

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLového  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000-4354  
(22) Přihlášeno: 21.05.1999  
(30) Právo přednosti: 26.05.1998 SE 9801852  
(40) Zveřejněno: 16.05.2001  
(Věstník č. 5/2001)  
(47) Uděleno: 08.04.2010  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 19.05.2010  
(Věstník č. 20/2010)  
(86) PCT číslo: PCT/EP1999/003509  
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1999/061634

(11) Číslo dokumentu:

**301 662**

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.:

C12N 15/54 (2006.01)  
C12N 15/74 (2006.01)  
C12N 15/31 (2006.01)  
C12N 9/10 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)  
C12R 1/63 (2006.01)  
C07K 14/245 (2006.01)  
C07K 14/28 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01)  
A61K 39/106 (2006.01)  
A61K 39/108 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 0251579; US 5470729; EP 1080211.

databáze EMBL, přístupové číslo Y17135, 1.5.1998; databáze EMBL, přístupové číslo AJ006514, 5.6.1998.

(73) Majitel patentu:

Crucell Sweden AB, Solna, SE

(72) Původce:

Carlin Nils, Hässelby, SE

Lebens Michael R., Göteborg, SE

(74) Zástupce:

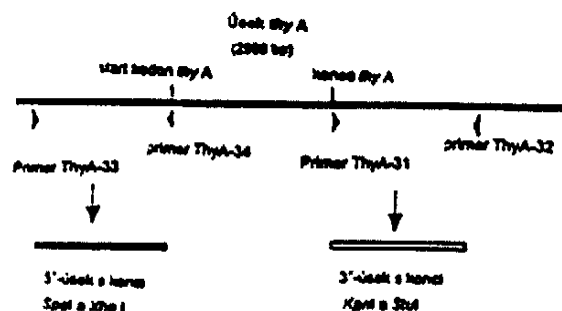
TRAPLOVÁ HAKR KUBÁT Advokátní a patentová  
kancelář, Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Kmen *deltathyA* *Vibrio cholerae* postrádající  
funkci genu *thyA***

(57) Anotace:

Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae*, který postrádá v chromosomu celý gen *thyA*, který má nukleotidovou sekvenci id. č. 1, a nebo kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae*, který obsahuje v genu *thyA* delecii a současně inzerci nekódující DNA, a který je připravitelný způsobem, který zahrnuje kroky: poskytnutí thymin-dependentního kmene *Vibrio cholerae*, provedení místně cílené inzerce genu kanamycinové rezistence ve formě genového bloku Kan<sup>R</sup> do PstI místa genu *thyA*, a delece 209 párů bází z genu *thyA* upstream od místa inzerce a 261 párů bází z genového bloku Kan<sup>R</sup>. Výhodně kmen obsahuje jeden nebo několik episomálních autonomně se replikujících DNA elementů majících funkční gen *thyA*, což umožňuje kmenu růst v růstovém médiu za nepřítomnosti thyminu, přičemž jeden nebo několik episomálních autonomně se replikujících DNA elementů dále obsahuje strukturální gen kódující protein. Kódovaný protein je výhodně B-podjednotka tepelně labilního enterotoxinu *E. coli* (LTB) nebo 26 kD protein glutathion-S-transferázy ze *Schistosoma japonicum* (GST 26 kD).



CZ 301662 B6

## Kmen $\Delta thyA$ *Vibrio cholerae* postrádající funkci genu *thyA*

### Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká kmenů  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* a způsobů přípravy těchto kmenů. Vynález se zejména týká kmenu *Vibrio cholerae*, který byl zbaven genu z chromozómu, tj. *thyA*<sup>-</sup> kmenu *Vibrio cholerae*, který postrádá funkci genu *thyA*. Tento kmen obsahuje jeden nebo několik epizomálních autonomně se replikujících DNA elementů, jako jsou např. plazmidy, obsahující cizorodý gen *thyA*, např. gen z *E. coli*, který umožňuje kmenu růst v nepřítomnosti thyminu v kultivačním médiu, a případně obsahujících strukturní gen kódující homologní nebo heterologní protein. Vynález se dále týká nukleotidových sekvencí genů *thyA* a proteinů kódovaných těmito sekvencemi.

15

### Dosavadní stav techniky

Expresí rekombinantních genů v bakteriální buňce se nejčastěji provádí tak, že se do hostitelské bakterie vnesou epizomální prvky schopné autoreplikace (např. plazmidy), které kódují strukturní gen pro požadovaný protein, který je řízen vhodným promotorem. Takové plazmidy jsou zpravidla udržovány pomocí vloženého genu pro selekční marker, který kóduje protein udělující rezistenci např. ke specifickému antibiotiku (jako je např. ampicilin, chloramfenikol, kanamycin, tetracyklin a další). V hostitelských buňkách se plazmidy udržují tím, že se odpovídající antibiotikum přidá do kultivačního média. Trvalé udržování plazmidů v hostitelském kmenu vyžaduje selekci užitím antibiotika, bez které by docházelo k segregaci a vzniku významného počtu buněk, které neobsahují plazmid a tudíž neexprimují požadovaný produkt. Avšak použití antibiotik při produkci rekombinantních proteinů je z mnoha důvodů nežádoucí. Kromě zjevného zvyšování nákladů je dodávání antibiotik do kultivačního média považováno za značně problematické při výrobě jakýchkoliv rekombinantních proteinů pro použití v humánní nebo veterinární medicíně. K tomu jsou nejméně tři hlavní důvody. Za prvé, reziduální antibiotika mohou u vnímavých jedinců vyvolat silnou alergickou reakci. Za druhé, existuje možnost selekce bakterií rezistentních k antibiotiku v přirozené bakteriální flóře uživatelů daného proteinového produktu, a nakonec za třetí, DNA kódující rezistenci k antibiotiku by mohla být přenesena do vnímavých bakterií u jedince užívajícího daný proteinový produkt, čímž rezistence k antibiotiku v nežádoucí míře další bakterie.

35

Existují vynálezy, které se zabývají tímto problémem, a jedním z nich je využití genu *par*, který účinně usmrtí každou buňku, která neobsahuje kopii plazmidu po každém buněčném dělení [1].

40

Jiná patentová přihláška [2], která souvisí s předmětem předkládaného vynálezu, popisuje vynález založený na znalosti DNA sekvence *thyA* z *E. coli*. Původci vnesli do buněk gen *thyA* v plazmidu, ale užili hostitelský kmen, kterým byla spontánní mutanta *thyA*<sup>-</sup> selektovaná na základě rezistence k trimethoprimu. Takové mutanty však nejsou dobře definovány (nesou bodové mutace nebo malé delece) a mohou snadno divoký typ (tj. *thyA*<sup>+</sup>) s nepříjemně vysokou frekvencí. To by vedlo buď k eliminaci plazmidu z hostitelské bakterie a tudíž ke ztrátě produkce nebo k nekonzistentní a nespolehlivé produkci požadovaného rekombinantního produktu. Kromě toho dalším problémem při selekci trimethoprimem je možnost, že výsledná závislost na thyminu vzniká důsledkem mutace v genu pro dihydrofolát reduktázu (*folA*) a tudíž pak není komplementována genem *thyA* obsaženým v plazmidu [3]. Řízení o této patentové přihlášce bylo navíc zastaveno, alespoň v Evropě.

50

Bylo ukázáno, že použití *V. cholerae* pro expresi rekombinantních genů je výhodnější než užití jiných prokaryotických expresních systémů dosud obecně užívaných, a sice proto, že rekombinantní produkty se tvoří ve velkých množstvích a jsou secernovány do kultivačního média, což usnadňuje následující kroky izolace a purifikace. To je odlišné od *E. coli*, kde se rekombinantní

55

produkt zpravidla hromadí v periplazmatickém prostoru [4]. Jedním z důležitých faktorů, který je příčinou této vlastnosti, je gen *eps* ve *V. cholerae* [5].

5 Thymidylátsyntetáza kódovaná genem *thyA* z *E. coli* a jiných bakterií katalyzuje metylaci deoxyuridylyátu (dIJMP) na deoxythymidylyát (dTMP) a je nezbytným enzymem v biosyntéze deoxyribothymidintrifosfátu (dTTP) pro inkorporaci do DNA. V nepřítomnosti tohoto enzymu se bakterie stává závislá na vnějším zdroji thyminu, který je inkorporován do dTTP náhradní metabolickou dráhou zprostředkovanou geny *deo* [6].

10 Spontánní mutanty *thyA*<sup>-</sup> mohou být ihned izolovány na základě rezistence k trimethoprimu. Toto antibiotikum inhibuje regeneraci tetrahydrofolátu z dihydrofolátu tvořeného při syntéze dTMP katalyzované thymidylátsyntetázou. Takže pokud jsou buňky *thyA*<sup>-</sup>, stanou se závislými na thyminu, ale v přítomnosti trimethoprimu již dále nespotřebovávají tetrahydrofolát.

15

#### Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na nové nukleotidové sekvenci genu *thyA* z *Vibrio cholerae*. Gen *thyA* je výhodně použit k udržování rekombinantních plazmidů, které se užívají k produkci rekombinantních proteinů ve *V. cholerae*, a dále je tato sekvence užita pro vložení cizorodých genů do chromozómu *V. cholerae* selektovatelným a místně-specifickým způsobem.

Jeden aspekt předkládaného vynálezu se týká způsobu přípravy kmenu *thyA*<sup>-</sup> *Vibrio cholerae*, který obsahuje krok místně-cílené mutagenese v chromozómu *V. cholerae* delecí a/nebo inzercí nukleotidů v lokusu genu *thyA*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 1 na obr. 1.

Termín „má v podstatě nukleotidovou sekvenci“ v předkládaném popisu a patentových nárocích zahrnuje nukleotidové sekvence, které obsahují nějaké přirozené či umělé prodloužení nebo zkrácení, nebo delece a adice, přičemž však nedochází k ovlivnění původní přirozené funkce této nukleotidové sekvence.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká *thyA*<sup>-</sup> kmenu, kterým je *thyA* kmen *Vibrio cholerae* postrádající funkční gen *thyA*. V tomto provedení vynálezu kmen  $\Delta$ *thyA* *Vibrio cholerae* obsahuje jeden nebo několik autonomně se replikujících elementů DNA, které nesou funkci genu *thyA*, což dovoluje kmenu růst i v nepřítomnosti thyminu v kultivačním médiu. Ve výhodném provedení je autonomně se replikující DNA element plazmid.

V jiném výhodném provedení vynálezu  $\Delta$ *thyA* kmen *Vibrio cholerae* podle vynálezu obsahuje v epizomálním autonomně se replikujícím prvku DNA, zejména plazmidu, cizorodý gen *thyA*, *E. coli*.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu  $\Delta$ *thyA* kmen *Vibrio cholerae* podle vynálezu obsahuje v jednom nebo několika epizomálních autonomně se replikujících DNA elementech, zejména plazmidech, kromě cizorodého genu *thyA*, jako je např. gen z *E. coli*, také strukturní gen kódující homologní nebo heterologní protein, jako je např. tepelně labilní B-podjednotka enterotoxinu *E. coli* (LTB) nebo glutathion-S-transferázový protein velikosti 26 kD (GST 26 kD) ze *Schistosoma japonicum*.

50 Třetí aspekt předkládaného vynálezu se týká úseku nukleotidové sekvence sousedící s 5'-koncem strukturního genu *thyA* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 2 na obr. 2.

Čtvrtý aspekt předkládaného vynálezu se týká úseku nukleotidové sekvence sousedícího s 3'-koncem strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 3 na obr. 3.

- 5 Nukleotidová sekvence id. č. 1 je užitečná pro vkládání cizorodých genů selektivně a místně cíleným způsobem do chromozómu *V. cholerae* a pro místně cílenou mutagenézi při přípravě kmenů *thy A<sup>-</sup>* *Vibrio cholerae*.

- 10 Pátý aspekt předkládaného vynálezu se týká proteinu, „který je kódován nukleotidovou sekvencí genu *thy A* z *Vibrio cholerae* podle předkládaného vynálezu, jako je např. protein mající aminokyselinovou sekvenci id. č. 4 na obr. 4.

- 15 Šestý aspekt předkládaného vynálezu se týká proteinu, který je kódován nukleotidovou sekvencí úseku lemujícího 5'-konec strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae* podle vynálezu, jako je např. protein, který má aminokyselinovou sekvenci id. č. 5 na obr. 5.

Proteiny podle pátého a šestého aspektu předkládaného. jsou zvláště užitečné pro účely výzkumu potenciální cíle antimikrobiální terapie.

