prokázat ve známém kmenu E. coli BMU 2744 účinnost menší než 0,001 jednotek/mg.

## P ř í k l a d 2

Postupuje se způsobem podle příkladu 1, čímž se z fágu E. coli BMTU 2481 DSM 2101 způsobem podle příkladu 1 odstavec 3 odštěpí příslušný úsek působením enzymu Eco RI. Takto získaný prostředek je zdrojem DNA, která obsahuje genetickou informaci pro  $\alpha$ -galaktosidázu.

K získání vektoru DNA se z E. coli BMTU 2745 DSM 2100 způsobem podle příkladu 1 odstavec 2 získá DNA plazmidu pKT 230, pěstování buněk se však provádí přes noc při teplotě 37 °C za stálého provzdušňování v živném prostředí, ke kterému se nepřidává chloramfenikol.

Získaná plazmidová DNA se štěpí způsobem podle příkladu 1 odstavec 3 působením enzymu EcoRI.

Izolace fragmentu na DNA rozštěpeného pKT 230 se provádí způsobem podle příkladu 1 odstavec 3.

Takto získaný roztok rekombinantní DNA se transformuje v E. coli BMTU 2602 DSM 2102 způsobem podle příkladu 1 odstavec 4. Selekcce se provádí na agarové plotně s obsahem kanamycinu v koncentraci 25  $\mu\text{g/ml}$ . Tímto způsobem se získá přibližně 40 kolonií odolných proti kanamycinu, tyto kolonie se zkouší na citlivost na Streptomycin na koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ . Zjistí se přibližně 20 kolonií, zásadně citlivých na streptomycin, avšak odolných ještě proti koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$  streptomycinu. Způsobem popsaným v příkladu 1 se v těchto koloniích prokazuje tvorba  $\alpha$ -galaktosidázy. Takto získaný nový kmen 4. coli BMTU 2746 DSM 2103 je odolný proti kanamycinu, málo odolný proti streptomycinu a produkuje  $\alpha$ -galaktosidázu, těmito vlastnostmi se odlišuje od výchozího kmene BMTU 2602 DSM 2102, ostatní vlastnosti má shodné s uvedeným kmenem. Buněky tohoto nového kmene obsahují plazmid pBT 103, obsahující gen pro  $\alpha$ -galaktosidázu, jak je možno také prokázat tvorbou  $\alpha$ -galaktosidázy.

K přenosu pBT 103 z BMTU 2746 DSM 2103 na Pseudomonas putida BMTU 2749 DSM 2106 se nejprve smísí buňky kmene BMTU 2746 DSM 2103 a BMTU 2747 DSM 2104 v logaritmické fázi růstu, přičemž druhý z uvedených kmenů obsahuje přenosný plazmid RP4 a oba kmeny ve směsi se potom pěstují na agarové plotně standard II (Merck Darmstadt) s obsahem 20  $\mu\text{g/ml}$  streptomycinu a 20  $\mu\text{g/ml}$  tetracyklinu. V průběhu pěstování při teplotě 37 °C vyrostou přibližně 50 kolonií. Jedna z těchto kolonií se izoluje a nanesením na plotny s obsahem odpovídajících antibiotik je možno prokázat, že takto získaný nový kmen BMTU 2748 DSM 2105 je odolný proti 20  $\mu\text{g/ml}$  streptomycinu, 26  $\mu\text{g/ml}$  kanamycinu, 20  $\mu\text{g/ml}$  tetracyklinu a 50  $\mu\text{g/ml}$  ampicilinu. Uvedený kmen obsahuje plazmidy RP4 a pBT 103, jak je možno prokázat tvorbou  $\alpha$ -galaktosidázy.

