



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 570 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 2515/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 07. 26.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/558,040 1990. 07. 26. US

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/31
C 12 N 15/52
C 12 P 29/00

(40) A közzététel napja: 1992. 10. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 02. 28.

(72) Feltalálók:

Lotvin, Jason A., Union, New Jersey (US)
Ryan, Michael J., West Milford, New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:

American Cyanamid Co., Stamford, Connecticut
(US)

(74) Képviselő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Eljárás klór-tetraciklin és tetraciklin szintézisét kódoló DNS klónozására
alkalmazható bifunkcionális kozmidok előállítására**

KIVONAT

A találmány új, a tetraciklin, valamint a klór-tetraciklin bioszintézisét szabályozó izolált DNS klónozásában, valamint heterológ gazdaszervezetben, például Streptomyces lividansban való kifejezésére használható kozmidok előállítására vonatkozik. Az igényelt plazmidokat (kozmidokat) egy Escherichia coliban készült kozmid könyvtár átvizsgálásával állítják elő, azt a tu-

lajdonságukat használva a szelekcióra, hogy Streptomyces lividansban tetraciklin-rezisztenciát okoznak. Az LP²127 és LP²128 plazmidokat visszanyerik az ilyen tetraciklin-rezisztens Streptomyces lividans izolátumokból, amelyekről agaron és folyékony tenyészetek HPLC-elemzésével kimutatják, hogy a tetraciklin és a klór-tetraciklin szintézisét irányítják.

A találmány olyan új és hasznos kozmidok előállítására és alkalmazására vonatkozik, amelyek különböző klónozási és expressziós lehetőségeket biztosítanak. A találmány szerinti kozmidok például a klór-tetraciklin és tetraciklin teljes szintézisútját kódoló géncsoport klónozására és így a *Streptomyces aureofaciens*-ben végbemenő bioszintézisét kódoló DNS klónozására, valamint annak *Streptomyces lividans* gazdaszervezetben történő kifejezésére használhatók. Ezeknek a kozmidoknak a használata megnövekedett fermentációs termelési szintet eredményez, valamint új termékek, például antibiotikumok, fehérjék és/vagy polipeptidek új kiválogatási módszerét teszik lehetővé.

A klór-tetraciklin antibiotikumot és származékait (például a tetraciklin, demetil-klór-tetraciklin, demetil-tetraciklin) kereskedelmi mennyiségben *Streptomyces aureofaciens* szubmerz fermentációjával állítják elő (Dugar et al., 1948). A mikroorganizmussal több mint 30 éven át végzett ipari kutatás kifinomult fermentációs technikákat és táptalaj-összetételeket eredményezett, amelyek lehetővé tették a fermentációs kitermelés jelentős emelését (Goodman, 1985). A kitermelés emelésében elért említett eredményeket az tette lehetővé, hogy olyan *Streptomyces aureofaciens* mutánsokat izoláltak, amelyek több antibiotikum termelésére voltak képesek (Veselova, 1969). Ezeket a nagy termelőképességű mutánsokat elsősorban mutagenézis, majd ezt követő randszelekció útján izolálták a nagyobb termelőképességre végzett átvizsgálás alapján. Ugyanez a technika tette lehetővé az antibiotikum bioszintézisében blokkolt mutánsok izolálását, amelyek fontos eszközei voltak a klór-tetraciklin-képződés bioszintézis-útja felderítésének (McCormick, 1968). Ezen eredmények ellenére a klór-tetraciklin bioszintézisének szabályozását nem sikerült teljesen megérteni. A *Streptomyces* genetika területén elért legújabb fejlődés megteremtette annak lehetőségét, hogy tanulmányozzuk az iparilag fontos metabolitokat termelő mikroorganizmusok molekuláris genetikáját.

A kromoszomális markerek *Streptomyces* protoplasztok fúziója, majd ezt követő regenerálása útján végbemenő rekombinációjának igazolása (Hopwood et al., 1978; Baltz et al., 1981) döntő esemény volt az aktinomicéták genetikájában. A protoplasztfúziós technika kifejlesztése előtt a genetikai keresztezéseket csak néhány olajfajnál lehetett megbízhatóan elvégezni, amelyek igazolt konjugációs rendszerrel rendelkeznek (Hopwood, 1967), ma viszont a genetikai elemzést bármely olyan fajban el lehet végezni, amelyikből protoplaszt képezhető és abból a mikroorganizmus regenerálható. Még fontosabb, hogy a protoplasztok később ideális alanyoknak bizonyultak a plazmid DNS-sel végzett transzformációhoz, és ezzel megteremtődött annak lehetősége, hogy rekombináns DNS-kísérleteket lehessen végezni ezekben a mikroorganizmusokban (Bibb et al., 1978). Bizonyos antibiotikum- (tiostrepton, viomicin és neomicin) rezisztenciát kódoló gének izolálása lehetővé tette könnyen szelektálható klónozó vektorok konstruálását egyes természetes *Streptomyces* plazmidokból (Thompson et al., 1982).

Az egyik legelőször klónozott, az antibiotikum bioszintézisében részt vevő gén az O-metil-transzferáz volt, amely az undecil-prodigiozin (UDP) antibiotikum hatású pigment képződésében játszik szerepet (Feitelson et al., 1980). A gént azon az alapon azonosították, hogy képes volt az UDP bioszintézisútjában szereplő egyik ismert mutációt komplementálni. Az ezekben a korai, a bioszintézisgének izolálására irányuló erőfeszítésekben alkalmazott más technikák közé tartozott a mutációs klónozás, az OC31 fágot alkalmazva a metilenomicin esetében (Charter et al., 1983), a rekombináns klónok sib szelekciója, in vitro enzimvizsgálatokat alkalmazva az aktinomicin fenoxazin-szintetáz esetében (Jones et al., 1984), valamint a szulfonamid-rezisztencia, amelyet a kandicidin termelésében szerepet játszó p-amino-benzoészav-szintetáz kódol (Gil et al., 1983). A bialafosz bioszintézisgéneket a blokkolt mutánsok komplementálása alapján azonosították (Murakami et al., 1986).

Az aktinorodin-bioszintézisben szerepet játszó géneket a *Streptomyces coelicolor*-bioszintézisben blokkolt mutánsainak komplementálása alapján klónozták (Malpartida et al., 1984). Ez utóbbi esetben különböző osztályokba tartozó mutánsokat komplementáló, egymással átfedő két klónt kombináltak egyetlen plazmidban, amelyről később igazolták, hogy ha egy heterológ, *Streptomyces parvulus* gazdaszervezetbe juttatják be, akkor biztosítja ezen sejtekben az aktinorodin bioszintetizálóképességet.

További fontos megfigyelés volt az, hogy az antibiotikum-bioszintézisben szereplő gének a termelő mikroorganizmusban fizikailag kapcsolódnak az ugyanazzal az antibiotikummal szembeni rezisztenciát biztosító génhez. Tehát egy *Streptomyces griseus*-ból származó, streptomycin-rezisztenciát biztosító DNS-szekvenciáról igazolták, hogy egybefügg azzal a DNS-fragmenssel, amely komplementer bioszintézisblokkoló anyagokat kódol (Distler et al., 1985). Ugyanez volt megfigyelhető *Streptomyces fradiae* esetén, amikor bioszintézisgéneket oly módon azonosították, hogy egy kozmidkönyvtárat vizsgáltak át homológia szempontjából, olyan kevert oligonukleotidot használva hibridizációs próbaként, amelyet azon az alapon terveztek meg és állítottak elő, hogy a tilozin bioszintézisútjában szereplő utolsó enzim aminoterminálásának megfelelő DNS-szekvenciát képviselje (Fishman et al., 1989). Egy korábban klónozott tilozin-rezisztenciagénről (trB) kimutatták, hogy megtalálható ebben a DNS-szakaszban, amely kilenc különböző blokkolt mutánst komplementált (Baltz et al., 1988). A puromicin (Var2 et al., 1988), valamint a tetracenomicin esetében (Motamedi et al., 1987) a *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben kifejeződő antibiotikum-rezisztenciagénre való primer szelekció tette lehetővé, hogy azonosítsák az ugyanazon a klónozott DNS-fragmensben található antibiotikum-bioszintézisgéneket.

A nukleinsavpróbák alkalmazása segítette a bioszintézisgének izolálását. Ez a megközelítés azon a már meglévő információtömegre alapul, ami a bioszintézis-útra vonatkozik, vagy már korábban elvégzett klóno-

zási kísérletekből származik. Így például az előzőekben említett tilozin esetében egy olyan próbát készítettek, amely egy bioszintézisenzim részleges aminosavszekvenciáján alapult (Fishman et al., 1987). Hasonlóképpen a *Streptomyces clavuligerus*-ból az izopenicillin-szintetázgént azon az alapon klónozták, hogy azonosítottak egy klónt, amely hibridizált egy olyan oligonukleotid-próbához, amelyet az enzim N-terminális aminosavszekvenciája alapján konstruáltak (Leskiw, 1988). Az eritromicin bioszintézisében szereplő géneket azon az alapon azonosították, hogy egy korábban klónozott eritromicin-rezisztenciagén-próbával vizsgáltak végig egy kozmidkönyvtárat (Stanzak, 1986). Hasonlóképpen az oxitetraciklin bioszintézisében szereplő géneket úgy azonosították, hogy a hibridizációt vizsgálták mind egy korábban klónozott rezisztenciadeterminánshoz (Butler et al., 1989), mind pedig egy olyan oligonukleotidhoz, amely az anhidro-tetraciklin-oxigenáz bioszintézisenzim részlegesen felderített aminosavszekvenciájának megfelelő DNS-szekvencia alapján szintetizálódott (Binnie et al., 1989). A heterológ *actI* és *actIII* próbák alkalmazása tette lehetővé a *Streptomyces peuceticus*-ban az antraciklin-bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítását (Stutzman–Engwall et al., 1989).