- 20 Sedmý aspekt předkládaného vynálezu se týká vakcíny, která obsahuje jakožto imunizační složku  $\Delta$ *thy A* kmen *V. cholerae* podle vynálezu nebo *thy A<sup>-</sup>* kmen *Vibrio cholerae* připravený způsobem podle vynálezu. Vakcína je určena pro použití k profylaxi nebo k léčení cholery a případně i jiných infekčních nemocí, zvláště v případě, kdy použitý kmen byl metodami genového inženýrství modifikován tak, aby exprimoval cizorodé proteiny. Vakcína kromě imunizační  
25 složky obsahuje vehikulum, např. fyziologický roztok, a další složky obvykle užívané ve vakcínách jako jsou puřry a adjuvans. Vhodná vehikula, puřry a adjuvans a další složky jsou odborníkům známy a jsou popsány např. v Evropském lékopisu nebo Lékopisu USA.

### 30 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje nukleotidovou sekvenci id. č. 1 genu *thy A* z *Vibrio cholerae*.

- 35 Obr. 2 ukazuje nukleotidovou sekvenci id. č. 2, tj. sekvenci 5'-lemujícího úseku strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*.

Obr. 3 ukazuje nukleotidovou sekvenci id. č. 3, tj. sekvenci 3'-lemujícího úseku strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*.

- 40 Obr. 4 ukazuje aminokyselinovou sekvenci id. č. 4, tj. sekvenci proteinu kódovaného strukturním genem *thy A* z *Vibrio cholerae*.

Obr. 5 ukazuje aminokyselinovou sekvenci id. č. 5, tj. sekvenci proteinu kódovaného 5'-lemujícím úsekem strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*.

- 45 Obr. 6 ukazuje klonování fragmentu *EcoRI/HindIII*, který obsahuje gen *thy A* z *Vibrio cholerae*, do pUC19.

- 50 Obr. 7 ukazuje srovnání produktů genu *thyA* z *E. coli* [16], *V. cholerae* a *H. influenzae* [17], které demonstruje vysoký stupeň homologie mezi *V. cholerae* a *H. influenzae*, na rozdíl od *E. coli*.

Obr. 8 ukazuje inzerci bloku genu kanamycinové rezistence Kan<sup>R</sup> do místa *PstI* v genu *thy A* z *Vibrio cholerae* v pUC19.

- 55 Obr. 9 ukazuje polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pro fragmentu *tyta*-Kan s konci *XbaI*.

Obr. 10 ukazuje ligaci fragmentu *thyA*-Kan s konci *XbaI* do plazmidu pNQ705.

Obr. 11 ukazuje částečnou delecí genu *thyA* a počátku genu Kan Tf pNEB193.

5

Obr. 12 ukazuje štěpení *XbaI*, kterým byl vystřižen gen  $\Delta thy\Delta Kan$  z pNEB193 a ligaci do pDM4 naštěpeného *XbaI*.

10

Obr. 13 schematicky znázorňuje strategii k úplnému odstranění (úplné delecí) genu *thyA* z *Vibrio cholerae*.

Obr. 14 ukazuje vložení 5'-úseku proti směru transkripce od genu *thyA* v pMT-SUICIDE a vytvoření pMT s 5prim.

15

Obr. 15 vložení 3'-úseku po směru transkripce (downstream) od genu *thyA* v pMT s 5prim a vytvoření pMT $\Delta thyA$  *V. cholerae*.

Obr. 16 ukazuje expresní vektor pMT-eltB (*thyA*) použitý pro expresi LTB v *V. cholerae* JS 1569  $\Delta thyA$ .

20

Obr. 17 ukazuje expresní vektor pMT-GST (*thyA*) použitý pro expresi GST v *V. cholerae* JS 1569  $\Delta thyA$ .

25

#### Příklady provedení vynálezu

##### Strategie experimentů

Pro přípravu definovaných *thyA* mutant *V. cholerae*, které mohou být užity jako vhodné produkční kmeny pro přípravu rekombinantních proteinů kódovaných plazmidy, které jsou udržovány komplementací *thyA* bylo nejdříve potřeba klonovat a charakterizovat gen divokého typu a úseky lemující jeho 5' – a 3'–konec. Zvolená strategie byla taková, že nejdříve byl klonován gen *thyA* z *V. cholerae* do plazmidu, a to pomocí komplementace *thyA* auxotrofie kmenu *E. coli* K12.

Restrikční analýza a subklonovací experimenty byly provedeny proto, aby byl lokalizován strukturní gen *thyA* ve velkém fragmentu DNA, který byl nejdříve získán. Vhodný úsek obsahující gen *thyA* a úseky lemující jeho 5' – a 3'– konec (5' – a 3'–lemující úseky) byl pak sekvencován.

Pro ověření toho, že byl klonován a sekvencován skutečně gen *thyA* z *V. cholerae* bylo provedeno srovnání se sekvencemi *thyA* z jiných organismů. Klonovaný gen byl navíc schopen komplementovat *thyA* fenotyp *Vibrio cholerae* získaný selekcí na rezistenci k trimethoprimu. Analýza sekvence této mutanty ukázala, že v genu, který byl identifikován jako gen *thyA*, obsahuje skutečně jednu nukleotidovou záměnu, kterou vzniká stop–kodon a tudíž gen poskytuje nefunkční zkrácený produkt.

45

Znalost sekvence genu *thyA* a úseků lemujících tento gen umožnila využít vhodné suicidální („sebevražedné“) vektory pro místně–cílenou mutagenézi. Byly zvoleny následující strategie:

- a) inzerční inaktivace,
- 50 b) kombinace inzerční inaktivace a delecí genu, a
- c) odstranění celého genu,

které jsou dále podrobněji popsány:

- a) Inzerční inaktivace genu *thy A* byla provedena vložením genového bloku Kan<sup>R</sup> (se suicidálním vektorem pNQ705 [14]).
- b) Delece úseku přibližné velikosti 400 bp byla provedena u kmenu nesoucího blok Kan<sup>R</sup>, čímž byl odstraněn úsek velikosti asi 200 bp jak z genu *thy A* proti směru transkripce od místa inzerce, tak i z genu Kan<sup>R</sup> rezistence ke kanamycinu, který tím byl inaktivován. Byl tak získán deletovaný gen *thy A*, kde delece byla v centrální části genu, a pak následovala inzerce nekódujícího úseku DNA. Tento konstrukt byl vložen do chromozómu *V. cholerae* pomocí suicidálního vektoru pDM4 výsledný kmen byl pojmenován JS 1569 $\Delta$ *thyA* $\Delta$ Kan.
- c) Úplné odstranění genu *thy A* bylo provedeno vzájemnou ligací (spojením) úseků lemujících strukturní gen, přičemž byla věnována pozornost tomu, aby se nenarušily další otevřené čtecí rámce (narušení přilehlého genu *lgt* je také letální). DNA nesoucí delecí byla klonována nového suicidálního vektoru (PMT-SUICIDE-I) užitého k vložení sekvence do chromozómu *V. cholerae*. Výsledný kmen byl pojmenován JS 1569 $\Delta$ *thyA*.

Pro expresi rekombinantních genů v těchto  $\Delta$ *thyA* kmenech *V. cholerae* byly zkonstruovány dva expresní vektory. Každý obsahoval *thy A* gen z *E. coli*, replikační počátek z obecně užívaného víceúčelového vektoru pUC19, promotor *tac* a terminátor transkripce *trpA* nezávislý na faktoru  $\rho$ . V jednom z těchto vektorů byl vložen také gen *lacI*<sup>q</sup>, aby reguloval expresi z promotoru *tac*, který obsahuje také sekvenci *lac* operátoru. Do těchto plazmidů byly klonovány dva geny a byly exprimovány v nově vytvořených kmenech *V. cholerae* s delecí *thy A*, JS1569 $\Delta$ *thyA*. První gen kódoval B-subjednotku lidského tepelně z *E. coli* (LTB) (viz obr. 16) a druhý labilního enterotoxinu byl gen *sj26* kódující glutathion-S-transferázu (GST) ze *Schistosoma japonicum* (viz obr. 17).

LTB je strukturně podobný B-podjednotce cholerického toxinu přirozeně produkovaného hostitelským kmenem a byl secernován do kultivačního média. Druhý protein je eukaryotického původu a pochází z asijské jaterní motolice. Sj26 GST exprimována ve vysoké hladině v *E. coli* a akumuluje se v cytoplazmě. Expres obou rekombinantních proteinů byla vyhodnocena v případě LTB pomocí GM1 ELISA testu supernatantu kultivačního média a v případě GST pomocí komerčně dostupného testu. Oba proteiny byly také analyzovány pomocí SDS-PAGE a westernovým přenosem.

### Původ genu *thy A*

Gen *thy A* byl klonován z kmenu *V. cholerae* JS 1569. Tento kmen pochází z kmenu *V. cholerae* Inaba 569B klasického biotypu (sbírka ATCC č. 25870). Kmen má delecí v genu *ctxA* [7] a byl modifikován tak, že získal rezistenci k rifampicinu [8].

### Klonování fragmentu *HindIII*/*EcoRI* velikosti 1.4 kb obsahujícího gen *thyA* z *V. cholerae*

Chromozómová DNA připravená metodou užívající CTAB [9] byla úplně štěpena restriktivním enzymem *HindIII*. Naštěpená DNA byla ligována do obecně užívaného vektoru pBR322 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), který byl předtím štěpen *HindIII* a ošetřen alkalickou fosfatázou. Ligační směs byla elektroporací [10] vnesena do buněk kmenu *E. coli* HB 101, který byl fenotypově *thy A*<sup>-</sup> (selektován na základě rezistence k trimethoprimu) a kultury byly nanášeny na plotny s modifikovaným Syncase (MS) agarem [11], s přísadkou ampicilinu, ale neobsahovaly thymin. Takže transformanty byly selektovány jak na základě toho, že obsahovaly získaný plazmid, tak i na přítomnost funkčního genu *thyA*. Buňky byly izolovány tak, že buňky z jediné kolonie byly očkovací kličkou přeneseny na stejný typ agarových ploten a rostly pak na médiu MS s ampicilinem. Plazmidová DNA byla izolována užitím soupravy „Wizard minipreps“ (Promega Corp. Madison Wis.) a pak naštěpena *HindIII*. Fragment o velikosti 10 až 12 kb byl izolován a tento klon byl nazván *ThyA B2*.

Aby se zmenšila velikost fragmentu, byl plazmid naštěpen *EcoRI* a znovu spojen T4 ligázou. Ligovaná DNA byla elektroporací opět vnesena do buněk kmenu *E. coli* popsaného výše za stejných selekčních podmínek pro růst transformant. Kolonie vzniklé z této transformace byly izolovány, jak bylo popsáno výše, a byla izolována plazmidová DNA, která byla analyzována dvojítm štěpením *EcoRI* a *HindIII*. Zůstal fragment DNA velikosti přibližně 1,4 kb, který umožňoval komplementovat *thy A* mutaci v hostitelském kmenu *E. coli*. Tento fragment byl klonován do plazmidu pUC19 (New England Biolabs), který byl naštěpen stejnými dvěma enzymy a ošetřen alkalickou fosfatázou. Po elektroporaci byly transformanty z tohoto experimentu izolovány stejně jak bylo popsáno výše. Tento klon byl nazván *thy A* 1:2 (obr. 6).

#### Ověření fragmentu *HindIII/EcoRI* velikosti 1,4 kb obsahujícího gen *thy A*

Pro ověření toho, že fragment skutečně pocházel z chromozómu *V. cholerae*, byla DNA z kmenu JS 1569 úplně naštěpena *HindIII* a *EcoRI* společně s *HindIII*. Fragmenty DNA pak byly analyzovány elektroforézou na agarózovém gelu společně s klonem *ThyA* B2 naštěpeným *HindIII* a klonem *thy A* 1:2 naštěpeným *EcoRI* a *HindIII*. Po elektroforéze byla DNA přenesena na nylonovou membránu, imobilizována UV zářením a pak hybridizována (za stringentních podmínek) s fragmentem velikosti 1,5 kb vystřiženým z klonu *thy A* 1:2, který byl označen <sup>32</sup>P dCTP užitím soupravy Multiprime kit od firmy Amersham.

Výsledky: Jak v chromozómové DNA štěpené *HindIII*, tak klonu *ThyA* B2 štěpeném *HindIII* byl evidentní fragment velikosti přibližně 10 kb. Stejně tak v chromozómové DNA štěpené *EcoRI/HindIII* tak klonu *thy A* 1:2 štěpeném *EcoRI/HindIII* byl evidentní fragment velikosti přibližně 1,4 kb (data nejsou ukázána). To dokazuje, že klonovaný fragment pocházel z DNA *V. cholerae* JS 1569.

#### Transformace JS1569 *thy A*<sup>-</sup> plazmidem *thy A* 1:2

Pro ověření toho, že klonovaný fragment *EcoRI/HindIII* podporuje růst *V. cholerae* fenotypu *thyA*<sup>-</sup>, mutanta závislá na thyminu JS 1569 (*V. cholerae* JS 1569 4.4) byla elektroporací transformována plazmidem *thy A* 1:2. Elektroporace a selektivní médium byly popsány výše. Mutanta JS1569 4.4 nerostla na médiu MS bez přísadky thyminu.

