

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU 269 938

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ (11)

(21) PV 8304-87.R
(22) Přihlášeno 19 11 87

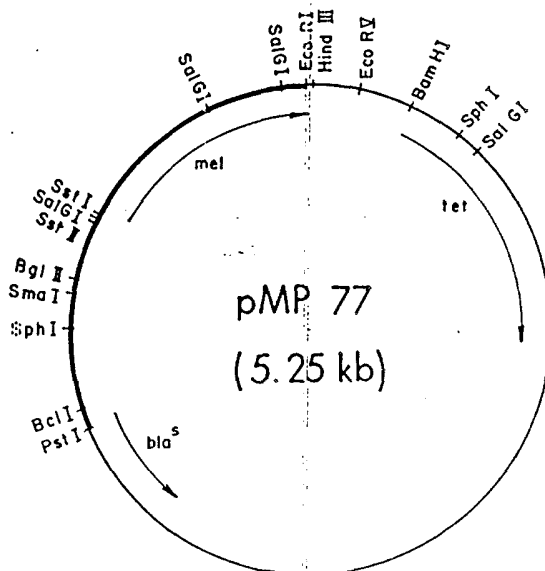
(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 12 02 91

(13) B1
(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 15/00

(75) Autor vynálezu PETŘÍČEK MIROSLAV ing.,
TICHÝ PAVEL RNDr. CSc., PRAHA

(54) Rekombinovaný plasmid pMP77

(57) Řešení se týká rekombinovaného plasmidu pMP77 charakterizovaného záměnou 648 bp PstI-EcoRI restričního fragmentu plasmidu pBR322 fragmentem PstI-EcoRI o velikosti 1640 bp ze streptomycetového plasmidu pJ622, který obsahuje kompletní sekvenci mel genu včetně jeho regulační oblasti kódující syntézu enzymu tyrozinázy v buňkách streptomycet. Možnosti využití rekombinovaného plasmidu jsou při konstrukci sekrečních vektorů pro klonování ve streptomycetách využitím proximální oblasti mel genu k přípravě fúzaných proteinů. Kmen Escherichia coli HB101 pMP77, ve kterém je rekombinovaný plasmid pMP77 uchován, je uložen v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J.E. Purkyně v Brně pod číslem 4006.



Vynález se týká rekombinovaného plasmidu pMP77, který se vyznačuje přítomností snadno vydělitelné genetické informace, kódující syntézu enzymu tyrozinázy v buňkách streptomycet.

Rozvojem genetického inženýrství vznikla rozsáhlá potřeba vyčlenit genetickou informaci na snadno manipulovatelný extrachromosomový replikon, který potom slouží jako vektorová molekula pro přenos genetické informace do zvolené hostitelské buňky, nebo jako snadný zdroj genetické informace při rekombinačních pokusech *in vitro*. Nejvhodnějšími extrachromosomovými molekulami DNA pro genetické inženýrství ve streptomycetách jsou ve streptomycetových buňkách se přirozeně 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, byl objev většiny z nich okamžitě patentově chráněn. Namátkou uvádíme objevy kryptických streptomycetových plasmidů patentované v letech 1983 až 1985.

Plasmid pOA29 ze *Streptomyces griseus*-jap. patent 5914593,
plasmid pOA19 ze *Streptomyces griseus*-jap. patent 59143588,
plasmid pSJ2 ze *S. jumonjinensis* - jap. patent 59213391 nebo
plasmid pATM 3 ze *Streptomyces castaneoglobisporus* - US patent 4518698.

K účinnému genetickému inženýrství ve streptomycetách je však nutné také provést označení kryptických plasmidů snadno selektovatelnými znaky. Takovými znaky mohou být geny kódující rezistenci k antibiotiku či syntézu snadno detekovatelného pigmentu.

Jedním z takových genů je gen kódující syntézu hnědého pigmentu melaninu na půdách obsahujících tyrosin. Gen se nazývá *mel* a byl poprvé získán klonováním restrikčních fragmentů kmene *Streptomyces antibioticus* (Katz et al. *J. Gen. Microbiol.* 129 : 2703, 1983). Znovuzískání *mel* genu z plasmidu pIJ702 je obtížné, neboť pIJ702 DNA musí být vysoce purifikována, aby při klonování *mel* genu nedocházelo ke kompetici s restrikčními fragmenty streptomycetového chromosomu, na kterých umístěné geny jsou bez problému expresovány ve streptomycetách. Naproti tomu klonování v *Escherichia coli* zajišťuje získání homologního materiálu (*mel* genu) a případná kontaminace restrikčními fragmenty nesoucími geny chromosomu *E. coli*, které ve své většině nejsou expresovány ve streptomycetách, je zanedbatelné.