Ezeket a technikákat önmagukban vagy egymással kombináltan alkalmazva vált lehetővé a teljes bioszintézisutak azonosítása vagy összeállítása, valamint néhány esetben a heterológ gazdaszervezetekben történő kifejeződés biztosítása. A bialafosz teljes bioszintézisútját a komplementáló aktivitásra és a bialafosz-rezisztencia heterológ kifejeződésére végzett szelekciók kombinációjával klónozták (Murakami et al., 1986). Jóllehet azt közölték, hogy a teljes bioszintézisutak egy lépésben sikeresen izolálták *Streptomyces lividans*-ban oly módon, hogy a bialafosz-rezisztenciára szelektáltak, nem említik, hogy a bioszintézisgéneket kifejezték volna. Az aktinorodin géncsoportjának összeállítását komplementáló klónokból, valamint kifejezését *Streptomyces parvulus*-ban a fentiekben tárgyaltuk (Malpartida et al., 1984).

Saccharopolyspora erythrae könyvtárból izoláltak egy olyan bifunkciós kozmidklónt, amely egy homológ eredetű eritromicinrezisztencia-determinánshoz hibridizál, és kimutatták, hogy eritromicin bioszintézisét irányítja, ha *Streptomyces lividans*-ba transzformálják (Stanzak et al., 1986). Egy olyan *Escherichia coli* kozmidklón, amely hibridizál mind egy oxitetraciklinrezisztenciagén-próbához, mind egy bioszintézisgén-próbához (anhidro-tetraciklin-oxigenáz), lehetővé tette az oxitetraciklin-bioszintézis géncsoportjának izolálását *Streptomyces rimosus*-ból (Binnie et al., 1989). Ezt követően egy *Streptomyces* plazmid vektorba történő szubklónozás lehetővé tette az oxitetraciklin *Streptomyces lividans*-ban való termelését.

A tetracenicintermelő törzsből két átfedő klónt azonosítottak azon az alapon, hogy *Streptomyces glaucescens* blokkolt mutánsokat komplementáltak velük, valamint azon az alapon, hogy tetracenicin-rezisztenciát biztosítottak *Streptomyces lividans*-ban (Mota-

meti et al., 1987). Abban az esetben, amikor külön-külön volt jelen a két fragmens *Streptomyces lividans*-ban, és együtt fermentálták őket, illetve amikor egyszerre voltak jelen ugyanabban a *Streptomyces lividans*-ban gazdaszervezetben, tetracenicin keletkezett. Egy *Streptomyces peuceoticus* DNS *Escherichia coli* könyvtárból *Streptomyces coelicolor actI* és *actIII* próbákhoz való hibridizálás alapján izolált bifunkciós klónokról kimutatták, hogy a pigmentált antibiotikum szintézisét irányították, ha *Streptomyces lividans*-ba juttatták be (Stutzman–Engwall, 1989).

Emellett a cefamicin C-termelés bioszintézisútját is izolálták (Chen et al., 1988). Ebben az esetben *Streptomyces lividans* random klónjait vizsgálták át egyenként a cefamicin C-termelő képességük alapján agarkorong fermentációs módszer alkalmazásával. A 30 000 átvizsgált *Streptomyces lividans* transzformánsból egy transzformánsról sikerült igazolni, hogy cefamicin C-t termel. J. T. Fayerman [Biotechnology, 4, 786–789 (1986)] általános stratégiákat ismertet *Streptomyces* által kódolt antibiotikumok klónozására és expresszáására *Streptomyces lividans*-ban.

A találmány szerinti megoldás hasznos génebeszleti eszközt biztosít tetraciklin- és klór-tetraciklin-termelésért felelős bioszintézisutakat kódoló DNS-szakaszok klónozására és/vagy expresszáására.

A mellékelt 1. ábra a bifunkciós kozmidvektor komponenseinek szerkezetét és a kozmidkarok előállításának módszerét ábrázolja. Az L és R kozmidvektorokat az A és B plazmidból állítjuk elő a 3. példában közölt részletek szerint. Az egyszeres vonalak a konstrukció *Escherichia coli* replikon részeit mutatják. Az A plazmidban az *Escherichia coli* rész a pBR322 plazmid 3,7 kb méretű EcoRI–SalI fragmenséből származik (Sutcliffe, 1979). A B plazmid az SCP2* plazmidnak egy 5,9 kb méretű EcoRI–SalI fragmensét tartalmazza [sraffozott rész], amely a replikációs funkciókat biztosítja az aktinomicétákban (Larson et al., 1986). Mindkét plazmidon található három, a pHC79 (Hohn et al., 1980) plazmidnak egy 700 bp méretű BglII–BstEII, cos-tartalmú fragmenséből származó random tapadó vég [üres rész]. Az A plazmidon lévő tiostrepton-rezisztenciagén [sötét rész] a pIJ702 plazmidból (Katz et al., 1983) kinyert 1,1 kb méretű, BclI fragmenséből származik. Az A plazmidon lévő 1,1 kb méretű spacer régió [pontozott rész] lambda-bakteriofág SacI fragmenséről származik (Sanger et al., 1982).

A 2. ábra az LP²127 és az LP²128 fizikai térképe. Restriktions térképezés alapján mindkét plazmidnak azonos a szerkezete, ezért egyetlen, mindkét plazmidra jellemző szerkezetet mutatunk be itt és a 3. ábrán. A vektorrészt dupla vonallal jelöljük; a TC/CTC bioszintézisrégiót egyetlen vonallal jelezzük. A *Streptomyces aureofaciens*-ből klónozott DNS 3,19 kb méretű; a vektor mérete 11,1 kb. Az említett vektorrégiók a pIBI–24 [vonalkázott rész] és a tiostrepton-rezisztencia [sraffozott rész]. A két, (+) jellel jelzett EcoRI restrikciós hasítási hely vektor eredetű, és a Sau3A–BglII kapcsolódási helyet veszik közre, amely a *Streptomyces aureofaciens* DNS és a vektor határvonalát jelenti.

A 3. ábra az LP²127 és LP²128 vektorban klónozott *Streptomyces aureofaciens* restrikciós endonukleázos térképe. Az LP²127-ben és az LP²128-ban klónozott 3,19 kb méretű DNS-t lineáris formában mutatjuk be. A térképet úgy rajzoltuk meg, hogy a vektorból származó EcoRI restrikciós hasítási helyeket mint bal és jobb oldali kiindulási, illetve befejező végeket tartalmazza. A restrikciós fragmensek méretét kilobázispárokban adjuk meg, és méretük az agaróz gélelektroforézis normális felbontási korlátain belül (körülbelül 500 bp) pontos.

A találmány tehát új kozmidokra vonatkozik, amelyek a tetraciklin és klór-tetraciklin teljes bioszintézis-útjának *Streptomyces aureofaciens*ből való klónozására és *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben való kifejezésére alkalmazhatók. Emellett ezeket a kozmidokat használjuk az ezen antibiotikumok (klór-tetraciklin és tetraciklin) termelésének bioszintézisútját kódoló izolált DNS-géncsoport klónozására és kifejezésére. A találmány továbbá olyan DNS-re vonatkozik, amely a szakirodalomban ismertett szigorú hibridizálási körülmények között hibridizál az LP²127 (ATCC 68357) és LP²128 (ATCC 68358) kozmidokban lévő, a klór-tetraciklin és tetraciklin bioszintézisútját kódoló DNS-csoporthoz. A találmány emellett ezen kozmidok említett antibiotikumok termelési szintjének emelésében, valamint olyan módszerekben való alkalmazására is vonatkozik, amelyeket a tetraciklin vagy klór-tetraciklin alógokat termelő mikroorganizmusok szelektálásában alkalmazunk oly módon, hogy az LP²127 és LP²128 kozmidok felhasználásával ilyen analógokat termelő nukleotidszekvenciákat vizsgálunk át és expresszáltatunk.

Abból a célból, hogy a bioszintézisgéneket izoláljuk, egy olyan, rekombináns *Streptomyces lividans* könyvtárból kiválasztott klónt alkalmazunk, amely tetraciklin-rezisztencia tulajdonságot fejez ki. A könyvtárat képező rekombináns kozmidokban lévő *Streptomyces aureofaciens* eredetű DNS-inszertek szélesszerűen nagyok, mivel az alkalmazott in vitro lambda-pakolórendszer korlátai olyan méretű kozmidmolekulákat igényelnek, amelyek 25–40 kb méretű DNS-inszerteket tartalmaznak, hogy életképes transzdukáló fágreszecskeket lehessen velük előállítani. Ha ebből a *Streptomyces aureofaciens* genom könyvtárból tetraciklin-rezisztens klónokat szelektálunk, akkor a kozmidklónoknak egy korlátozott méretű csoportját izoláljuk. Ezek közül számosról vagy az összesről feltételezhető, hogy a szelektált tetraciklin-rezisztencia-génhez kapcsolódó antibiotikum bioszintézisgéneket is tartalmaznak. Azok között, amelyek elég nagyok és megfelelő pozícióban vannak, található az az alcsoport, amely a teljes bioszintézisutat tartalmazza. Így a gének, illetve valójában az összes, a tetraciklin- és klór-tetraciklin-képződést kódoló gén klónozása lehetséges anélkül, hogy előzőleg ismert lenne a régió szerkezete vagy szekvenciája. Jóllehet voltak publikációk, amelyek a tetraciklin-rezisztencia determináns (Reynes et al., 1988) és egy bróm-peroxidáz (Vam Pee, 1988) *Streptomyces aureofaciens*ből történő klónozását írták le, ezek a publikációk semmiképpen nem terjedtek ki a

klór-tetraciklin bioszintézisgének vagy a teljes géncsoport izolálására.

A DNS izolálására használt módszer lényege a sejtek lizozimes emésztése ozmotikus pufferben, majd óvatos lizálása, a fehérjék extrahálása, és végül a nagy molekulatömegű DNS dúsítása és töményítése. Jóllehet a leírt módszer hatékony, a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy alternatív eljárások is alkalmazhatók, például olyanok, amelyeket Hopwood és munkatársai közöltek 1985-ben.