Přenos plazmidu pBT 103 z BMTU 2748 DSM 2105 na Pseudomonas putida BMTU 2749 DSM 2106 se provádí smísením obou kmenů v logaritmické růstové fázi s následným pěstováním této směsi na agarové plotně standardu II (Merck Darmstadt) při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin s následným promytím buněk sterilním živným bujónem a nanesením na agarové plotny s obsahem selektivního živného bujónu standard II s obsahem 100  $\mu\text{g/ml}$  kanamycinu a 25  $\mu\text{g/ml}$  chloramfenikolu. Po dvou dnech vyrostou přibližně 20 kolonií,

tyto kolonie se čistí a identifikují jako kolonie, citlivé na tetracyklin, jde o *Pseudomonas putida* s obsahem plazmidu pBT 103, který obsahuje gen pro tvorbu  $\alpha$ -galaktosidázy BMTU 2750, DSM 2107. Průkaz tvorby  $\alpha$ -galaktosidázy se provádí stejně jako v příkladu 1.

### P ř í k l a d 3

#### Štěpení rafinózy v průběhu krystalizace v cukrovaru

45 ml odpadu s obsahem 802 mg rafinózy se zředí 45 ml vody. Roztok se upraví na pH 6,5. Tento roztok se v souběžném pokusu inkubuje s bezbuněčným extraktem a mimoto s buňkami kmene *E. coli* DSM 2091, které byly předem zpracovány působením toluolu, přičemž extrakt i buňky obsahují 57 jednotek  $\alpha$ -galaktosidázy.

Směs se nechá stát 60, 120 a 180 minut při teplotě 40 °C. Po této době se stanoví enzymatickým způsobem obsah galaktózy v roztoku a vypočítá se zbývající množství rafinózy v takto zpracovaném vzorku.

Po uvedených dobách zpracování odpovídá zbytkový obsah rafinózy v jednotlivých vzorcích o velikosti 459, 378 a 315 mg poklesu původního množství rafinózy v jednotlivých vzorcích na 57,2, 47,1 a 39,2 % výchozího množství. V následující tabulce 2 jsou shrnuty výsledky získané svrchu uvedeným způsobem.

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky pokusu, získané při použití 90 ml krystalizačního odpadu s obsahem 802 mg rafinózy po zpracování 57 jednotkami  $\alpha$ -galaktosidázy při teplotě 40 °C a pH 6,5.

T a b u l k a 2

| Doba zpracování<br>(min) | Obsah rafinózy<br>(mg) | % výchozí hodnoty |
|--------------------------|------------------------|-------------------|
| 0                        | 802                    | 100,0             |
| 60                       | 459                    | 57,2              |
| 120                      | 378                    | 47,1              |
| 180                      | 315                    | 39,2              |

# P Ř E D M Ě T   V Y N Á L E Z U

Způsob výroby  $\alpha$ -galaktosidázy kultivací mikroorganismů v živném prostředí s obsahem využitelných zdrojů uhlíku, dusíku a anorganických solí s následnou izolací a čištěním výsledného produktu, vyznačující se tím, že se ke zvýšení čistoty enzymu snížením obsahu invertázy izoluje z kmene *Escherichia coli* DSM 2092 DNA s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, tato DNA se rozštěpí endonukleázou *Sal* I za získání frakce DNA s molekulovou hmotností přibližně 4 megajednotky s obsahem genu pro  $\alpha$ -galaktosidázu, získaný fragment se inkubuje s vektorem pBR 322 po jeho rozštěpení restriktázou *Sal* I s obsahem genu pro odolnost proti ampicilinu, za přítomnosti DNA-ligázy fágu T4 za přítomnosti ATF, dithioerythritu a chloridu hořečnatého, získaná rekombinantní DNA se inkubuje s buňkami *E. coli*, transformované buňky se pěstují na živých prostředích s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy, vzniklé kolonie, odolné proti ampicilinu, se izolují a rozruší, ze získaného materiálu se izoluje DNA plasmidu s molekulovou hmotností 6,9 až 12,4 megajednotek, tato DNA se rozštěpí restriktázní endonukleázou *Hind* III a zpracuje působením DNA-ligázy, získané renaturované plasmidy pBT 102 se uvedou do suspenze s buňkami *E. coli*, transformované buňky se znovu kultivují na živném prostředí s obsahem 2 až 10 g/l rafinózy a ampicilinu, kolonie *E. coli*, využívající rafinózu se izolují a získané klony mikroorganismů se pěstují.