Výsledky: Byly izolovány kolonie JS 1569 4.4, které rostly na médiu bez thyminu. Bylo ukázáno, že všechny nesly plazmid *thy A* 1:2, což podporuje předpoklad, že klonovaný fragment obsahuje gen *thyA* z *V. cholerae*.

#### Sekvencování DNA z plazmidu *Thy A* 1:2

Plazmidová DNA byla sekvencována metodou využívající terminace syntézy řetězce dideoxynukleotidy [12], a sice pomocí sekvenační soupravy ABI PRISM™ Dye terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer). Byly použity jak komerčně dostupné tak i vlastní oligonukleotidové primery. Sekvence DNA byla analyzována na automatickém sekvenačním zařízení ABI PRISM 373 (Perkin Elmer) a získaná data byla analyzována užitím softwaru AutoAssembler Software Package (Perkin Elmer). Dále byla data analyzována vyhledáváním homologických sekvencí pomocí programu GCG [13].

Výsledky: Jako gen s nejlepší homologií byla nalezena thymidylátsynthetáza z různých biologických druhů. Za povšimnutí stojí, že homologie s thymidylátsynthetázou z *E. coli* je velmi slabá (obr. 7).

Strategie pro delecí genu *thyA* z *V. cholerae* JS1569

Pro získání definovaných *thyA* mutant *V. cholerae* byly použity dvě strategie. První zahrnuje  
 5 inaktivaci genu *thyA* vložení genového bloku Kan<sup>R</sup> a pak následnou parciální delecí genu *thyA*  
 a genového bloku Kan<sup>R</sup>.

Druhá strategie je zaměřena na úplnou delecí genu *thyA* z chromozómu *V. cholerae* pomocí  
 10 nového suicidálního vektoru pMT SUICIDE-1. Tento vektor obsahuje 5'- a 3'-lemující úseky  
 genu *thyA* a také replikační počátek R6K a geny RP4 *mob*.

K nahrazení genu *thyA* kmenu JS 1569 bylo rozhodnuto použít na thyminu závislý JS1569 4.4,  
 neboť předběžné pokusy ukázaly, že je zde silná selektivní nevýhoda při přechodu z divokého  
 typu na thyminovou závislost, dokonce i za přítomnosti vysoké hladiny exogenního thyminu.

15 Inaktivace genu *thyA* inzercí genového bloku Kan<sup>R</sup>

Zde strategie zahrnovala inaktivaci genu *thyA* inzercí (vložení) genu rezistence ke kanamycinu  
 do jedinečného místa *PstI* v genu *thyA* ve formě genového bloku Kan<sup>R</sup> (Pharmacia) (viz obr. 8).  
 20 Tento konstrukt byl amplifikován pomocí PCR (užitím systému Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR,  
 Boehringer Mannheim) s oligonukleotidovými primery, které vnesly do konstrukt konce *XbaI*,  
 aby mohl být vložen do suicidálního plazmidu pNQ705 [14], který nese jedinečné místo *XbaI*  
 v genu rezistence k chloramfenikolu. Pro amplifikaci inzerčně inaktivovaného genu v PCR byly  
 použity následující oligonukleotidové primery:

25

ThyA-10: 5'- GCT CTA GAG CCT TAG AAG GCG TGG TTC -3',

odpovídající nukleotidům 557 až 575 v sekvenci id. č. 2  
 (obr. 2) s přidaným místem *XbaI* (tučně), a

ThyA-11: 5'- GCT CTA GAG CTA CGG TCT TGA TTT ACG GTA T -3',

odpovídající komplementární sekvenci nukleotidů 235 až 257  
 v sekvenci id. č. 2 (obr. 3) s přidaným místem *XbaI* (tučně)  
 (obr. 9 + 10).

Výsledné plazmidy byly vneseny do *E. coli* S-17, které byly užity pro konjugální experimenty.

30 Jelikož recipientní kmen JS 1569 4.4 je rezistentní rifampicinu a senzitivní k chloramfenikolu  
 a donorový kmen *E. coli* S-17 je rezistentní jak k chloramfenikolu, tak kanamycinu, trans-  
 konjuganty byly selektovány na rezistenci k dvěma antibiotikům, rifampicinu a kanamycinu.  
 Výsledné kmeny *V. cholerae* budou však rezistentní také k chloramfenikolu, neboť celý plazmid  
 bude na počátku vložen do chromozómu. Exkonjuganty, které inkorporovaly inaktivovaný gen  
 35 *thyA* nesoucí genový blok Kan<sup>R</sup> do chromozómu a ztratily plazmid pNQ705 pak mohou být  
 selektovány z těch, které jsou citlivé k chloramfenikolu, ale zůstaly rezistentní ke kanamycinu.

Pro ověření inzerce genu rezistence ke kanamycinu do genu *thyA* byl celý gen *thyA* ampli-  
 fikován pomocí PCR s oligonukleotidovými primery *thyA*-10 a *thyA*-11, a velikost takto vznik-  
 40 lého fragmentu byla porovnána s velikostí nativního genu *thyA*. Byl nalezen očekávaný fragment  
 velikosti 2,6 kb na rozdíl od nativního genu *thyA* velikosti 1,4 kb.

Výsledky: Exkonjuganty byly rezistentní ke kanamycinu a vnímavé ke chloramfenikolu a když byly amplifikovány pomocí PCR, ukázalo se, že mají do chromozómu vložený genový blok Kan<sup>R</sup>. Sekvencování amplifikovaného fragmentu ukázalo, že jediný defekt v genu byl způsoben  
 5 inzerací genu rezistence ke kanamycinu. To ukazuje, že rekombinační událost, která vedla k inkorporaci inzerčně inaktivovaného genu do chromozómu, také eliminovala bodovou mutaci, která způsobovala, že recipientní kmen (JS 1569 4.4) byl závislý na thyminu. Růst získaných kmenů byl pozorován pouze, když bylo kultivační médium obohaceno thyminem (200 µg/ml).

#### 10 Částečná delece genu *thyA* a genového bloku Kan<sup>R</sup>

Pro další zajištění stálosti mutace *thy A* byl inzerčně inaktivovaný *thy A* subklonován jako *XbaI* fragment do plazmidu pNEB 193 (New England Biolabs). PCR primery byly navrženy tak, že  
 15 došlo k deleci úseku 209 páru bází z genu *thyA* a 261 páru bází z genového bloku Kan<sup>R</sup>.

Takže gen *thyA* byl dále narušen a také gen rezistence ke kanamycinu byl inaktivován (tím, že byl odstraněn počáteční úsek kódující oblasti). Celkovým výsledkem tohoto postupu byl kmen nesoucí deletovaný gen *thy A*, který současně obsahuje inzerci nekódující DNA.

ThyA-14: 5'- GGG GGC **TCG AGG** GGC ACA TCA CAT GAA -3'

ThyA-15: 5'- CCC CCC **TCG AGC** GCC AGA GTT GTT TCT GAA -3'

Tučná písmena označují štěpné místo *XhoI* (obr. 11).

Po PCR amplifikaci byl získán fragment DNA obsahující celý plazmid s výjimkou deletované oblasti. Amplifikovaná DNA byla štěpena *XhoI*, self-ligována (konce jedné molekuly byly navzájem spojeny) a pak byla transformována do buněk kmenu *E. coli* HB 101. Kolonie pak byly  
 25 selektovány na plotnách obsahujících ampicilin. Byly izolovány jednotlivé kolonie a znovu očkovací kličkou naneseny na plotny. DNA získaná minipreparací plazmidů z jednotlivých kolonií po štěpení restrikčními enzymy *XbaI*, *XhoI*, *HindIII* a *RsaI* poskytla očekávaný restrikční vzorec.

Neúplný gen *thy A* nesoucí inaktivovaný gen rezistence ke kanamycinu byl z vektoru vyštěpen  
 30 enzymem *XbaI*, purifikován a ligován do plazmidu pDM4 [15] (viz obr. 15). PDM4 je suicidální vektor odvozený z pNQ705 obsahující gen *SacBR* z *Bacillus subtilis* a modifikované vícečetné klonovací místo.

Po přenosu plazmidu pDM4 ( $\Delta thyA\Delta Kan$ ) do buněk kmenu *E. coli* S-17 byly provedeny trans-  
 35 konjugální experimenty. V tomto případě byl kmen *V. cholerae* JS 1569 *thyAKan* použit jako recipientní kmen. Konjugace byla provedena, jak bylo popsáno výše se selekcí na rezistenci k rifampicinu a chloramfenikolu. Po růstu na tomto selekčním médiu byly kolonie dále selektovány na médiu obsahujícím 10% sacharózu bez přítomnosti chloramfenikolu. Sacharóza indukovala gen *sacBR*, který kóduje enzym levansacharázu, který přeměňuje sacharózu na levan. Tato sloučenina je toxická pro většinu Gram-negativních organismů. Tímto způsobem byly usmrceny  
 40 klony nesoucí sebevražedný plazmid a byly zachovány pouze exkonjuganty, které plazmid ztratily.

Výsledky: byla selektována kolonie vnímavá k chloramfenikolu a kanamycinu. PCR amplifikace  
 45 úseku *thy A* s primery ThyA-10 a ThyA-11 potvrdila, že fragment „*thy A Kan*“ (2,6 kb) v chromozómu byl nahrazen fragmentem „*Δthy A ΔKan*“ (2,1 kb). Růst výsledného kmene byl pozorován pouze když do kultivačního média byl přidán thymin (200 µg/ml). Kmen byl pojmenován *V. cholerae* JS1569  $\Delta thyA\Delta Kan$ .

# Přímá delece genu *thy A* z *V. cholerae*

Pro tento experiment byly užity 5'- a 3'-lemující sekvence genu *thy A*. Byl zkonstruován nový suicidální vektor pMT SUICIDE-1 (obr. 14), který obsahuje replikační počátek R6K, gen *mob* z RP4, gen rezistence k chloramfenikolu a vícečetné klonovací místo z plazmidu Litmus (New England Biolabs). Byl připraven modifikovaný fragment, kde kódující oblast genu *thy A* byla nahrazena vícečetným klonovacím místem (odvozeným z Litmus 28) a byly ponechány jen úseky lemující 5' a 3'-konec lokusu *thy A V. cholerae* (tzv. 5' a 3'-lemující úseky). Takto vzniklý plazmid byl použit k vytvoření kmenu *V. cholerae*, kde je odstraněn celý gen *thy A*.

10

Jako výchozí materiál pro tuto konstrukci byl použit plazmid pMT SUICIDE-1 (poskytl M. Lebens, nepublikováno). Na základě 5' a 3'-lemujících úseků lokusu *thy A* byly navrženy následující oligonukleotidové primery:

ThyA-33: 5'- GGA CTA GTG GGT TTC CTT TTT GCT AT -3',

odpovídající nukleotidům 109 až 126 v sekvence id. č. 2 (obr. 2) (5'-úsek oblasti *thy A*) se štěpným místem *SpeI* (označeno tučně) a

ThyA-34: 5'- CCC CGC TCG AGA CCC TAT TTT GCT GCT AC -3',

odpovídající komplementární sekvenci bází 815 až 832 v sekvence id. č. 2 s připojeným štěpným místem *XhoI* (označeno tučně).

Tento pár oligonukleotidových primerů poskytuje v PCR fragment velikosti 743 bází odpovídající 5'-lemujícímu úseku genu *thy A*.

ThyA-31: 5'- CGG GGT ACC TGG CTT GAT GGG TTT TAT -3',

odpovídající nukleotidům 22 až 39 v sekvence id. č. 3 (obr. 3) (3'-lemující úsek lokusu *thyA*) se štěpným místem *KpnI* (uvedeno tučně), a

ThyA-32: 5'- GAA GGC CTT CGC CTC TGC TTG CGA CT -3',

odpovídající komplementární sekvenci bází 731 až 749 v sekvence id. č. 3 se štěpným místem *StuI* (uvedeno tučně).

Tento pár oligonukleotidových primerů v PCR poskytuje fragment velikosti 746 bází odpovídající 3'-lemujícímu úseku genu *thy A*.

15

Jako templát pro PCR byl použit preparát chromozómové DNA z *V. cholerae* JS1569 (obr. 13).

Amplifikovaná DNA byla naštěpena vhodnými restričními enzymy a klonována do vektoru pMT-SUICIDE 1 (obr. 14 a 15), čímž byl vytvořen plazmid pMT $\Delta$ thyA *V. cholerae*, který obsahuje asi 700 bp dlouhý úsek upstream (proti směru transkripce) od 5'-konce genu *thy A* a stejně velký úsek downstream (po směru transkripce) od 3'-konce genu *thy A* (tj. 5'- a 3'-lemující úseky).

Tento plazmid byl vnesen do *E. coli* S17-1 a použit v konjugačních experimentech jak bylo již popsáno výše. Jako příjemce (recipient) byl použit kmen *V. cholerae* JS1569 4.4. Konjugace byla provedena na LB agaru s přidavkem rifampicinu, chloramfenikolu a thyminu. Exkonjugáty, které ztratily sebevražedný plazmid byly selektovány na základě vnímavosti k chloramfenikolu.