A példában használt összes DNS *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzsből származik, de a találmány semmiképpen nem korlátozódik erre az egy forrásra. Számos más, a tetraciklin osztályba tartozó antibiotikumot termelő *Streptomyces aureofaciens* törzs is használható a találmány szerinti eljárásban azonos eredménnyel. Ezek közé a *Streptomyces aureofaciens* törzsek közé tartoznak a mutáns törzsek, valamint alternatív vad típusú izolátumok, amelyek klór-tetraciklint, tetraciklint, 6-demetil-klór-tetraciklint, 6-demetil-tetraciklint, 7-klór-5a,11a-dehidrotetraciklint, 2-dekarboxamido-2-acetil-tetraciklint és a tetraciklin-vegyületcsalád más tagjait termelik. A találmány vonatkozik még a klór-tetraciklin, tetraciklin és tetraciklin-rokon vegyületek klónozására más, ilyen vegyületeket termelő mikroorganizmusokból, például *Streptomyces rimosus*ból, *Streptomyces avellanusból*, *Streptomyces psammoticusból*, *Actinomadura brunneaból* és *Dactylosporangium vescaból*.

A *Streptomyces aureofaciens* DNS-ét Sau3A restrikciós enzimmel részlegesen emésztjük, így 35 kb méretű tartományba eső nagyméretű DNS-fragmenseket állítunk elő, amelyeknek a végei az alkalmazott bifunkciós kozmidvektor karjaival homológok. Ebben az esetben az optimális emésztési körülményeket empirikusan határozzuk meg úgy, hogy számos emésztést végzünk, és a végtermékeket agaróz gélelektroforézissel elemezzük. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy más könyvtárkészítési módszer is alkalmazható. A példákban az *Escherichia coli* alkalmazása, valamint a lambda-fág pakolás miatt szükséges méretszelektáció nem korlátozza a találmányt, mivel más vektorok is alkalmazhatók. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy monofunkciós *Streptomyces* vektorok, például a pIJ922 (Lydiate et al., 1985) is alkalmazhatók a találmány szerinti eljárásban, azzal a korlátozással, hogy a könyvtár készítését és a plazmid kinyerését az aktinomicétákon belül kell végezni.

A példákban található lépések közé tartozik a kozmidkarok és a méret alapján frakcionált DNS ligálási termékeinek in vitro pakolása, *Escherichia coli* X2819T törzsbe való transzdukciója, a transzduktáns populációk izolálása, DNS kinyerése belőlük, és ezzel kozmidkönyvtár előállítása. Az alkalmazott módszereket leírtuk, de a találmány nem korlátozódik a példákban leírtakra. Más módszerek is alkalmazhatók anélkül, hogy az eredményekben eltérés lenne. Tehát alternatív módszerek is használhatók a ligálásra és az in vitro pakolásra, valamint más rekombináció-deficiens (recA)

Escherichia coli gazdaszervezetek is használhatók, valamint más módszerek a könyvtár amplifikálására (például szelektív táptalajon való növesztés), a plazmid izolálására, amelyeket mind közöltek a szakirodalomban [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)].

A példákban az ezt követő lépés az egyesített kozmid DNS-készítmény bejuttatása Streptomyces lividansba, sejtönyvtár készítése, ezt követően a könyvtár átvizsgálása olyan Streptomyces lividans transzformánsokra, amelyek 100 µg/ml tetraciklinre rezisztensek. Jóllehet sokkal munkaigényesebb módszer, de eljárhatunk úgy is, hogy a transzformánsokat közvetlenül replikalemez-készítési módszerrel vizsgáljuk át tetraciklin-rezisztencia szempontjából. Különböző tetraciklin-koncentrációkat használhatunk a vizsgálathoz, ami a forrásmikroorganizmus belső rezisztenciájától függ. Más tetraciklin-érzékeny, nem restriktív gazdaszervezetek, például a Streptomyces griseofuscus is alkalmazható Streptomyces lividans helyett.

Ezt követően kinyerjük a rekombináns plazmidot úgy, hogy plazmid DNS-t izolálunk a tetraciklin-rezisztens Streptomyces lividansból, majd az említett DNS-t in vitro pakoljuk, és transzdukcióval bejuttatjuk Escherichia coliba. Az ilyen transzdukánsokból izolált plazmid DNS-t restriktív enzim felteképezéssel jellemezzük szerkezetileg; így a példában ismertetett módszerrel izolált két plazmid, az LP²127 és LP²128 azonos szerkezetűnek bizonyult. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy más mikroorganizmusokból izolált hasonló DNS-régiók polimorfizmust mutathatnak a restriktív hasítási helyek alapján, de egy megfelelő méretű, tetraciklin-rezisztenciát biztosító DNS-fragmenstől elvárható, hogy az alábbiakban ismertetett tulajdonságokkal rendelkezzen.

A tetraciklin-rezisztencia plazmid eredetét azzal lehet igazolni, ha kimutatjuk, hogy a Streptomyces lividans LP²127 és LP²128 plazmidokkal kapott tiostrepton-rezisztens transzformánsai egyben tetraciklin-rezisztensek is. A tetraciklin antibiotikumok keletkezését agarlemezen oly módon lehet igazolni, hogy az említett tiostrepton- és tetraciklin-rezisztens Streptomyces lividans antibiotikus aktivitást mutat Escherichia colival szemben, de kevésbé hatékony egy tetraciklin-rezisztens Escherichia colival szemben.

Végül azt is igazoltuk, hogy a tetraciklinek szintézisét az LP²127 irányítja a Streptomyces lividans heterológ gazdaszervezetben. Ezt mind szilárd agar-táptalajon, mind folyékony táptalajon igazoltuk. Mind az eredetileg izolált tetraciklin-rezisztens Streptomyces lividans, mind a Streptomyces lividans LP²127-es transzformánsa termel tetraciklint és klór-tetraciklint olyan körülmények között, mint amilyen körülmények között ugyanez a termék izolálható a DNS forrásaként szolgáló Streptomyces aureofaciens ATCC 13899 mikroorganizmusból. Másrészt pedig egy olyan Streptomyces lividans transzformáns, amely csak a plazmidvektort tartalmazza a beépített DNS nélkül, nem termel antibiotikumot.

A találmány szerinti megoldást az alábbi példákkal szemléltetjük.

A tetraciklineknek heterológ gazdaszervezetben való termelése nem korlátozódik a példákban ismertetett fermentációs körülményekre vagy az elemzésre használt HPLC-analitikai rendszerekre, habár ezek hatékony elemzést tesznek lehetővé. A tetraciklinek fermentációs úton való előállítására és elemzésére számos eljárást írtak le, és ezekkel az alábbiakban ismertetett helyettesíthetők. Emellett jóllehet a Streptomyces lividans használjuk a példákban heterológ gazdaszervezetként, az antibiotikum bioszintézisének heterológ kifejezése számos aktinomicétában és más baktériumcsoportban is lehetséges, így például – nem korlátozó jelleggel – Bacillusokban, Corynebaktériumokban, Thermoactinomycesekben mindaddig, amíg ezek transzformálhatók a leírt, viszonylag nagy plazmidkonstrukciókkal. A transzformált mikroorganizmusok közé tartoznak például a Streptomyces griseofuscus és a Streptomyces ambofaciens, amelyekről ismert, hogy viszonylag nem restriktív tulajdonságúak.

1. példa

Streptomyces aureofaciens össz-DNS izolálása

A Streptomyces aureofaciens ATCC 13899 liofilezett tenyészetét 0,8 ml 1X szintetikus sóoldatban szuszpendáljuk (6 g Na₂HPO₄, 3 g K₂HPO₄, 0,57 g nátrium-citrát literenként), majd Bennett-agarra szélesztjük (1 g élesztőkivonat, 2 g NZ-amin A, 1 g húskivonat, 20 g D-glükóz, 20 g Bacto-agar literenként). Miután két napig 28 °C-on inkubáltuk, egy lemezen lévő sejteket 5 ml Tryptic Soy Broth-ba (Difco) átmosunk, röviden (körülbelül 10 mp) ultrahanggal kezeljük mikrocsúccsal ellátott Heat Systems Ultrasonics W200P berendezésben. Oltóanyagot úgy állítunk elő, hogy az ultrahanggal kezelt szuszpenzióból 2 ml-t 50 ml Tryptic Soy Broth-ba (TSB) juttatunk, majd 2 napig 28 °C-on, 200/perc fordulatszámmal rázatva inkubáljuk. Ezután az oltóanyagból 5 ml-t 100 ml, 2% glicinnel kiegészített TSB-be oltunk át, majd 48 óra hosszat 28 °C-on 200/perc fordulatszámmal rázatva inkubáljuk.

A sejteket centrifugálással kinyerjük (9000xg, 30 perc). A kiülepedett sejteket 200 ml P táptalajjal moszuk [100 g szacharóz, 0,2 g K₂SO₄, 2 ml nyomelem-oldat literenként; a nyomelemoldat összetétele: 40 mg/l ZnCl₂, 10-10 mg/l FeCl₃ × 6H₂O, CuCl₂ × 2H₂O, MnCl₂ × 4H₂O, Na₂B₂O₇ × 10H₂O és (NH₄)₆Mo₂₄ × 4H₂O]. A kiülepedett sejteket –20 °C-on lefagyasztjuk, majd felolvasztjuk és 10 mg/ml lizozimet tartalmazó (Sigma, háromszor átkristályosítva) 12 ml P⁺-oldatban szuszpendáljuk (összetétele: P táptalaj, kiegészítve 25 mmol/l TES-pufferrel, 25 mmol/l CaCl₂-vel, 10 mmol/l MgCl₂-vel, 3,7 mmol/l K₂HPO₄-gyel). A sejteket szobahőmérsékleten 2 óra hosszat inkubáljuk, amíg protoplasztok képződése nyilvánvaló nem lesz. 2,5 mg Proteinase K-t adunk hozzá, és az elegyet 15 percig 37 °C-on inkubáljuk. A lízist úgy érjük el, hogy hozzáadunk 10 ml 0,2 mol/l EDTA-t (pH=8,0), 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=8,0 összetételű oldatot, majd közvetlenül utána

2,4 ml nátrium-lauril-szulfátot (SDS). A viszkózus elegyet 50 °C-on inkubáljuk 60 percig, alkalmankénti gyengé rázogatással.