Rekombinovaný plasmid pMP77 podle vynálezu je charakterizovaný záměnou 648 bp *Pst*I - *Eco*RI restrikčního fragmentu plasmidu pBR322 fragmentem *Pst*I-*Eco*RI o velikosti 1640 bp ze streptomycetového plasmidu pIJ622, který obsahuje kompletní sekvenci *mel* genu včetně jeho regulační oblasti kódující syntézu enzymu tyrozinázy v buňkách streptomycet a zároveň je charakterizován restrikční mapou znázorněnou na obr. 1. Silná čára značí 1640 bp velký fragment získaný štěpením streptomycetového plasmidu pIJ622. Slabá čára značí vektorovou molekulu pBR322.

Konstrukce rekombinovaného plasmidu pMP77

Z kmene *E. coli* HB101 (pBR322) byla izolována plasmidová DNA mnohokopiového plasmidu pBR322 (Bolivar et al., *Gene* 2: 95, 1977) o velikosti 4363 bp, kódující rezistenci k antibiotikům ampicilinu a tetracyklinu. DNA plasmidu pBR322 byla štěpena restrikčními endonukleázami *Eco*RI a *Pst*I, pro které je v molekule DNA plasmidu pBR322 jen jedno zásahové místo, přičemž zásahové místo pro restrikční endonukleázu *Pst*I je situováno v oblasti kódující rezistenci k antibiotiku ampicilinu.

Vyštěpený *Pst*I-*Eco*RI restrikční fragment plasmidu pBR322 o velikosti 648 bp byl nahrazen *Pst*I-*Eco*RI restrikčním fragmentem o velikosti 1640 bp získaným ze streptomycetového plasmidu pIJ622, který obsahuje kompletní sekvenci *mel* genu včetně jeho regulačních oblastí, umožňující produkci melaninu streptomycetovou buňkou. *Pst*I-*Eco*RI restrikční fragment plasmidu pIJ622 byl vpraven do korespondujících míst pBR322 plasmidu ligací *in vitro* pomocí enzymu DNA ligázy.

Po vytvoření rekombinovaných molekul plasmidu pMP77 byly tyto molekuly transformovány do kompetentních buněk kmene *E. coli* HB101 a buňky obsahující molekuly rekombinované pMP77 DNA byly detekovány na základě jejich citlivosti k antibiotikům ampicilinu a tetracyklinu na příslušných agarových médiích. Transformované buňky kmene *E. coli* HB101 plasmidem pMP77 byly selektovány jako ampicilin citlivé a tetracyklin rezistentní. 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 rostoucí kultuře hostitele.

K ověření celistvosti klonované genetické informace byla z klonů *E. coli* HB 101 obsahujících plasmid pMP77 izolována DNA rekombinovaného plasmidu pMP77 a podrobena restrikční analýze. Restrikční analýza prokázala, že rekombinovaná plasmidová DNA pMP77 izolovaná ze sledovaných klonů obsahuje celistvý 1 640 bp velký restrikční fragment streptomycetového plasmidu pIJ622, jehož orientace v molekule rekombinovaného plasmidu je určena komplementujícími kohesivními konci po štěpení plasmidů pBR322 a pIJ622 restrikčními endonukleázami PstI a EcoRI.

Rekombinovaný plasmid pMP77 umožňuje snadno získat ve velkém množství a vysoké čistotě fragment DNA kódující ve streptomycetách tvorbu hnědého pigmentu melaninu. Tvorba melaninu je snadno detekovatelným znakem a lze ji s výhodou použít k označení nově konstruovaných plasmidových i fágových vektorů pro klonování ve streptomycetách a proximální oblast *mel* genu k přípravě fúzovaných proteinů umožňujících transport sfúzovaného proteinu ze streptomycetové buňky.

Ligace 1 640 bp velkého PstI-EcoRI restrikčního fragmentu kódujícího syntézu melaninu ve streptomycetové buňce, do vektorové molekuly pBR322 dává možnost použít zvýšený počet restrikčních endonukleáz k vyštěpení restrikčního fragmentu s informací pro produkci melaninu ve streptomycetové buňce.

Rekombinovaný plasmid pMP77 je uložen v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně v kmeni *Escherichia coli* HB101 CCM 4006.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Rekombinovaný plasmid pMP77 charakterizovaný záměnou 648 bp PstI-EcoRI restrikčního fragmentu plasmidu pBR322 fragmentem PstI-EcoRI o velikosti 1 640 bp ze streptomycetového plasmidu pIJ622, který obsahuje kompletní sekvenci *mel* genu včetně jeho regulační oblasti kódující syntézu enzymu tyrosinázy v buňkách streptomycet a restrikční mapou, uložený v *E. coli* HB101 CCM4006.

1 výkres