Výsledky: Kolonie vnímavé k chloramfenikolu a rezistentní k rifampicinu byly selektovány. PCR amplifikace *thy A* s primery ThyA-10 a ThyA-11 vedla ke vzniku velikosti 1,4 kb z nativního genu *thy A* a fragmentu velikosti 0,6 kb z genu  $\Delta$ thyA. Tím bylo potvrzeno, že gen *thy A* byl v chromozómu deletován. Kromě toho tyto bakterie byly schopné růstu pouze na médiu s přidavkem thyminu. Tento kmen byl pojmenován *V. cholerae* JS1569.

Expresí B-podjednotky teplotně labilního enterotoxinu z *E. coli* (LTB) a sj26 glutathion-S-transferázy (GST) ze *Schistosoma japonicum* ve *V. cholerae* JS1569  $\Delta$ thyA

Byly zkonstruovány expresní vektory, obsahující gen *thy A* z *E. coli*, replikační počátek z vektoru s vysokým kopií pUC19, promotor *tac* a terminátor transkripce *trpA* nezávislý na faktoru  $\rho$ . V jednom z těchto dvou vektorů byl vložen gen *lacI*<sup>q</sup>, aby byla regulována exprese z promotoru *tac*, který obsahuje také sekvenci *lac* operátoru (obr. 16 a 17).

Expresí proteinu LTB v kmenu *V. cholerae* JS1569  $\Delta$ thyA

Expresní vektor ukázaný na obr. 16 byl elektroporací vnesen do buněk *V. cholerae* JS1569  $\Delta$ thyA. Transformanty byly selektovány na MS-agaru. Jednotlivé kolonie byly namnoženy, aby bylo možné provést minipreparaci plazmidů, které pak byly ověřeny restriční analýzou. Pro expresi byly transformanty kultivovány na MS médiu při teplotě 37 °C v protřepávané kultuře. Kultivační médium pak bylo odebráno a testováno na přítomnost LTB testem GM1-ELISA.

Výsledky: V testu GM1-ELISA bylo zjištěno, že kultura vyprodukovala alespoň 300  $\mu$ g/ml LTB. SDS-PAGE a westernový přenos se specifickými monoklonálními protilátkami dále že secernovaný protein byl LTB.

Expresí proteinu GST v kmenu *V. cholerae* JS1569  $\Delta$ thyA

Gen sj26 glutathion-S-transferázy (GST) ze *Schistosoma japonicum* byl klonován do expresního vektoru uvedeného na obr. 17. Tento vektor je shodný s prvním vektorem, až na sekvenci genu *lacI*<sup>q</sup>, která dovoluje regulovat expresi rekombinantního proteinu. Vektor byl elektroporací vnesen do buněk *V. cholerae* JS1569  $\Delta$ thyA. Transformanty byly selektovány na MS-agaru. Jednotlivé kolonie byly namnoženy, aby bylo možné provést minipreparaci plazmidů, které pak byly ověřeny restriční analýzou. Pro expresi byly transformanty kultivovány na MS médiu při teplotě 37 °C v protřepávané kultuře s přidavkem IPTG.

Výsledky: Rekombinantní protein byl nalezen v cytoplazmě *V. cholerae* SDS-PAGE a westernový přenos s monoklonálními protilátkami specifickými k GSM (Pharmacia BioTech, Uppsala) potvrdily, že byl exprimována skutečně GST. Hladinu exprese bylo obtížné stanovit, neboť GST protein byl exprimován intracelulárně, ale byla zhodnocena jako přibližně shodná s hladinou LTB.

Použitá literatura

1. Molin, S., K. A. Gerdes. 1984. Stabilized plasmids. US Patent 4,760,022.
- 5 2. Morona, R., and S. R. Attridge. 1987. Non-antibiotic marker system. EPC-A-0251579.
3. Green, J. M., B. P. Nichols, and R. G. Matthews. 1996. Folate biosynthesis, reduction and polyglutamylation. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. ASM Press Washington D.C. pp665-673.
- 10 4. Neill, R. J., B. E. Ivins, and R. K. Holmes. 1983. Synthesis and secretion of the plasmid-coded heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae*. Science. 221: 289-290.
- 5 5. Sandkvist, M., M. Bagdasarian, S. P. Howard, and V. J. DiRita. 1995. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. EMBO J. 14: 1 664-1 673.
- 20 6. Neuhaard, J. and R. A. Kelln. 1996. Biosynthesis and conversions of pyrimidines. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. ASM Press Washington D.C. pp580-599.
7. Kaper, J. B., H. Lockman, M. M. Baldini, and M. M. Levine. 1984. A recombinant live oral cholera vaccine. Biotechnology 2: 345-349.
- 25 8. Sanchez, J., and J. Holmgren. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 481-485.
- 30 9. Wilson, K. 1994. Preparation of genomic DNA from Bacteria. In Current protocols in Biology (F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J. G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, eds.) pp. 2.4.1-2.4.2 John Wiley & Sons, New York.
- 35 10. Sheen, J. 1994. High-efficiency transformation by electroporation. In Current protocols in Molecular Biology (F.A. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, eds.) pp. 1.8.4-1.8.5. John Wiley & Sons, New York.
- 40 11. Lebens, M., S. Johansson., J. Osek., M. Lindblad and J. Holmgren. 1993. Large-scale production of *Vibrio cholerae* toxin B subunits for use in oral vaccines. Biotechnology. 11: 1574-1578.
12. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5 463-5 467.
- 45 13. Program Manual for the Wisconsin Package. Version 8. September 1994. Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison Wisconsin.
14. Milton, D. L., A. Nordqvist, and H. Wolf-Watz. 1992. Cloning a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum* J. Bacteriol. 174: 7235-7244.
- 50 15. Milton, D. L., R. O'Toole, P. Högstedt, and H. Wolf-Watz. 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum* J. Bacteriol. 176: 1310-1319.

16. Belfort, M., G. Maley, J. Pedersen-Lane and F. Maley. 1983. Primary tructure of the *Escherichia coli thyA* gene and its thymidylate synthase product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4 914-4 918.

- 5 17. Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., Fitz-Hugh, W., Fileds, C. A., Gocayne, J. D., Scott, J. D., Shirely, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M. Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L.,  
10 Fuhrmann, J. L., Geoghagen N.S.M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O., and J. C. Venter. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* RD. Science 269: 496-512.

15

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 20 1. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* postrádající v chromozomu celý gen *thyA*, který má nukleotidovou sekvenci id. č. 1, nebo kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* obsahující v genu *thyA* deleci a současně inzerci nekódující DNA,

přípravitelný způsobem, který zahrnuje kroky:

25

poskytnutí thymin-dependentního kmene *Vibrio cholerae*, provedení místně-cílené inzerce genu kanamycinové rezistence ve formě genového bloku Kan<sup>R</sup> do PstI místa genu *thyA*, a

delece 209 párů bází z genu *thyA* upstream od místa inzerce a 261 párů bází z genového bloku Kan<sup>R</sup>,  
30

čímž se získá kmen  $\Delta thyA$ .

2. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* podle nároku 1 obsahující jeden nebo několik episomálních  
35 autonomně se replikujících DNA elementů majících funkční gen *thyA*, což umožňuje kmenu růst v růstovém médiu za nepřítomnosti thyminu, přičemž jeden nebo několik episomálních autonomně se replikujících DNA elementů dále obsahuje strukturní gen kódující protein.

3. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* podle nároku 2, kde episomální autonomně se replikující DNA  
40 element je plazmid.

4. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* podle nároku 2, kde episomální autonomně se replikující DNA element obsahuje cizorodý gen *thyA*.

- 45 5. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* podle nároku 4, kde cizorodý gen *thyA* je gen z *E. coli*.

6. Kmen  $\Delta thyA$  *Vibrio cholerae* podle nároku 2, kde kódovaný protein je vybrán z B-podjednotky tepelně labilního enterotoxinu *Escherichia coli* (LTB) a glutathion-S-transferázového  
50 26 kD proteinu ze *Schistosoma japonicum* (GST 26 kD).

50

18 výkresů

55

## Obr. 1

Sekvence id. č. 1

GAGAAGGTTT GTTATGCCTC AGGGTTATCT GCAGTTTCCC AATATTGACC CCGTATTGTT 60  
 TTCGATCGGC CCTCTAGCGG TCGCTGGTA TGGCTTGATG TATTTGGTGG GTTTCTTTT 120  
 TGCTATGTGG TTGGCCAATC GCCGAGCGGA TCGCGCGGC AGTGGTTGGA CGCGTGAGCA 180  
 AGTCTCTGAC TTGTTATTCG CCGGCTTTTT AGGTGTAGTG ATCGGTGGCC GAGTTGGTTA 240  
 TGTGATCTTC TACAATTTG ATCTGTTCTT TGCTGACCCT CTTTATTTAT TCAAAGTGTG 300  
 GACTGGCGGC ATGTCCTTCC ACGGCGGCTT ATTGGGTGTG ATCACCGCCA TGTTCGGTA 360  
 TGCGCGTAAA AACCAACGCA CCTTCTTTGG TGTGGCCGAT TTTGTTGCCC CTTTAGTGCC 420  
 ATTCGGTTTG GGGATGGGAC GTATCGGTAA..CTTTATGAAT AGTGAACTTT GGGGACGAGT 480  
 AACGGATGTG CCTTGGGCTT TTGTATTCCC TAATGGTGGC CCACTGCCGC GCCATCCTTC 540  
 ACAGCTTTAT GAATTCGCCT TAGAAGGCGT GGTTCGTTC TTTATCTTA ATTGGTTTAT 600  
 TGGTAAACCT CGTCCGCTAG GCAGCGTATC CGGACTGTTT TTAGCTGGAT ACGGTACATT 660  
 CCGCTTCCTT GTGGAATACG TCCGTGAGCC AGATGCTCAG TTGGGTCTGT TTGGTGGCTT 720  
 CATTTCAATG GGGCAAATCC TCTCCTTACC TATGGTGATC ATCGGTATTT TGATGATGGT 780  
 TTGGTCTTAC AAGCGCGGTT TGTATCAAGA CCGTGTAGCA GCAAAATAGG GTAGTTAGGT 840  
 GAAACAGTAT TTAGATCTTT GTCAGCGCAT CGTCGATCAA GGTGTTTGGG TTGAAAATGA 900  
 ACGAACGGGC AAGCGTTGTT TGA CTGTGAT TAATGCCGAT TTGACCTACG ATGTGGGCAA 960  
 CAATCAGTTT CCTCTAGTGA CTACACGCAA GAGTTTTTGG AAAGCTGCCG TAGCCGAGTT 1020  
 GCTCGGCTAT ATTCGTGGTT ACGATAATGC GGCGGATTTT CGCCAATTAG GTACCAAAAC 1080  
 CTGGGATGCT AATGCCAATT TAAACCAAGC ATGGCTCAAC AATCCTTACC GTAAAGGTGA 1140  
 GGATGACATG GGACGCGTGT ATGGTGTTCA GGGTAGAGCT TGGGCTAAGC CTGATGGTGG 1200  
 TCATATTGAC CAGTTGAAAA AGATTGTTGA TGATTGAGC CGTGGCGTTG ATGACCGAGG 1260  
 TGAAATTCTT AACTTCTACA ATCCGGGTGA ATTCACATG GGGTGTTTGC GCCCTTG CAT 1320  
 GTACAGCCAT CATTTTTT CAT TGCTGGGGGA TACCTTGAT CTCAACAGTA CTCAGCGTTC 1380  
 ATGTGATGTG CCCTTGGGGT TGAATTTCAA CATGGTGACG GTTTATGTGT TCCTTGCCT 1440  
 GATGGCACAG ATCACAGGA AAAAGCCGGG CTTGGCGTAT CACAAGATCG TCAATGCGCA 1500