Ha a lízis teljesen lejátszódott, akkor 20 ml pufferezt fenolt (50 g fenol, 6,5 ml 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 1 mmol/l EDTA pH=8,0, 0,05 g 8-hidroxi-kinolin) adunk hozzá, az elegyet gyengén rázogatjuk, majd asztali centrifugán lecentrifugáljuk (1500xg, 30 perc). A felső vízes fázist összegyűjtjük, majd a fentiek szerint újra extraháljuk; az első extrakcióból származó fenolt visszaextraháljuk 20 ml 10 mmol/l TRIS-HCl pH=7,4, 1 mmol/l EDTA pH=8 összetételű (TE) pufferral. Az összegyűjtött vízes fázist ezután azonos térfogatú kloroformmal extraháljuk, a fentiek szerint centrifugáljuk, és 10 ml-es részletekben kémcsövekbe osztjuk szét. 1 ml 3 mol/l-es ammónium-acetátot (pH=5,0) adunk mindegyik csőhöz, majd a viszkózus oldat tetejére 10 ml hideg etanolt rétegezünk. A DNS-t óvatosan egy üvegbotra tekerjük, kétszer hideg etanollal öblítjük, majd egy éjszakán át 4 °C-on 8 ml TE-pufferben oldjuk. A jelen lévő összes nukleinsav (főleg DNS) mennyiségét az A₂₆₀ spektrofotometriás érték alapján becsüljük.

2. példa

A Streptomyces aureofaciens DNS részleges emésztése és a megfelelő méretű DNS dúsitása

A részleges emésztési körülményeket, amelyek a Streptomyces aureofaciens DNS 35 kilobázis méretű Sau3A emésztési termékeit eredményezik, empirikusan határozzuk meg. Egy sorozat reakcióelegyet állítunk össze, a kémcsövekbe körülbelül 25 µg DNS-t mérünk be 300 µliter reakcióelegyben (összetétele: 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS-HCl pH=7,4, 10 mmol/l MgCl₂), majd Sau3A restrikciós endonukleázt (New England Biolabs) adunk hozzá 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 enzimegység/µg DNS mennyiségben. A reakcióelegyeket 60 percig 37 °C-on inkubáljuk, majd 20 percen 65 °C-on kezeljük, végül jégbe helyezzük. 20-20 µliter kiveszünk és 0,5%-os agaróz géltre visszük, hogy ismert hosszúságú fragmensekkel (emésztetlen, valamint HindIII, illetve XhoI restrikciós enzimmel emésztett lambda-fág DNS) hasonlítsuk össze. A megmaradó térfogatban lévő DNS-t kicsapjuk oly módon, hogy egymás után 50 µliter 3 mólos ammónium-acetátot és 1 ml etanolt adunk hozzá, majd -20 °C-ra hűtjük. A kicsapott DNS-t centrifugálással ülepítjük (8800xg), 300 µliter 0,3 mólos ammónium-acetátban oldjuk, hasonlóképpen kicsapjuk, ülepítjük, mossuk etanollal, vákuumban szárítjuk, és a megszáritott üledéket végül 100 µliter TE-pufferben oldjuk. Az etidium-bromiddal festett, egy éjszakán át 1 volt/cm-rel futtatott agaróz gél vizsgálata azt mutatja, hogy a 0,05 egység Sau3A/µg DNS értéknél kapjuk a főleg a keresett 35 kb mérettartományba tartozó emésztési termékeket.

3. példa

Kozmidkarok készítése

A bifunkcionális kozmidvektorok komponenseit az A és B plazmidokból (1. ábra) nyerjük ki. Az A plaz-

mid a pIBI24-et tartalmazza, amely a replikációs origót, valamint egy ampicillin-rezisztenciagént biztosít ahhoz, hogy a vektor Escherichia coliban replikálódjon és szelektálható legyen. Ezzel a plazmiddal még egy tiostrepton-rezisztenciagén is rendelkezésre áll, hogy a plazmidot aktinomicétákban szelektálni lehessen, valamint a lambda bakteriofágból származó többszörös tapadási helyeket (cos) tartalmaz, amelyek az in vitro pakoláshoz szükségesek. A B plazmidot úgy terveztük, hogy tartalmazzon egy SCP2* replikációs origót az aktinomicétákban való fenntartás céljából, valamint több cos helyet.

Az A plazmidot Asp718 restrikciós enzimmel emésztjük, majd borjúbél alkalikus foszfatázzal (CIAP) defoszforilezzük. A DNS-t ezután chlorpannal és kloroformmal extraháljuk, etanollal kicsapjuk, és vákuumban szárítjuk. A DNS-t ezután feloldjuk, és BglII restrikciós enzimmel emésztjük. A B plazmidot Sall restrikciós enzimmel emésztjük, majd ezt követően CIAPPal kezeljük. Chlorpanos extrakció, etanolos kicsapás és vákuumban való szárítás után a DNS-t feloldjuk és BglII restrikciós enzimmel emésztjük.

A fentiekben említett emésztési reakciókat agaróz géltre visszük, majd egy éjszakán át elektroforetizáljuk. Az A plazmidból egy 6,0 kb méretű fragmenst, a B plazmidból egy 8,0 kb méretű fragmenst (amely tartalmazza a fentiekben leírt funkciók régiókat) elektroelúcióval izolálunk az agaróz gélről.

4. példa

A kozmidkarok ligálása a Sau3A restrikciós enzimmel emésztett genomialis DNS-hez és in vitro pakolás

A Streptomyces aureofaciens DNS Sau3A restrikciós enzimmel emésztett és méretre „ellenőrzött” genomialis fragmenseit kapcsoljuk a kozmidkarokkal in vitro ligálás útján. 4 µl Sau3A restrikciós enzimmel emésztett Streptomyces aureofaciens DNS-t, amely körülbelül 8 µg-nak felel meg, elegyítünk 1-1 µl 1-es, illetve 2-es kozmidkarral 10 µl ligáló elegyben, amelynek összetétele 66 mmol/l TRIS-HCl pH=7,4, 10 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l ATP, 10 mmol/l ditiotreitolt, valamint 40 egység (tapadósvég-egység) T4 DNS ligázzal (New England Biolabs). A ligáló elegyet 18 óra hosszat 11 °C-on inkubáljuk, majd in vitro pakolási eljárásnak vetjük alá oly módon, hogy a teljes 10 µl-es reakcióelegyet hozzáadjuk egy Packagene^R lambda DNS pakolórendszer-kivonathoz (Promega Biotec). Miután két óra hosszat inkubáltuk szobahőmérsékleten, 500 µl fág hígító puffert (PDB, összetétele: 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS-HCl pH=7,4, 10 mmol/l MgSO₄), majd 25 µl kloroformot adunk hozzá. Az elegyet vortexeljük, majd 4 °C-on tároljuk.

5. példa

Transzdukción Escherichia coliba, bifunkciós kozmidkönyvtár előállítás

Az in vitro pakolóreakcióban előállított fágkészítményt Escherichia coli X2819T törzsbe (R. Curtiss) transzdukáljuk azzal a céllal, hogy több ezer transzdu-

kánst kapjunk, amelyekből plazmid DNS-preparátum vagy bifunkciós kozmidkönyvtár állítható elő. Ebből a célból 0,3 ml, egy éjszakán át növesztett X2819T tenyészetet beoltunk 10 ml 20–10–5 táptalajba (20 g Trypton/l, 10 g élesztőkivonat/l, 5 g NaCl/l, 50 mg timidin/l), majd 2,5 óra hosszat 28 °C-on inkubáljuk. Négy részlet 0,8 ml-es X2819T sejtszuszpenziót elegyítünk 0,8 ml PDB-vel, majd mikrocentrifugában centrifugáljuk 5 percig teljes sebességgel. A kiülepített sejteket 100 µl PDB-ben szuszpendáljuk. Ezután mindegyikhez 50 µl, az in vitro pakolásból származó fágpreparátumot adunk. A fágok 37 °C-on, 25 perc alatt a sejtekre abszorbeálódnak. Mindegyik elegyhez 2 ml 20–10–5 táptalajt adunk, majd a szuszpenziót 28 °C-on két óra hosszat rázatjuk. Egytized ml-es alikvot részeket szélesztünk összesen 50 Petri-csészére, amelyek 100 mg/l ampicillinnel (nátriumsó, Sigma) kiegészített 20–10–5 agart tartalmaznak (20–10–5 táptalaj plusz 20 g/l Bacto agar). A lemezeket egy éjszakán át 28 °C-on inkubáljuk, majd három napig szobahőmérsékleten tartjuk. Öt jellemző lemez teleszámát meghatározzuk, ennek alapján összesen körülbelül 12 000 ampicillin-rezisztens telepet kaptunk.

Mindegyik lemezt 5 ml következő összetételű oldattal árasztjuk el: 50 mmol/l glükóz, 25 mmol/l TRIS-HCl pH=8,0, 10 mmol/l EDTA pH=8,0 (GTE). A telepeket egy steril szélesztőbottal szuszpendáljuk, majd az összes eluátumot egyesítjük, az így kapott sejtszuszpenziót 5 percig 9800xg-vel centrifugáljuk. Az ülepített sejteket 72 ml GTE-ben szuszpendáljuk. Ezután 8 ml, 40 mg/ml lizozimet tartalmazó GTE-t adunk hozzá. A lizozimes emésztést 20 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten. Ezután 160 ml lúgos SDS-oldatot (8 g/l NaOH, 10 g/l SDS) adunk hozzá, óvatos keverés után viszkózus lizátumot kapunk. Miután 20 percig inkubáltuk jégen, 80 ml 5 mol/l-es kálium-acetátot adunk hozzá, összekeverjük, és további 20 percig jégen tartjuk. A preparátumot ezután centrifugáljuk (9800xg, 20 perc), a felülúszót összegyűjtjük, 200 ml hideg izopropanolt adunk hozzá, összekeverjük, majd 15 percig jégen tartjuk, utána centrifugáljuk (9800xg, 20 perc). A nukleinsavüledéket 20 ml TE-pufferben oldjuk, amelyet 1% nátrium-szarkozináttal egészítettünk ki. 22 g cézium-kloridot adunk hozzá, feloldjuk benne, majd 2 ml 10 mg/l koncentrációjú etidium-bromid-oldatot adunk hozzá. A cézium-klorid–etidium-bromid elegyet megfelelő csövekbe töltjük, és Beckman 70.Ti rotorban centrifugáljuk 19 óra hosszat 55 000/perc fordulatszámmal. A csövek oldalát injekcióstűvel átlukasztva kinyerjük a plazmidcsíkot. A mintából eltávolítjuk az etidium-bromidot oly módon, hogy négyszer extraháljuk azonos térfogatú, vízzel telített butanollal. A vizes oldat térfogatát TE-pufferrel 6 ml-re egészítjük ki; 1 ml 3 mol/l-es ammónium-acetátot adunk hozzá, majd a plazmid DNS-t 18 ml etanollal kicsapjuk. Miután –20 °C-ra hűtöttük, a DNS-t centrifugáljuk (3400xg, 30 perc). Egy második kicsapást is végzünk hasonlóképpen, majd a DNS-t etanollal mossuk, vákuumban szárítjuk, 1 ml TE-oldatban oldjuk, és a DNS-koncentrációt spektrofotometriásan meghatározzuk.