## Obr. 1 (pokrač.)

CATTACCAA GATCAACTCG AATTGATGCG CGATGTGCAG CTAAAACGTG AGCCATTCCC 1560  
 AGCGCCTCAG TTCCATATCA ATCCAAAGAT TAAAACACTG CAGGATTTGG AAACCTGGGT 1620  
 CACTTTGGAT GATTTTGACG TCACCGGATA TCAGTTCCAC GATCCTATTC AATACCCGTT 1680  
 TTCAGTCTAA TCCCGTATTC AGGCGGTATG GCTTGATGGG TTTTATATAA AAAAAGCTCC 1740  
 CGAAGGTCGG GAGCTTTTTT TATACAGATG ATGCTTTAAC GCTTAAGCGG TTAGGGCAAG 1800  
 AATGCTGCCG GGGATGACGA CAAACACACC CAATAAGTAA CTCACCACCA CCATTTTGCT 1860  
 CTTACAAGCC CAAGTTGAGA TGAGCTCAGC ACCTTTAATA GGCAGTTTCG GTAAGAAAGG 1920  
 AATACCGTAA ATCAAGACCG TAGCCATCAA GTTAAAGCTT AAGTGCACCA GCGCAATTG 1980  
 CAGAGCAAAC ACGGCAAAC CACCAGAGAC AGCGGTTGCG GCGAGCAGAG CAGTAATACA 2040  
 AGTGCCAATG TTCGCACCTA AGGTAAATGG GTAGATTTCA CGCACTTTCA GCACGCCAGA 2100  
 GCCCACGAGA GGAACCATTG GGCTGGTTGT GGTGATGAA GATTGAACTA ATACCGTAAC 2160  
 CACTGTACCT GAAGCAATAC CGTGTAGTGG GCCTCGGCCA ATCGCATTTT GTAGAATTC 2220  
 ACGTGCGCGG CCAACCATCA AACTCTTCAT CAGTTTGCCC ATCACCCTAA TGGCGACGAA 2280  
 AATGGTCGCA ATACCCAATA CGATAAGTGC GACACCACCG AAAGTATTAC CCAATACCGA 2340  
 AAGCTGGGTT TCAAGCCCTG TGATGACAGG TTTGGTAATC GGTGATAA AATCAAAACC 2400  
 TTTTCATGCTC ATATCGCCAG TCGCAAGCAG AGGCGAAACG AGCCAGTGTG AGACTTTCTC 2460  
 TAAATGCCA AACATCATTT CTAGAGGTAG GAAGATCAGC ACCGCGAGAA GATTGAAAAA 2520  
 ATCGTGGATG GTGGCACTGG CGAAAGCAGC GCGAAACTCT TCTTTACAGC GCATATGGCC 2580  
 AAGGCTGACG AGAGTATTGG TCACAGTAGT ACCAATATTG GCACCCATCA CCATAGGAAT 2640  
 CGCGGTTTCA ACCGGTAACC CACCGGCAAC GAGACCAACA ATAATAGAAG TCACCGTGCT 2700  
 TGAGGATTGA ATCAGTGCCG TTGCCACTAA ACCAATCATC AATCCTGCAA TTGGGTGGGA 2760  
 AGCAAATTCA AATAGAACTT TGGCTTGATC GCCGGTTGCC CATTTAAAAC CGCTGCCGAC 2820  
 CATCGCGACT GCAAGAAGTA GTAAATACAG CATGAAAGCC AAGTTTGCCC AACGTAGGCC 2880  
 TTTGCTGGTC AGCGAAATCG GCGCTGCAG 2909

## Obr. 2

Sekvence id. č. 2

GAGAAGGTTT GTTATGCCTC AGGGTTATCT GCAGTTTCCC AATATTGACC CCGTATTGTT 60  
 TTCGATCGGC CCTCTAGCGG TCGCTGGTA TGGCTTGATG TATTGGTGG GTTTCCTTTT 120  
 TGCTATGTGG TTGGCCAATC GCCGAGCGGA TCGCGCGGC AGTGGTTGGA CGCGTGAGCA 180  
 AGTCTCTGAC TTGTTATTCG CCGGCTTTTT AGGTGTAGTG ATCGGTGGCC GAGTTGGTTA 240  
 TGTGATCTTC TACAATTTTG ATCTGTTCTT TGCTGACCCT CTTTATTTAT TCAAAGTGTG 300  
 GACTGGCGGC ATGTCCTTCC ACGGCGGCTT ATTGGGTGTG ATCACCGCCA TGTTCTGGTA 360  
 TCGCGTAAA AACCAACGCA CCTTCTTTGG TGTGGCGAT TTTGTTGCCC CTTTAGTGCC 420  
 ATTGGTTTTG GGGATGGGAC GTATCGGTAA CTTTATGAAT AGTGAACTTT GGGGACGAGT 480  
 AACGGATGTG CCTTGGGCTT TTGTATTCCC TAATGGTGGC CCACTGCCGC GCCATCCTTC 540  
 ACAGCTTTAT GAATTCGCCT TAGAAGGCGT GGTTCGTTC TTTATCTTA ATTGGTTTAT 600  
 TGGTAAACCT CGTCCGCTAG GCAGCGTATC CGGACTGTTT TTAGCTGGAT ACGGTACATT 660  
 CCGCTTCCTT GTGGAATACG TCCGTGAGCC AGATGCTCAG TTGGGTCTGT TTGGTGGCTT 720  
 CATTTCATG GGGCAAATCC TCTCCTTACC TATGGTGATC ATCGGTATTT TGATGATGGT 780  
 TTGGTCTTAC AAGCGCGGTT TGTATCAAGA CCGTGTAGCA GCAAAATAGG GTAGTTAG 838

## Obr. 3

Sekvence id. č. 3

```

TAATCCCGTA TTCAGGCGGT ATGGCTTGAT GGGTTTTATA TAAAAAAGC TCCCGAAGGT 60
CGGGAGCTTT TTTTATACAG ATGATGCTTT AACGCTTAAG CGGTTAGGGC AAGAATGCTG 120
CCGGGGATGA CGACAAACAC ACCCAATAAG TAACTCACCA CCACCATTTT GCTCTTACAA 180
GCCCCAAGTTG AGATGAGCTC AGCACCTTTA ATAGGCAGTT CGCGTAAGAA AGGAATACCG 240
TAAATCAAGA CCGTAGCCAT CAAGTTAAAG CTTAAGTGCA CCAGCGCAAT TTGCAGAGCA 300
AACACGGCAA ACTCACCAGA GACAGCGGTT GCGGCGAGCA GAGCAGTAAT ACAAGTGCCA 360
ATGTTTCGCAC CTAAGGTAAA TGGGTAGATT TCACGCACTT TCAGCACGCC AGAGCCCACG 420
AGAGGAACCA TTAGGCTGGT TGTGGTCGAT GAAGATTGAA CTAATACCGT AACCACTGTA 480
CCTGAAGCAA TACCGTGTAG TGGGCCTCGG CCAATCGCAT TTTGTAGAAT TTCACGTGCG 540
CGGCCAACCA TCAAACCTCTT CATCAGTTTG CCCATCACCG TAATGGCGAC GAAAATGGTC 600
GCAATACCCA ATACGATAAG TGCGACACCA CCGAAAGTAT TACCCAATAC CGAAAGCTGG 660
GTTTCAAGCC CTGTGATGAC AGGTTTGGA ATCGGTTTGA TAAATCAAA ACCTTTCATG 720
CTCATATCGC CAGTCGCAAG CAGAGGCGAA ACGAGCCAGT GTGAGACTTT CTCTAAAATG 780
CCAAACATCA TTTCTAGAGG TAGGAAGATC AGCACCGCGA GAAGATTGAA AAAATCGTGG 840
ATGGTGGCAC TGGCGAAAGC ACGGCGAAAC TCTTCTTTAC AGCGCATATG GCCAAGGCTG 900
ACGAGAGTAT TGGTCACAGT AGTACCAATA TTGGCACCCA TCACCATAGG AATCGCGGTT 960
TCAACCGGTA ACCCACCAGC AACGAGACCA ACAATAATAG AAGTCACCGT GCTTGAGGAT 1020
TGAATCAGTG CCGTTGCCAC TAAACCAATC ATCAATCCTG CAATTGGGTG GGAAGCAAAT 1080
TCAAATAGAA CTTTGGCTTG ATCGCCGGTT GCCCATTTAA AACCCTGCC GACCATCGCG 1140
ACTGCAAGAA GTAGTAAATA CAGCATGAAA GCCAAGTTTG CCCAACGTAG GCCTTTCGTG 1200
GTCAGCGAAA TCGGCGCTGC AG 1222

```

## Obr. 4

Sekvence id. č. 4

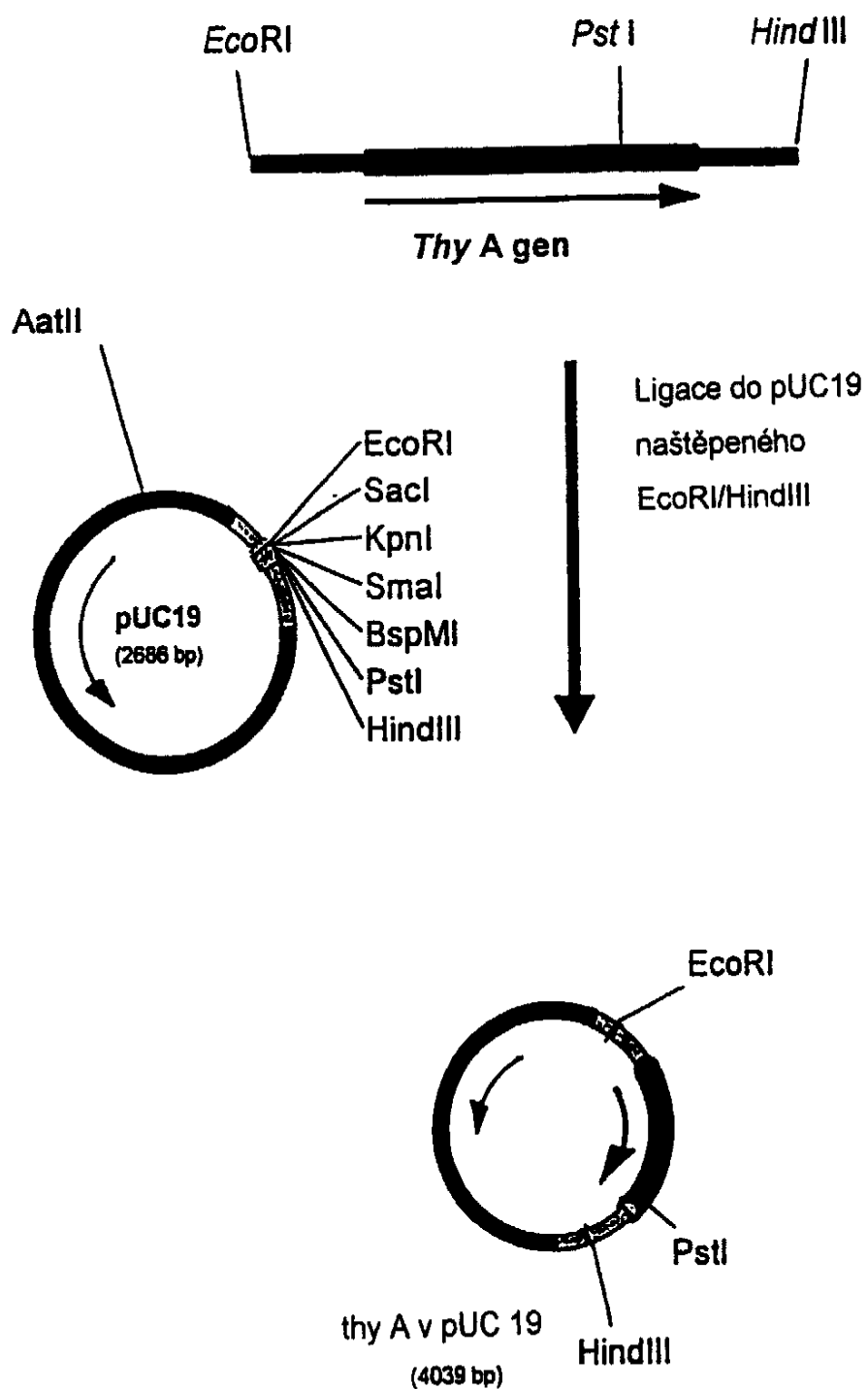
Val Lys Gln Tyr Leu Asp Leu Cys Gln Arg Ile Val Asp Gln Gly Val  
 1 5 10 15  
 Trp Val Glu Asn Glu Arg Thr Gly Lys Arg Cys Leu Thr Val Ile Asn  
 20 25 30  
 Ala Asp Leu Thr Tyr Asp Val Gly Asn Asn Gln Phe Pro Leu Val Thr  
 35 40 45  
 Thr Arg Lys Ser Phe Trp Lys Ala Ala Val Ala Glu Leu Leu Gly Tyr  
 50 55 60  
 Ile Arg Gly Tyr Asp Asn Ala Ala Asp Phe Arg Gln Leu Gly Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Thr Trp Asp Ala Asn Ala Asn Leu Asn Gln Ala Trp Leu Asn Asn Pro  
 85 90 95  
 Tyr Arg Lys Gly Glu Asp Asp Met Gly Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly  
 100 105 110  
 Arg Ala Trp Ala Lys Pro Asp Gly Gly His Ile Asp Gln Leu Lys Lys  
 115 120 125  
 Ile Val Asp Asp Leu Ser Arg Gly Val Asp Asp Arg Gly Glu Ile Leu  
 130 135 140  
 Asn Phe Tyr Asn Pro Gly Glu Phe His Met Gly Cys Leu Arg Pro Cys  
 145 150 155 160  
 Met Tyr Ser His His Phe Ser Leu Leu Gly Asp Thr Leu Tyr Leu Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Gln Arg Ser Cys Asp Val Pro Leu Gly Leu Asn Phe Asn Met  
 180 185 190  
 Val Gln Val Tyr Val Phe Leu Ala Leu Met Ala Gln Ile Thr Gly Lys  
 195 200 205  
 Lys Pro Gly Leu Ala Tyr His Lys Ile Val Asn Ala His Ile Tyr Gln  
 210 215 220  
 Asp Gln Leu Glu Leu Met Arg Asp Val Gln Leu Lys Arg Glu Pro Phe  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Pro Gln Phe His Ile Asn Pro Lys Ile Lys Thr Leu Gln Asp  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Trp Val Thr Leu Asp Asp Phe Asp Val Thr Gly Tyr Gln  
 260 265 270  
 Phe His Asp Pro Ile Gln Tyr Pro Phe Ser Val  
 275 280