6. példa

A plazmidkönyvtár bejuttatása Streptomyces lividansba, és Streptomyces lividans rekombináns sejtöknyvtár készítése

5 Az előző lépésben előállított bifunkciós plazmidkönyvtárat Streptomyces lividans TK54-be transzformáljuk, ahol a Streptomyces gének fenotípusos kifejeződése lejátszódik. Ebből a célból a Streptomyces lividans TK54 protoplasztokat állítunk elő standard módszerekkel (Hopwood et al., 1985). Röviden a Streptomyces lividans TK54 törzs 45 órás tenyészetéből (ezeket úgy állítjuk elő, hogy egy spóraszuszpenzió 0,2 ml-ét 10-szer 50 ml-es komplett YEME táptalajba oltjuk, amelynek összetétele: 3 g/l élesztőkivonat, 5 g/l pepton, 3 g/l malátaextraktum, 10 g/l glükóz, 340 g/l szacharóz, 5 g/l glicin, 5 mmol/l MgCl₂, 40 mg/l L-hisztidin és 40 mg/l L-leucin) a sejteket centrifugálásal nyerjük ki (9800xg, 15 perc). A sejtüledéket kétszer mossuk P táptalajjal, majd 60 ml P⁺-ban szuszpendáljuk. 14 mg/ml lizozimet tartalmazó P⁺ táptalajt adunk hozzá, majd a szuszpenziót vízfürdőben 90 percig 30 °C-on, 150/perc rázattal mellett inkubáljuk. Ezt követően 100 ml P⁺ táptalajt adunk hozzá, és a protoplaszt-suszpenziót steril, nem abszorbeáló gyapoton engedjük keresztül. A szűrletet centrifugáljuk (3800xg, 10 perc), majd a protoplaszt-üledéket felsuszpendáljuk és 100 ml P⁺ táptalajjal mossuk, végül egy második centrifugálás után 120 ml P⁺-ban szuszpendáljuk. A protoplaszt-készítményt 1,8 ml-es fagyasztócsövekbe osztjuk szét, majd –70 °C-on fagyasztjuk. A transzformálást úgy végezzük, hogy a Streptomyces lividans TK54 protoplaszt-preparátum 0,3 ml-es alikvot részait (körülbelül 1 × 10⁹ protoplaszt) hozzáadjuk 4 centrifugacsőben lévő 5 ml P⁺ táptalajhoz. A protoplasztot ülepítjük (3400xg, 10 perc), majd a visszamaradó térfogatban szuszpendáljuk. Ezután mindegyikhez hozzáadunk körülbelül 10 µg kozmidkönyvtár DNS-t, majd 0,5 ml 25%-os PEG 1000-et [1 g PEG 1000 (Sigma) 3 ml alábbi összetételű oldatban oldva: 25 g/l szacharóz, 2 ml/l 500x nyomelemoldat, 0,25 g/l K₂SO₄, 100 mmol/l CaCl₂, 50 mmol/l TRIS-maleát, pH=8,0]. Miután összekevertük és 30 másodpercig inkubáltuk, 5 ml P⁺-oldatot adunk hozzá. A protoplasztokat ezután ülepítjük, majd 1 ml P⁺-ban szuszpendáljuk. Egytized ml-es térfogatokat szélesztünk szárított R₂YE agarra (összetétele: 100 g/l szacharóz, 0,25 g/l K₂SO₄, 2 ml/l 500x nyomelemoldat, 2 g/l L-prolin, 20 g/l D-glükóz, 5 g/l élesztőkivonat, 0,05 g/l KH₂PO₄, 25 mmol/l TES, 25 mmol/l CaCl₂, 5 mmol/l MgCl₂, 20 g/l Bacto-agar) és 28 °C-on inkubáljuk. 24 óra elteltével mindegyik lemezt felülrétegezzük 3 ml lágy, 500 µg/ml tiostrepton tartalmazó R agarral (összetétele ugyanaz, mint az előző agarénak, de nem tartalmaz élesztőkivonatot, glükózt vagy KH₂PO₄-et, és csak 8 g Bacto-agart tartalmaz), majd további 12 napig inkubáljuk.

60 Körülbelül 9100 tiostrepton-rezisztens telepet kapunk. Ezeket összegyűjtjük oly módon, hogy lemosuk az agarlemezek felszínéről 3 db, 25–25 ml 20%-os glicerint tartalmazó csöbe. A telepek szuszpenzióit fragmentáljuk oly módon, hogy 90 másodpercig ultra-

hanggal besugározzuk, majd egyesítjük őket, és szétosztjuk 1,8 ml-es fagyasztócsövekbe és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztjuk. Ezt a fagyasztott preparátumot használjuk mint a *Streptomyces lividans* rekombináns sejt-könyvtárát.

7. példa

A Streptomyces lividans LL535, egy tetraciklin-rezisztens transzformáns izolálása, amelyből az LP²127 plazmid származik

Ezután a *Streptomyces lividans* rekombináns sejt-könyvtárát átvizsgáljuk, van-e benne tetraciklin-rezisztens sejt. A fragmentált *Streptomyces lividans* sejt-könyvtár egytized ml-es részeit 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklinnel kiegészített Bennett-agarra szélesztjük. Miután 5 napig $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk, két tetraciklin-rezisztens telepet detektálunk. Ezek közül az egyiket, az LL535-öt (először az LL529–2 jelzést kapta) választjuk ki a további elemzéshez. Az LL535 telepet friss Bennett-agarra szélesztjük, amely 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklint tartalmaz. A növekedést 3 napig $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett inkubálás után figyeljük meg. A kapott tenyészetet 50 ml TSB táptalajba mossuk bele, amelyet 10 g/l glükózzal (TBSG) és 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklinnel egészítünk ki, majd a szuszpenziót 3 napig $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk 200/perc fordulatszámmal rázatva. Az LL535 tenyészetet röviden kezeljük ultrahanggal, majd egy részét 1,8 ml-es fagyasztócsövekbe osztjuk szét, és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk. A megmaradó térfogatot használjuk arra, hogy négy darab 2 literes lombikban lévő YEME táptalajt oltsunk be vele (összetétele ugyanaz, mint amit az előzőekben közöltünk, de tartalmaz 16 g/l glicint, 25 mmol/l MOPS-t és 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklint, de nem tartalmaz MgCl_2 -t, L-hisztidint vagy L-leucint). A két nap után kinőtt sejteket ezután az előzőekben leírt módon dolgozzuk fel (plazmidot izolálunk belőle, azzal a különbséggel, hogy mindegyik alkalmazott térfogat négyszerese annak, amit az előző példában alkalmaztunk). A végső DNS-csapadékot 1 ml TE-pufferben oldjuk.

A *Streptomyces lividans* LL535 transzformánsból izolált plazmid DNS 10 μl -es részét használjuk in vitro pakolási reakcióban, majd ezt követően *Escherichia coli* X2819T törzsbe transzdukáljuk, a fentiekben ismertetett módszereket alkalmazva. Egy ampicillin-rezisztens transzdukánst (jele LL537) 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmazó 20–10–5 agar-táptalajra szélesztjük, majd az egynapos $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os inkubálás után kapott tenyészetet használjuk két 500 ml-es 20–10–5 táptalaj beoltására, amely 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmaz. Egy éjszakán át $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 200/perc fordulatszámmal ráztatjuk, majd a plazmid DNS-t az előzőekben leírt módon izoláljuk. Az izolált plazmid DNS jele LP²127; a plazmid becsült mérete 43 kilobázispár.

Restriktív enzimés térképet készítünk az LP²127 plazmidról restriktív enzimekkel végzett egyszeres és kétszeres emésztés alapján. A BamHI, BclI, BglII, BsmI, BstBI, ClaI, EcoRI, MluI, NcoI, SacI, ScaI, SphI és StuI (New England Biolabs) hasítási helyek helyzetét úgy határozzuk meg, hogy minden egyes

enzimmal külön-külön, majd az enzimek kombinációjával emésztést végzünk, amelyek a vektorrészen ismert helyeken hasítanak, például EcoRI, EcoRV vagy HindIII helyen. A restriktív endonukleázos emésztéseket úgy hajtjuk végre, hogy 1–2 μg plazmid DNS-t elegyítünk 4 μl 10x sóoldattal, amely optimális az alkalmazott restriktív enzimekre, majd körülbelül 5–40 egység enzimet adunk hozzá 40 μl össz-térfogatban. Az alkalmazott 10x sóoldat összetétele:

5 BamHI, EcoRV és SalI enzimekhez: 1,5 mol/l NaCl, 0,06 mol/l TRIS-HCl pH=8, 0,06 mol/l MgCl_2 ; BglII és ScaI enzimekhez: 1,0 mol/l NaCl, 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=7,4, 0,1 mol/l MgCl_2 ; BclI enzimhez: 0,75 mol/l KCl, 0,06 mol/l TRIS pH=7,4, 0,1 mol/l MgCl_2 ; BstBI enzimhez: 0,6 mol/l NaCl, 0,06 mol/l TRIS pH=7,4, 0,06 mol/l MgCl_2 ; ClaI enzimhez: 0,5 mol/l NaCl, 0,06 mol/l TRIS-HCl pH=8,0, 0,06 mol/l MgCl_2 ; EcoRI enzimhez: 0,5 mol/l TRIS-HCl pH=8, 0,1 mol/l MgCl_2 ; MluI enzimhez: 0,5 mol/l NaCl, 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=7,4, 0,1 mol/l MgCl_2 ; SacI enzimhez: 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=7,4, 0,1 mol/l MgCl_2 ; StuI enzimhez: 1,0 mol/l NaCl, 0,1 mol/l TRIS-HCl pH=8,0 és 0,1 mol/l MgCl_2 . A kétszeres emésztéseket olyan sóösszetétel mellett végzük, amely kompatibilis mindkét enzimmel a gyártó előírásai szerint. Az összes emésztési reakciót $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hajtjuk végre, kivéve a BclI restriktív enzimmel végzett emésztést, amelyet $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzünk, valamint a BsmI és BstBI restriktív enzimekkel végzett emésztéseket, amelyeket $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzünk. Az inkubálás ideje 60–120 perc. 5 μl iter festékkeveréket adunk hozzá (50% glicerin, 0,1 mol/l EDTA pH=8,0, 0,25% bróm-fenolkék) a reakció leállítására, valamint azért, hogy megkönnyítsük az agaróz géltre való felvitelt.

Az emésztés eredményét 0,8%-os agaróz gélen való elektroforézissel tesszük láthatóvá. A térképet az LP²127 közvetlen emésztésével, valamint a szubklónozott fragmensek emésztésével határozzuk meg. A BclI és ClaI hasítási helyek térképezését akadályozza a gazdaszervezet metilázképessége, ezért ezt az LP²258 plazmid alkalmazásával lehet kikerülni, amelyet úgy kapunk, hogy az LP²127 plazmidot in vitro pakoljuk, transzdukáljuk *Escherichia coli* GM119 (dam⁻ dcm⁻) törzsbe, majd a plazmid izolálását az előzőekben leírt módon végezzük. Az LP²127 plazmid fizikai szerkezetét a 2. ábrán mutatjuk be. Az LP²127 plazmidban klónozott 31,9 kb méretű *Streptomyces aureofaciens* DNS részletesebb restriktív endonukleázos hasítási térképét a 3. ábrán mutatjuk be.

8. példa

Streptomyces lividans LL529–TT2 tiostrepton-rezisztens, tetraciklin-rezisztens transzformáns izolálása, amelyből az LP²128 plazmid származik

A *Streptomyces lividans* LL529–TT2 izolálását az LL535-re leírt módon végezzük, azzal a különbséggel, hogy a rekombináns *Streptomyces lividans* sejt-könyvtárát 50 $\mu\text{g/ml}$ tiostrepton és 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklint tartalmazó Bennett-agarra szélesztjük. Miután 11 napig inkubáltuk, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végzett inkubálás után két rezisz-

tens telepet figyeltünk meg. Ezek közül az egyiket, az LL529–TT2-t mindkét antibiotikumot tartalmazó Bennett-agarra szélesztjük. Miután három napig inkubáltuk 28 °C-on, a kapott tenyészetet használjuk 50 ml, 10 µg/ml tiostreptont és 100 µg/ml tetraciklint tartalmazó TSB táptalaj beoltására. Ezután öt napig 28 °C-on rázatjuk 200/perc fordulatszámmal, majd plazmid DNS-t állítunk elő belőle miniprep-eljárással, amely hasonlít az előzőekben leírt plazmidizolálási eljárásra, egészen az izopropanolos kicsapási lépésig. Ebben az esetben azonban a használt térfogat csak egynegyede az előzőekben alkalmazottnak. Az izopropanolos kicsapás után a nukleinsavcsapadékot 1 ml TE-pufferben oldjuk, majd azonos térfogatú chlorpanggal (500 g fe-nolt és 0,5 g 8-hidroxi-kinolint tartalmazó, 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l nátrium-acetát, pH=6,0 összetételű oldattal egyensúlyba hozott, továbbá 500 ml kloroformot tartalmazó oldattal) kevertetés közben extraháljuk, majd mikrocentrifugában centrifugáljuk teljes sebességgel, 3 percig. A vizes fázist újra extraháljuk chlorpanggal, majd hasonlóképpen kloroformmal. A végső vizes fázist összegyűjtjük, 100 µl 3 mol/l-es ammónium-acetátot és 1,8 ml etanolt adunk hozzá a nukleinsav kicsapására. –20 °C-ra hűtjük, majd a kicsapási reakcióelegyet lecentrifugáljuk (8800xg, 30 perc). A kapott csapadékot 300 µl 0,3 mol/l ammónium-acetátban oldjuk, hasonlóképpen kicsapjuk 1 ml etanollal, majd centrifugáljuk. A kapott csapadékot etanollal öblítjük, vákuumban szárítjuk, majd 1 ml TE-pufferben oldjuk.

Az LL529–TT2 plazmid minipreparátumot használjuk az előzőekben leírt in vitro pakolás végrehajtására. Egy ampicillin-rezisztens transzdukánst (jele LL538) használunk a plazmid kinyerésére, amint azt az LL535 plazmidnál már leírtunk. A kapott tisztított plazmid jele LP²128. A 20 különböző restriktív endonukleázzal való emésztés után kapott restriktív mintázat az LP²127 esetében kapottal hasonlítjuk össze, az emésztési termékeket ugyanazon a gélelektroforézis gélen elemelve. Az LP²128 esetében kapott gélmintázat azonos azzal, amelyet az LP²127 esetében látunk, jelezve, hogy a két plazmid egyforma. Tehát a 3. ábra mind az LP²128, mind az LP²127 szerkezetét leírja.

9. példa

Az LP²127 és LP²128 plazmidok plazmidhoz kötött tetraciklin-rezisztenciát biztosítanak

Annak igazolására, hogy a megfigyelt tetraciklin-rezisztenciák plazmidon kódolt természetűek, az LP²127 és LP²128 plazmidokat *Streptomyces lividans* protoplasztokba transzformáljuk, és a kapott tiostrepton-rezisztens transzformánsok tetraciklin-rezisztenciáját vizsgáljuk. A *Streptomyces lividans* protoplasztok előállítását és transzformálását, majd ezt követően a tiostrepton-rezisztens transzformánsok szelekcióját az előzőekben ismertetett módon végezzük. Az LP²127 és az LP²128 plazmidból 10-10 µg-ot, míg a tetraciklin-érzékeny kontrollból, az LP²111-ből 5 µg-ot transzformálunk (ez utóbbi vektor tartalmazza a

pIBI24-et az SCP2* replikációs és stabilitási régiót, valamint a tiostrepton-rezisztenciagént). Mindegyik plazmidból 150 transzformánst vizsgálunk át oly módon, hogy steril fogpiszkálóval két különböző Bennett-agarra oltjuk át, amelyek 100 µg/ml tetraciklint, illetve 25 µg/ml tiostreptont tartalmaznak.

A telepeket 5 napig 28 °C-on végzett inkubálás után vizsgáljuk át. Az összes LP²111 transzformánsból származó tiostrepton-rezisztens transzformáns tetraciklin-érzékenyek, míg az LP²127-ből, illetve az LP²128-ből kapott transzformánsok 80%-a tetraciklin-rezisztensnek bizonyult.

10. példa

*Klór-tetraciklin és tetraciklin előállítása LP²127 és LP²128 plazmidot tartalmazó *Streptomyces lividans*szal*

Egy egész sorozat kísérletet végzünk annak igazolására, hogy az LP²127 és az LP²128 a klór-tetraciklin (CTC) és a tetraciklin (TC) bioszintézisét irányítja a *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben. Az eredeti izolátum, az LL535, valamint az LP²127 plazmiddal transzformált *Streptomyces lividans* termel CTC-t és TC-t mind agaron, mind folyékony táptalajon végzett fermentációban, míg az inszertált DNS-szakasz nélküli plazmid klónozó vektort tartalmazó *Streptomyces lividans* nem termel tetraciklin-antibiotikumot. Az LP²128 *Streptomyces lividans*ba transzformálva egy olyan antibiotikum termelését irányítja, amelynek *Escherichia coli* elleni aktivitása alapján arra lehet következtetni, hogy biológiai tulajdonságai alapján tetraciklin-antibiotikum. Az *S. lividans* gazdaszervezet nem mutat ilyen aktivitást.

Először az LL535 *Streptomyces lividans* törzset, egy tiostrepton-rezisztens izolátumot, amelyből az LP²127-et izoláltuk, Bennett-agarra szélesztjük (amely 25 µg/ml tiostreptont tartalmaz) olyan hígításban, hogy körülbelül 200 telep keletkezzen lemezenként. Az LL531 *Streptomyces lividans* törzset (amely a korábban ismertetett LP²111 plazmidvektort tartalmazza) hasonló módon szélesztjük körülbelül 400 telep per lemez sűrűségben.

Miután 8 napig inkubáltuk 30 °C-on, az LL535 telepek sárga fluoreszcenciát mutatnak, ha 366 nm-es UV-fénnyel sugározzuk be őket. Ez jellemző a tetraciklint termelő tenyészetekre, és nem figyelhető meg az LL531-nél.