## Obr. 5

Sekvence id. č. 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Gln | Gly | Tyr | Leu | Gln | Phe | Pro | Asn | Ile | Asp | Pro | Val | Leu | Phe | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Ile | Gly | Pro | Leu | Ala | Val | Arg | Trp | Tyr | Gly | Leu | Met | Tyr | Leu | Val | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Phe | Leu | Phe | Ala | Met | Trp | Leu | Ala | Asn | Arg | Arg | Ala | Asp | Arg | Ala | 35  | 40  | 45  |     |
| Gly | Ser | Gly | Trp | Thr | Arg | Glu | Gln | Val | Ser | Asp | Leu | Leu | Phe | Ala | Gly | 50  | 55  | 60  |     |
| Phe | Leu | Gly | Val | Val | Ile | Gly | Gly | Arg | Val | Gly | Tyr | Val | Ile | Phe | Tyr | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Asn | Phe | Asp | Leu | Phe | Leu | Ala | Asp | Pro | Leu | Tyr | Leu | Phe | Lys | Val | Trp | 85  | 90  | 95  |     |
| Thr | Gly | Gly | Met | Ser | Phe | His | Gly | Gly | Leu | Leu | Gly | Val | Ile | Thr | Ala | 100 | 105 | 110 |     |
| Met | Phe | Trp | Tyr | Ala | Arg | Lys | Asn | Gln | Arg | Thr | Phe | Phe | Gly | Val | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Asp | Phe | Val | Ala | Pro | Leu | Val | Pro | Phe | Gly | Leu | Gly | Met | Gly | Arg | Ile | 130 | 135 | 140 |     |
| Gly | Asn | Phe | Met | Asn | Ser | Glu | Leu | Trp | Gly | Arg | Val | Thr | Asp | Val | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Trp | Ala | Phe | Val | Phe | Pro | Asn | Gly | Gly | Pro | Leu | Pro | Arg | His | Pro | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gln | Leu | Tyr | Glu | Phe | Ala | Leu | Glu | Gly | Val | Val | Leu | Phe | Phe | Ile | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| Asn | Trp | Phe | Ile | Gly | Lys | Pro | Arg | Pro | Leu | Gly | Ser | Val | Ser | Gly | Leu | 195 | 200 | 205 |     |
| Phe | Leu | Ala | Gly | Tyr | Gly | Thr | Phe | Arg | Phe | Leu | Val | Glu | Tyr | Val | Arg | 210 | 215 | 220 |     |
| Glu | Pro | Asp | Ala | Gln | Leu | Gly | Leu | Phe | Gly | Gly | Phe | Ile | Ser | Met | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gln | Ile | Leu | Ser | Leu | Pro | Met | Val | Ile | Ile | Gly | Ile | Leu | Met | Met | Val | 245 | 250 | 255 |     |
| Trp | Ser | Tyr | Lys | Arg | Gly | Leu | Tyr | Gln | Asp | Arg | Val | Ala | Ala | Lys |     | 260 | 265 | 270 |     |

## Obr. 6



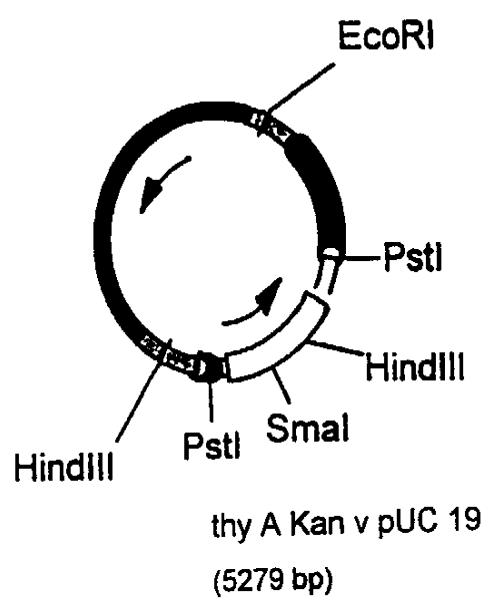
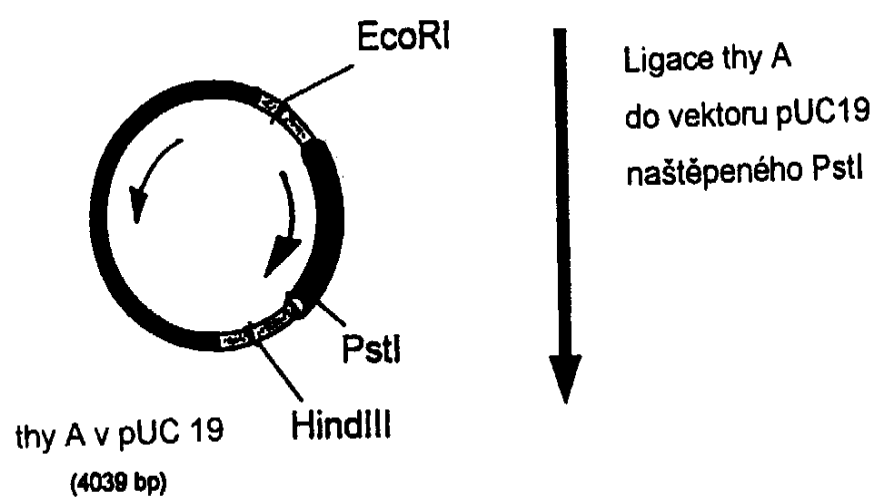
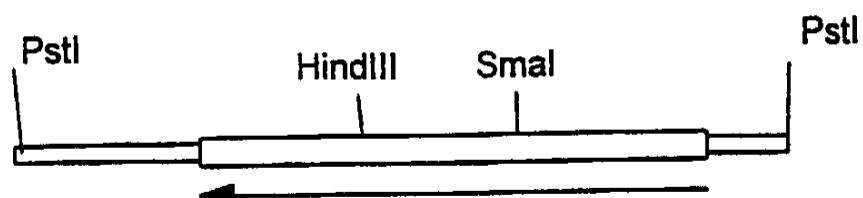
```

E. coli      : PLPKLIIRKPESIFDY----RFEDFEIEGYDPHPGIKAPVAI
              | :: |::| ::|      ::||::||: | |: |::
V. cholerae  : PAPQPHINPKIKTLQDLETWVTLDDFDVTGYQFHDPIQYFFSV
              | ::|
H. influenza: PLPKELINPDIKTLEDLETWVTLDDFDKVVGYOSHEPIKYFFSV

```

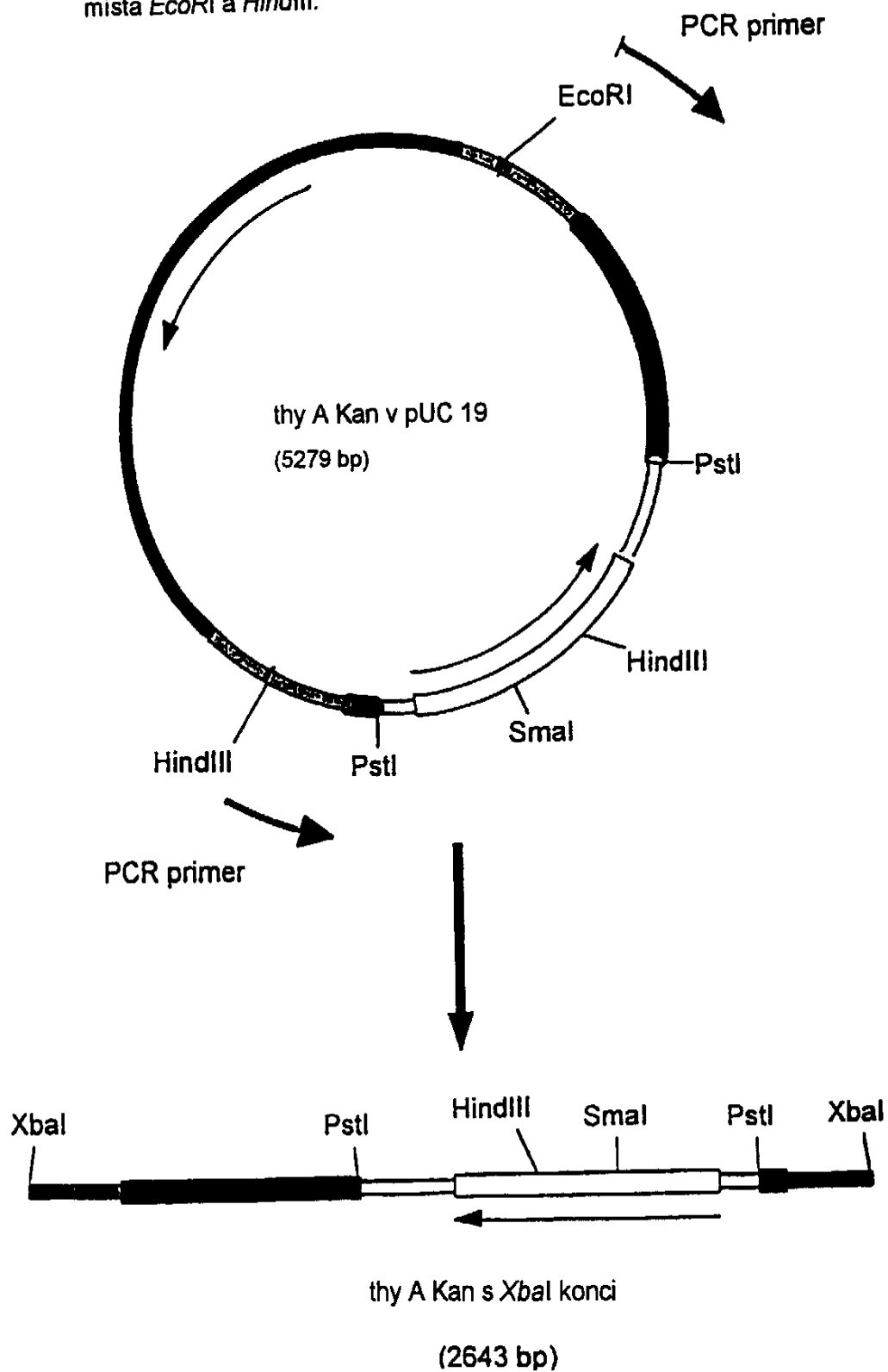
## Obr. 8

štěpení genového bloku Kan  
z pUC4K enzymem PstI

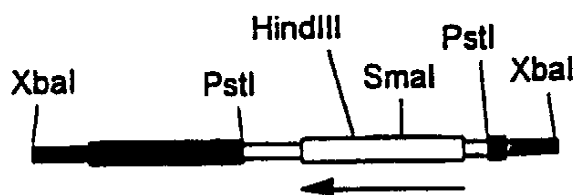


## Obr. 9

PCR pro vytvoření fragmentu thyA-kan-ThyA s konci XbaI.  
Primery byly vybrány tak, aby byla eliminována  
místa EcoRI a HindIII.