Ezután mindegyik lemezen megvizsgáljuk a biológiai aktivitást oly módon, hogy a telepeket 5 ml lágy 20–10–5 agar táptalajjal (8 g/l Bacto-agar) rétegezzük le, amelyet 0,1 ml, egy éjszakán át növesztett vizsgáló mikroorganizmussal oltottunk be. A vizsgáló mikroorganizmus a *Bacillus subtilis* T1235 törzs, amely az University of Leicesterről, dr. Eric Cundliffe-től szerezhető be. A T1235 egy tiostrepton-rezisztenciát kódoló plazmidot tartalmaz, emellett használjuk még az *Escherichia coli* MM294 törzset, valamint a pBR322 plazmidot tartalmazó MM294 törzset (a plazmid tetraciklin- és ampicillin-rezisztenciát biztosít) (ATCC 33625). A törzseket egy éjszakán át növesztjük 37 °C-on 10 ml 20–1–5 táptalajban, amelyet a T1235 esetében

25 µg/ml tiostreptonnal, az MM294/pBR322 esetében pedig 100 µg/ml ampicillinnel egészítettünk ki. Rétegezés után a lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáljuk, majd ezután megvizsgáljuk a rétegező mikroorganizmus pázsitjában keletkező gátlási zónákat. Az LL531 törzs nem ad gátlási zónákat az *Escherichia coli* törzsekben, és csak néhány telep ad kis, lokalizált zónákat a Gram-pozitív T1235 törzssel. Mindegyik utóbbi telep vörös pigmentet termel, ami az aktinorodin kifejeződésére jellemző; a *Streptomyces lividans*ról ismert, hogy ezt az általában nem működő bioszintézisutat megfigyelhető frekvenciával fejezi ki (Horinouchi et al., 1989). Ezzel szemben az LL535 törzs egy olyan antibiotikum termelését mutatja, amely teljesen gátolja a T1235 és MM294 törzsek növekedését a rétegező agarban. (A későbbi kísérletekben, amikor lemezenként kevesebb telepet vizsgáltunk, kis, jól körülhatárolt és nagyon nagy gátlási zónák is találhatóak az ezen vizsgált mikroorganizmusok megfelelően szeparált telepei körül. Ebben a kísérletben az LL535 telepeket MM294/pBR322 törzssel rétegezve diszkrét zónákat kapunk a telepek körül. Ez az MM294/pBR322-vel megfigyelt csökkent aktivitás annak tulajdonítható, hogy a pBR322 plazmidon kódolt tetraciklin-rezisztencia csökkent érzékenységet eredményez.

Az agaron keletkező antibiotikumot úgy jellemezzük, hogy az egybefolyó növekedést adó lemezek agarblokkjait extraháljuk. Az LL535 és LL531 törzsek 25 µg/ml tiostreptonot tartalmazó Bennett-agaron nőnek; a *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzs, az LP²127 és LP²128 plazmidban lévő klónozott DNS-törzs antibiotikumot nem tartalmazó agaron nő. Miután öt napig növesztettük 30 °C-on, 2,5 cm-es agarblokkokat vágunk ki, és 3 ml savas metanolban eldörzsöljük (összetétele: 11,5 ml koncentrált kénsav 4 liter metanolban). Öt percig vortexeljük, majd a felülúszót egy Acro LC-25 membránszűrőn szűrjük át és HPLC-elemzésnek vetjük alá.

A HPLC-elemzéseket izokratikus körülmények között végezzük C18 fordított fázisú oszlopon, amelyben a mobil fázis oxalát puffer, pH=2,9, amely 22% DMF-et (N,N-dimetil-formamid) tartalmaz. Az áramlási sebesség 1 ml/perc, és az eluátumot 365 nm-en vizsgáljuk.

Standardként autentikus tetraciklint és klór-tetraciklint használunk.

A HPLC-kromatogramok azt mutatják, hogy az LL535 és az ATCC 13899 olyan anyagokat termelnek, amelyeknek a retenciós idejük azonos a tetraciklin és a klór-tetraciklin retenciós idejével. Az LL531 kivonatai nem mutatják ezeket a csúcsokat.

A *Streptomyces lividans*ból az LP²127, LP²128, valamint az LP²63 (ez egy olyan plazmidvektor, amely a pIBI24-et tartalmazza a pIJ702 plazmid SacI hasítási helyére klónozva) plazmidok transzformálásával kapott tiostrepton-rezisztens transzformánsokat hasonló módon elemezzük az antibiotikum-termelés szempontjából, a T1235 és MM294 vizsgált mikroorganizmusokkal való rétegezéssel. Az LP²127 és LP²128 transzformánsok olyan antibiotikumok termelődését mutatják, amelyek aktívak mindkét vizsgált mikroorganizmussal

szemben, míg az LP²63 transzformánsok nem mutatják ezt a termelődést, ezzel jelezve, hogy az antibiotikum-termelő képesség az LP²127 és LP²128 plazmidokban lévő *Streptomyces aureofaciens* DNS-től függ.

5 Folyékony táptalajon végzett fermentációkat is végzünk, hogy így is megerősítsük azt, hogy az LP²127 plazmidot tartalmazó *Streptomyces lividans* által termelt antibiotikumok a tetraciklin és a klór-tetraciklin. Az ATCC 13899-ből, az LL531-ből és az LL873-ből (ez utóbbi egy LP²127-tel transzformált *Streptomyces lividans*) ötven ml-es oltótenyészeteket készítünk S táptalajban (összetétele: 4 g/l élesztőkivonat, 4 g/l pepton, 10 g/l glükóz, 0,5 g/l MgSO₄ × 7H₂O), amely 5 µg tiostreptonot tartalmaz; az ATCC 13899-et tiostrepton nélkül növesztjük. Három napig inkubáljuk 30 °C-on, majd 15 0,5 ml-t átviszünk a tenyészetből 25 ml-es táptalajokba, amelyek 10 µg/ml tiostreptonot tartalmaznak (kivéve az ATCC 13899-et, ennek a táptalajában nincs antibiotikum). Miután tíz napig inkubáltuk 28 °C-on, a fermentálébből 0,5 ml-es térfogatokat 4,5 ml savas metanollal hígítunk, az előzőekben leírt módon feldolgozzuk, majd HPLC-elemzésnek vetjük alá. Az LL531 törzs nem eredményez tetraciklin-vegyületeket, míg az ATCC 13899, LL535 és LL873 törzsek 37, 56, illetve 6 µg/ml klór-tetraciklint termelnek. Ennek a három törzsnek a fermentlevében kis mennyiségű tetraciklin is kimutatható.

30 Az LL537 és LL538 *Escherichia coli* törzsek azok az *Escherichia coli* transzdukánsok, amelyekből az LP²127 és LP²128 plazmidokat izoláltuk. Ezeket a törzseket a Budapesti Egyezmény alapján letétbe helyeztük az American Type Culture Collectionnél (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland), letéti sorszámuk az alábbi: az LP²127-et tartalmazó *Escherichia coli* X2818T törzs (LL537) letéti száma 35 ATCC 68537, az LP²128 plazmidot tartalmazó *Escherichia coli* X2818T törzs (LL538) letéti száma ATCC 68538. Mindkettőt 1990. július 10-én helyeztük letétbe, és legálisan bárki számára hozzáférhető.

Az alábbiakban összefoglaljuk a leírás szövegében említett irodalmi hivatkozásokat.

BIBLIOGRÁFIA

1. Baltz, R. H. and P. Matsushima, 1981, Protoplast fusion in *Streptomyces*: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.*, 127:137–146.
2. Baltz, R. H. and E. T. Seno, 1988, Genetics of *Streptomyces fradiae* and tylosin biosynthesis. *Ann. Rive. Microbiol.*, 42:547–574.
3. Bibb, M. J., J. M. Ward, and D. A. Hopwood, 1978, Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* protoplasts at high frequency. *Nature (London)*, 274:398–400.
4. Binnie, C., M. Warren, and M. J. Butler, 1989, Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 171:887–895.
5. Butler, M. J., E. J. Friend, I. S. Hunter, F. S. Kaczmarek, D. A. Sugden and M. Warren, 1989, Molecular cloning of resistance genes and

- architecture of a linked gene cluster involved in biosynthesis of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *Mol. Gen. Genet.*, 215:231–238.
6. Chater, K. F. and C. J. Bruton, 1983, Mutational cloning in *Streptomyces* and the isolation of antibiotic production genes. *Gene*, 26:67–78.
 7. Chen, C. W., H.-F. Lin, C. L. Kuo, H.-L. Társai and J. F.-Y. Társai, 1988, Cloning and expression of a DNA sequence conferring cephamycin C production. *Bio/Technology*, 6:1222–1224.
 8. Cox, K. L. and R. H. Baltz, 1984, Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.*, 159:499–504.
 9. Distler, J., K. Mansouri and W. Piepersberg, 1985, Streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* II. Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, 30:151–154.
 10. Duggar, B. M., 1948, Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51:171–181.
 11. Feitelson, J. S. and D. A. Hopwood, 1983, Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 190:394–398.
 12. Fishman, S. E., K. Cox, J. L. Larson, P. A. Reynolds, E. T. Seno, W.-K. Yeh, R. Van Frank and C. L. Hershberger, 1987, Cloning genes for the biosynthesis of a macrolide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:8248–8252.
 13. Gil, J. A. and D. A. Hopwood, 1983, Cloning and expression of a p-aminobenzoic acid synthetase gene of the candicidin-producing *Streptomyces griseus*. *Gene*, 25:119–132.
 14. Goodman, J. J., 1985, Fermentation and mutational development of the tetracyclines. p. 5–57. In: J. J. Hlavka and J. H. Boothe (eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 78, The Tetracyclines, Springer-Verlag, Berlin.
 15. Hohn, B. and J. Collins, A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*, 11:291–298.
 16. Hopwood, D. A. and H. M. Wright, 1978, Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.*, 162:307–317.
 17. Hopwood, D. A., 1967, Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol. Rev.*, 31:373–403.
 18. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and H. Schrempf, 1985, Genetic manipulation of *Streptomyces* – a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
 19. Horinouchi, S., F. Malpartida, D. A. Hopwood and T. Beppu, 1989, afsB stimulates transcription of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.*, 215:355–357.
 20. Jones, G. H. and D. A. Hopwood, 1984, Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.*, 259:14 151–14 157.
 21. Katz, E., C. J. Thompson and D. A. Hopwood, 1983, Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.*, 129:2703–2714.
 22. Larson, J. L. and C. L. Hershberger, 1986, The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid*, 15:199–209.
 23. Leskiw, B. K., Y. Aharonowitz, M. Mevarech, S. Wolfe, L. C. Vining, D. W. S. Westlake and S. E. Jensen, 1988, Cloning and nucleotide sequence determination of the isopenicillin N synthetase gene from *Streptomyces clavuligerus*. *Gene*, 62:187–196.
 24. Lydiate, D. J., F. Malpartida and D. A. Hopwood, 1985, The *Streptomyces* plasmid SCP2*: its functional analysis and development into useful cloning vectors. *Gene*, 35:223–235.
 25. Malpartida, F. and D. A. Hopwood, 1984, Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature (London)*, 309:462–464.
 26. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook, 1982, *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 27. McCormick, J. R. D., 1968, Point blocked mutants and biogenesis of tetracyclines. p. 163–173. In: G. Sermonti and M. Alecevic (eds), *Genetics and Breeding of Streptomyces*. Yugoslav. Acad. Sci. and Arts, Zagreb.
 28. Motamedi, H. and C. R. Hutchinson, 1987, Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:4445–4449.
 29. Murakami, T., H. Anzai, S. Imai, A. Satoh, K. Nagaoka and C. J. Thompson, 1986, The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.*, 205:42–50.
 30. Reynes, J. P., T. Calmels, D. Drocourt and G. Tiraby, 1988, Cloning, expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a tetracycline-resistance gene from *Streptomyces rimosus*. *J. Gen. Microbiol.*, 134:585–598.
 31. Sanger, F., A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill and G. B. Peterson, 1982, Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.*, 162:729–773.
 32. Stanzak, R., P. Matsushima, R. H. Baltz and R. N. Rao, 1986, Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythreus*. *Bio/Technology*, 4:229–232.

33. Stutzman-Engwall, K. J. and C. R. Hutchinson, 1989, Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:3135–3139.
34. Sutcliffe, J. G., 1979, Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43:77–90.
35. Thompson, C. J., T. Kieser, J. M. Ward and D. A. Hopwood, 1982, Physical analysis of antibiotic-resistance genes from *Streptomyces* and their use in vector construction. Gene, 20:51–62.
36. van Pee, K.-H., 1988, Molecular cloning and high-level expression of a bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens* Tu24. J. Bacteriol., 170:5890–5894.
37. Vara, J. A., D. Pulido, R. A. Lacalle and A. Jimenez, 1988, Two genes in *Streptomyces alboniger* puromycin biosynthesis pathway are closely linked. Gene, 69:135–140.
38. Veselova, S. I., 1969, Combined effect of nitrous acid, ultraviolet light, streptomycin and chlortetracycline on *Actinomyces aureofaciens*. Antibiotiki, 14:698–702.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás LP²127 és LP²128 kozmidok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az LP²127 kozmidot az ATCC 68357 számon deponált *E. coliból*, míg az LP²128 kozmidot az ATCC 68358 számon deponált *E. coliból* izoláljuk.

2. Eljárás tetraciklin és klór-tetraciklin termelésére, *azzal jellemezve*, hogy egy prokarióta gazdaszervezetet egy, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított kozmiddal transzformálunk, és a transzformánsokat a tetraciklin és klór-tetraciklin kifejezéséhez alkalmas körülmények között tenyésztjük, és prokarióta gazdaszervezetként *E. colit*, *Streptomyces lividanst*, *S. griseofuscust*, *S. ambofuchsust* vagy egy *Actinomyces*, *Bacillus*, *Corinebacterium* vagy *Thermoactinomyces* törzset alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy prokarióta gazdaszervezetként *Streptomyces lividanst* alkalmazunk.

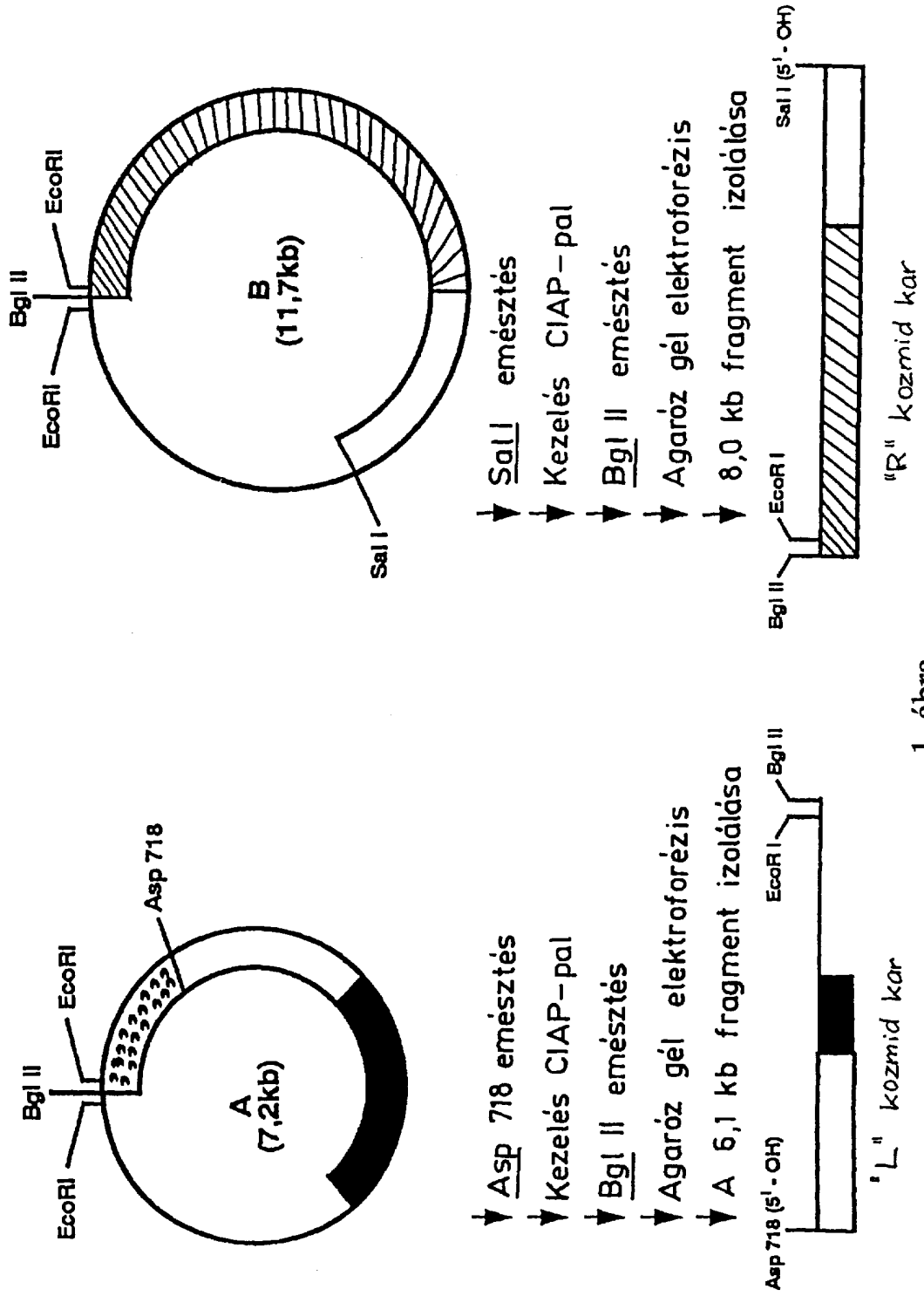
4. Eljárás tetraciklin és klór-tetraciklin antibiotikum analógok bioszintézisútját kódoló nukleotidszekvenciák keresésére, *azzal jellemezve*, hogy

i) az említett analógokat termelő törzsből származó nukleotidszekvenciákat szigorú hibridizációs körülmények között az 1. igénypont szerinti eljárással előállított kozmidok 3,19 kb méretű inszertumával hibridizáltatjuk,

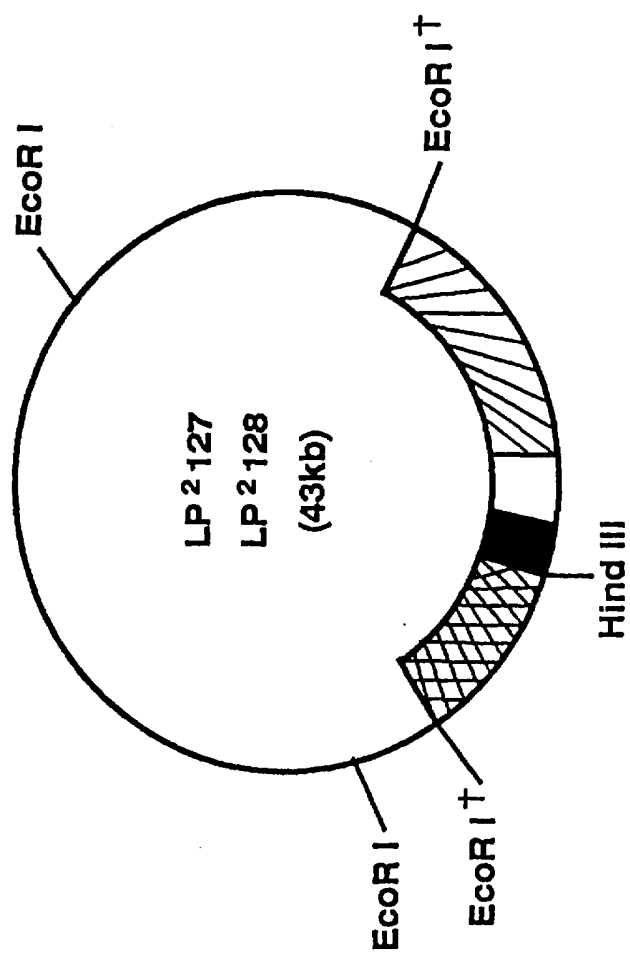
ii) a hibridizálódó DNS-szekvenciákat izoláljuk, és

iii) az izolált DNS-szekvenciákat egy prokarióta gazdaszervezetbe transzformálva expresszáltatjuk, és az antibiotikum analógokat termelő gazdaszervezetekkel azonosítjuk a keresett nukleotidszekvenciákat, ahol prokarióta gazdaszervezetként *E. colit*, *Streptomyces lividanst*, *S. griseofuscust*, *S. ambofuchsust* vagy egy *Actinomyces*, *Bacillus*, *Corinebacterium* vagy *Thermoactinomyces* törzset alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy prokarióta gazdaszervezetként *Streptomyces lividanst* alkalmazunk.



1. ábra



2. ábra