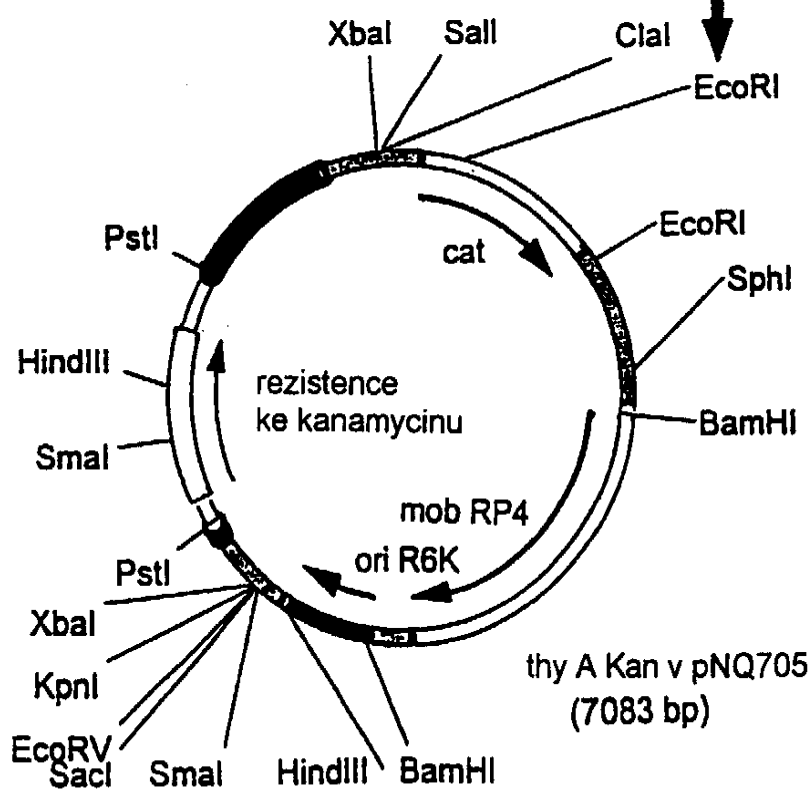
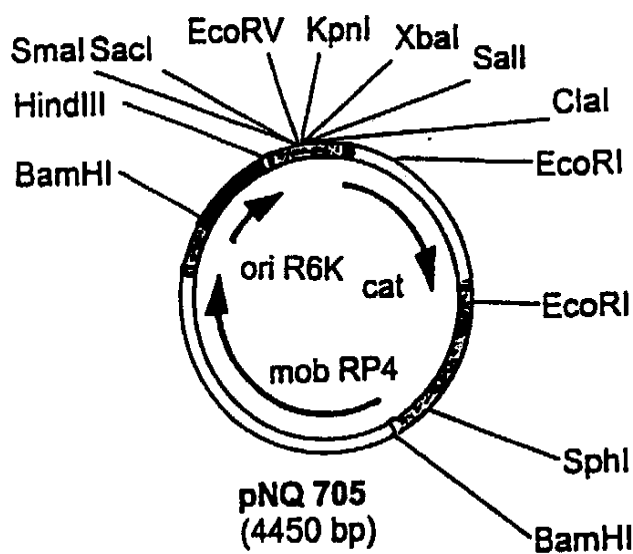


## Obr. 10

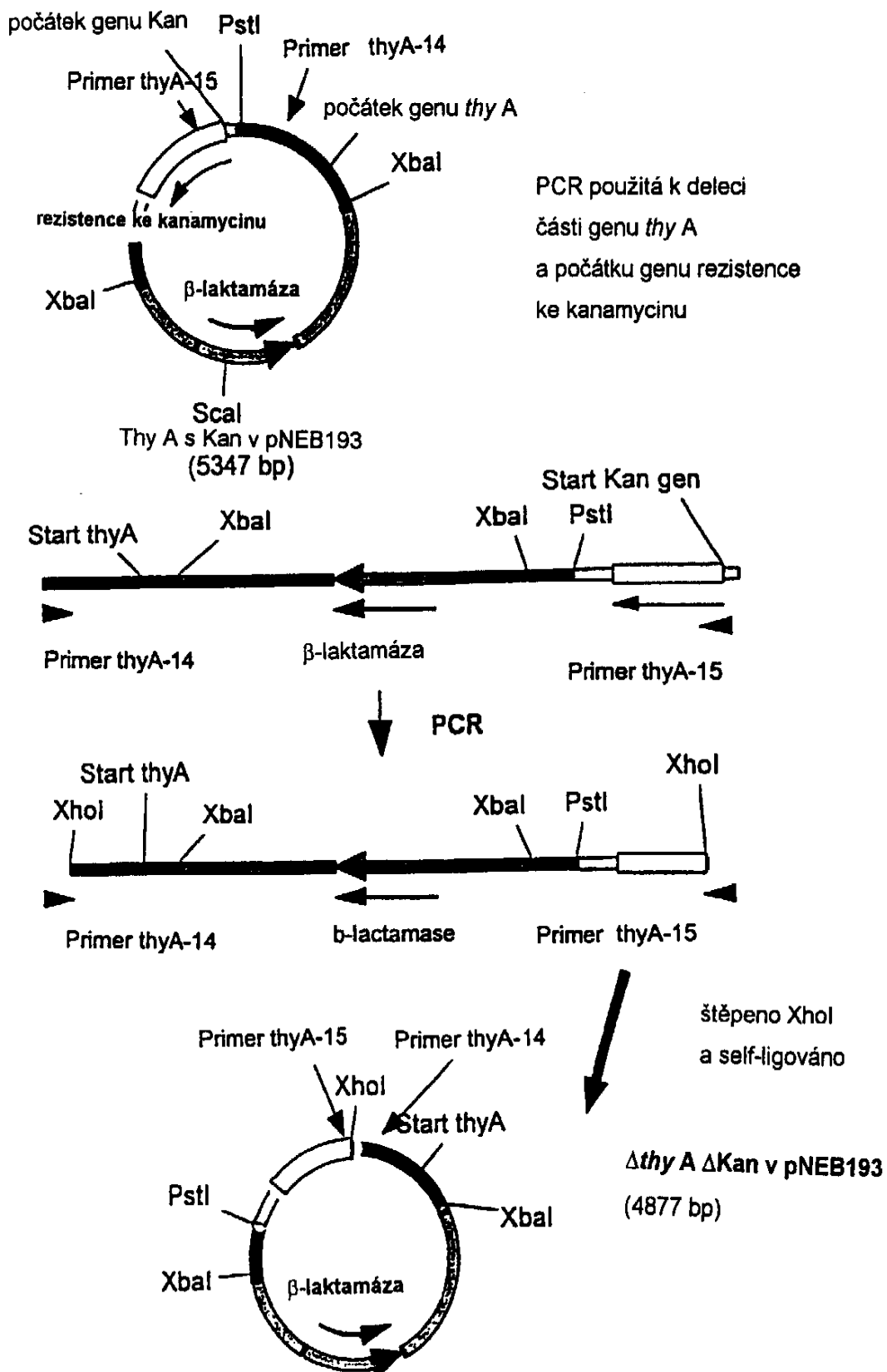


thy A Kan s XbaI konci  
(2643 bp)

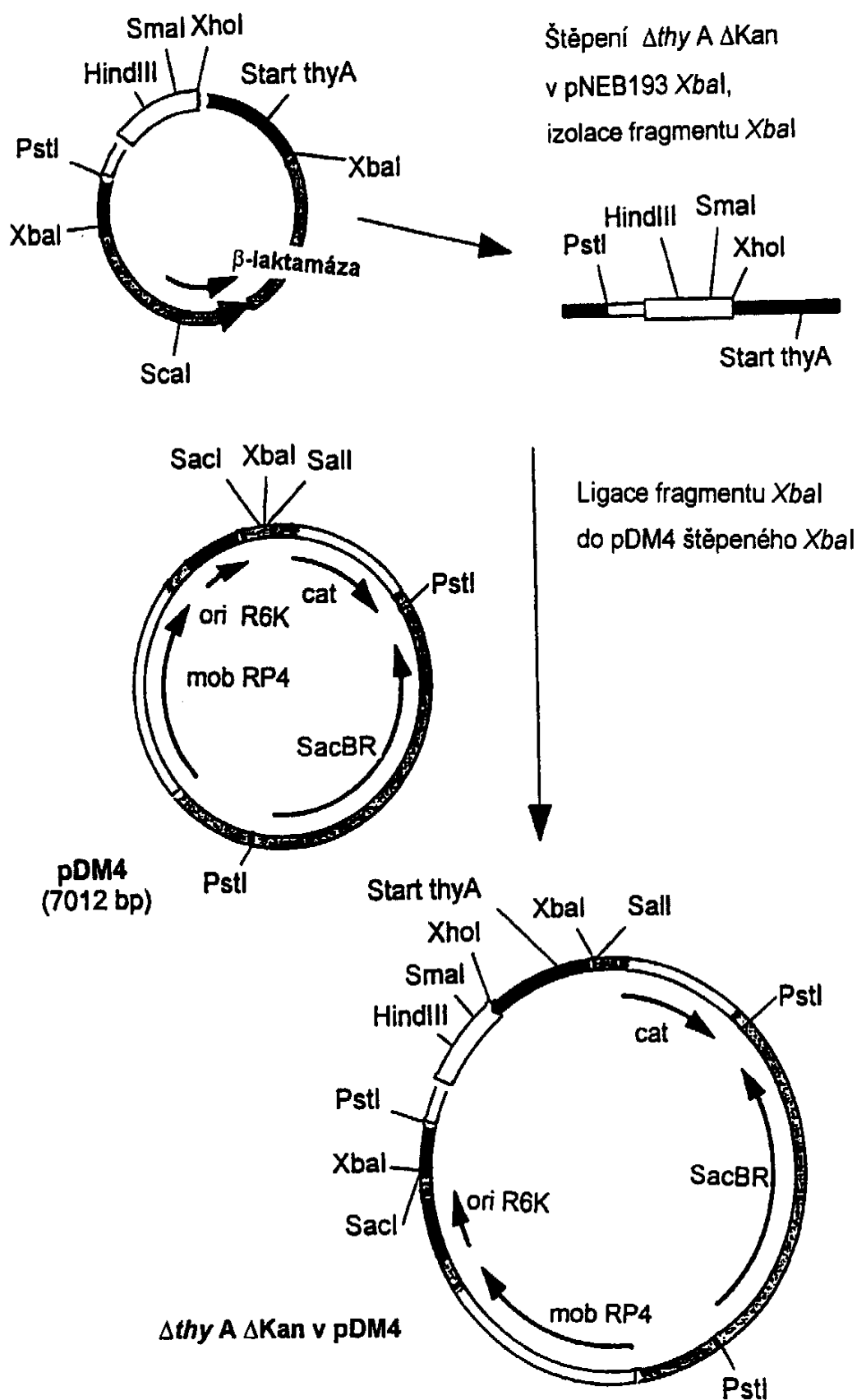
Ligace fragmentu thy A Kan  
s XbaI konci do pNQ705  
naštěpeného XbaI



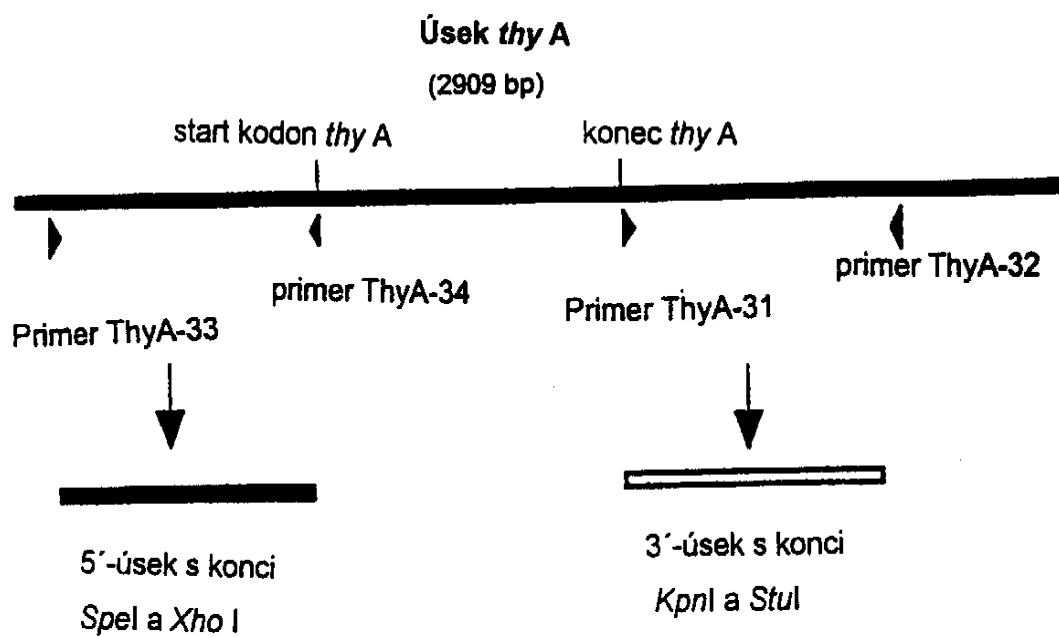
## Obr. 11



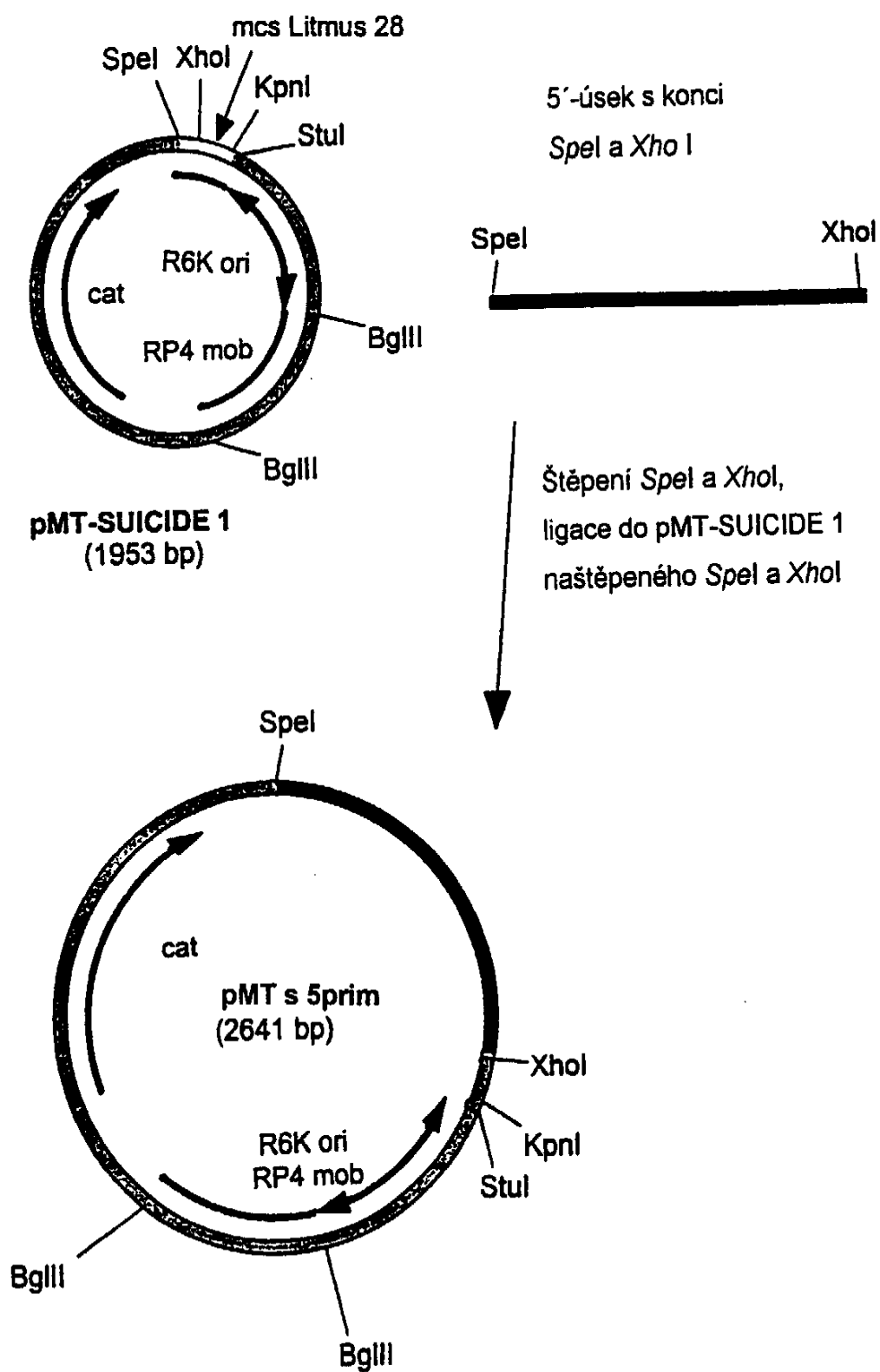
## Obr. 12

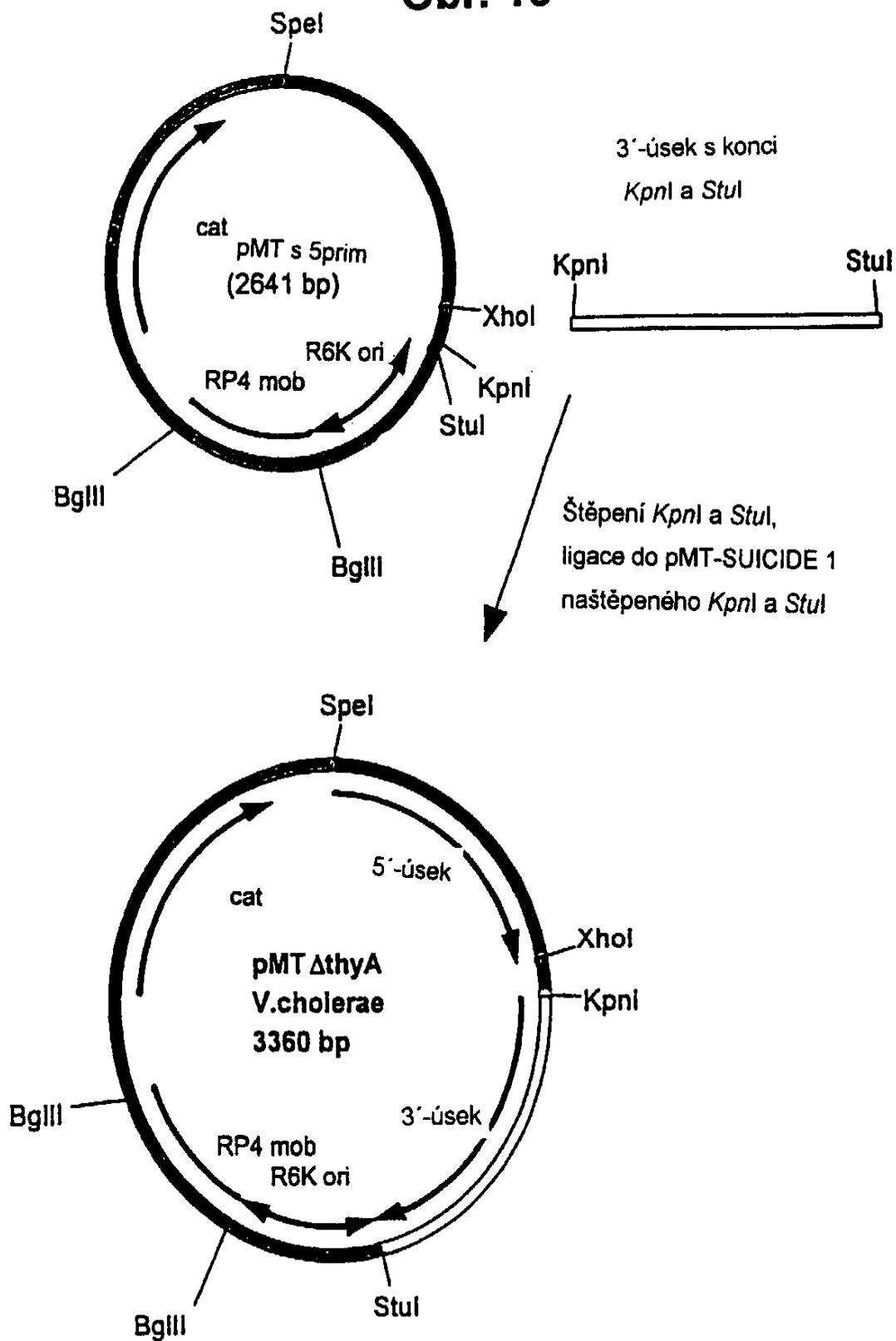


## Obr. 13

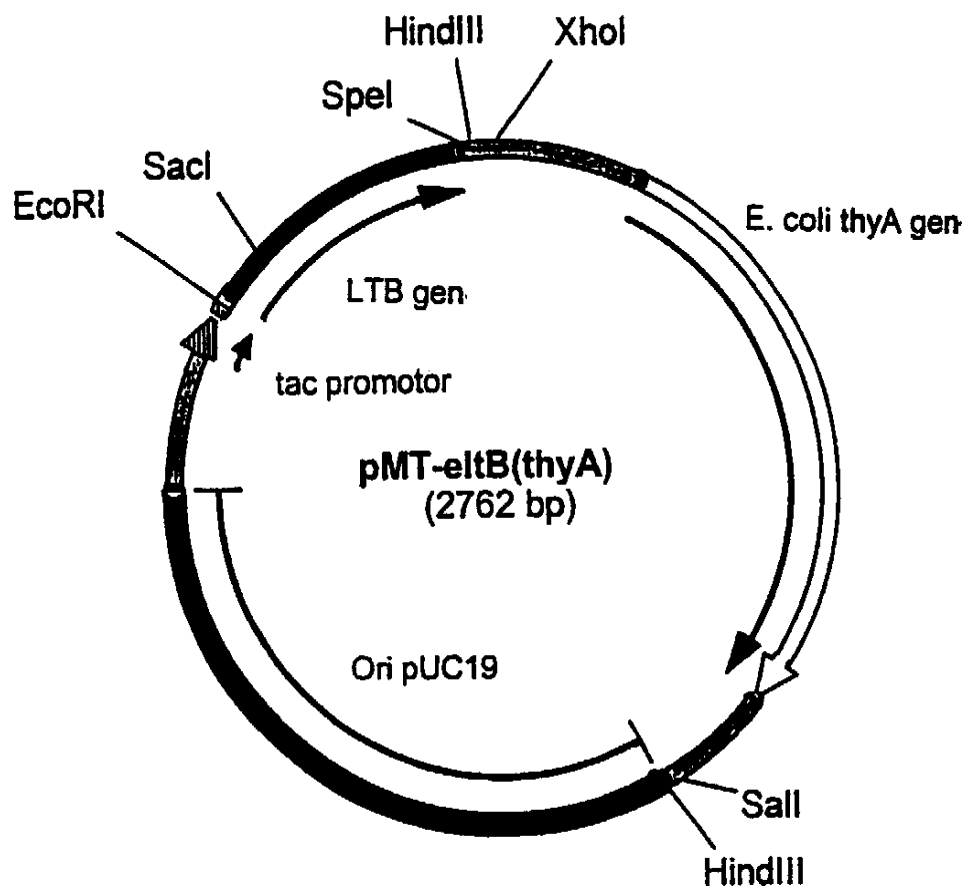


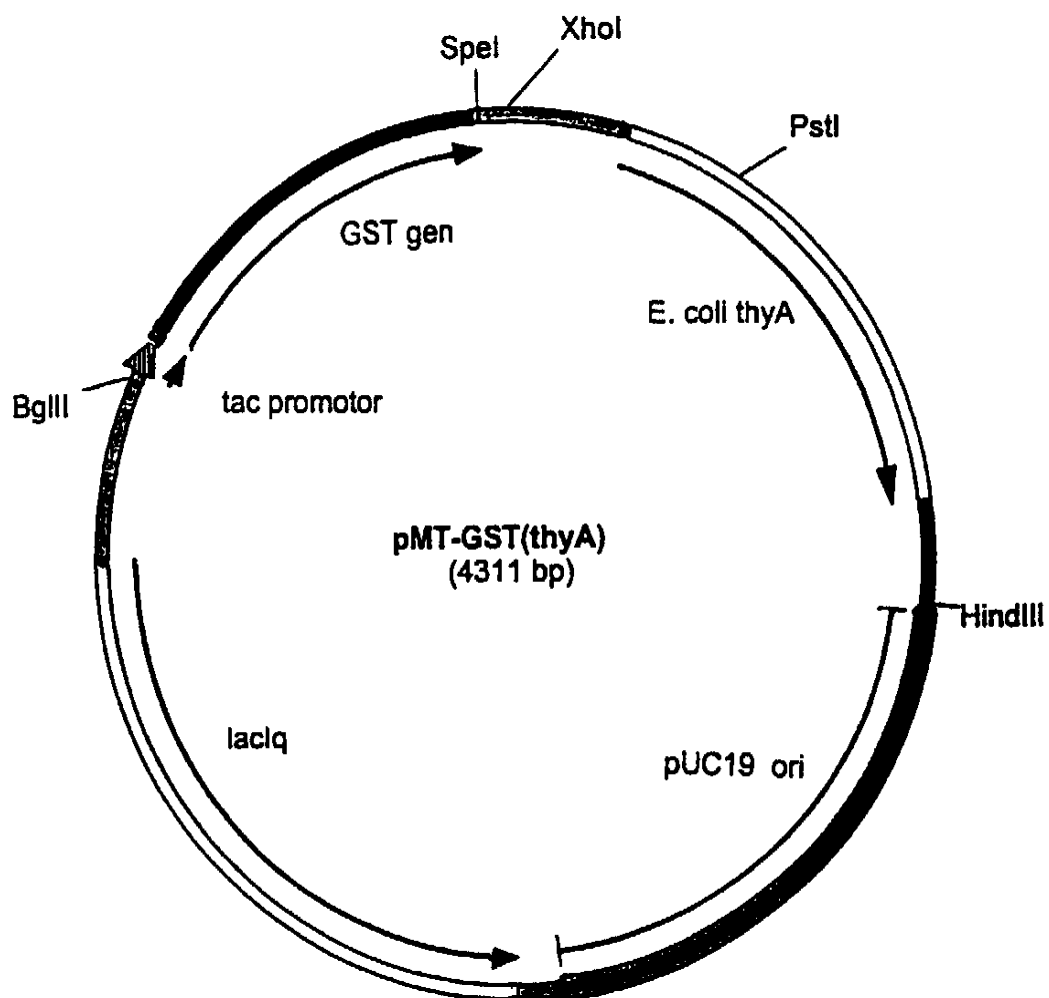
## Obr. 14



**Obr. 15**

# Obr. 16



**Obr. 17**

---

Konec dokumentu

---