

2500/91

2764 1

191

**KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY**

Eljárás tetraciklin és klórtetraciklin szintézisét kódoló
fragmentum klónozására, és a klónozott fragmentumok
expresszállására

American Cyanamid Co., Stamford, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 07. 25.

Elsőbbsége: 1990. 07. 26. (558,039)

Amerikai Egyesült Államok

KIVONAT

~~(A klór-tetraciklin és tetraciklin képződés
bioszintézis útjának klónozása Streptomyces aureofaciens-
től, és expressziója Streptomyces lividansban)~~

A jelen találmány tárgya Streptomyces
aureofaciensből izolált DNS klónozása, amely tetraciklin és
klór-tetraciklin szintézisét vezérli heterológ
gazdaszervezetben, például Streptomyces lividansban. Az
igénypontokban szereplő plazmidokat egy Escherichia coliban
készült kozmid-könyvtár átvizsgálásával izoláljuk, azon az
alapon, hogy Streptomyces lividansban tetraciklin
rezisztenciát okoznak.

Földvár

2500/91

2784 1

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA Kft.

Budapest

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY** , A

PN05

C12N15/31

C12N15/26

Eljárás tetraciklin és klórtetraciklin szintézisét kódoló
fragmentum klónozására és a klónozott fragmentumok
expresszállására

American Cyanamid Co., Stamford, Amerikai Egyesült Államok

Feltalálók:

LOTVIN Jason A.,	Union, New Jersey,
RYAN Michale J.,	West Milford, New Jersey,
STRATHY Nancy,	Monsey, New Jersey,
	Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 07. 25.

Elsőbbsége: 1990. 07. 26. (558,039)
Amerikai Egyesült Államok

72785-1846 TF

A találmány tárgya molekuláris genetikai technikák alkalmazása a klórtetraciklin teljes bioszintézisútját kódoló géncsoport (DNS) klónozására, valamint ezzel a módszerrel a tetraciklin bioszintézis-útjának klónozására is *Streptomyces aureofaciens*ből, és ezek expressziójára a *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben. Az izolált bioszintetikus géncsoport szolgál szubsztrátként a megnövelt fermentációs szint elérését célzó technológiai kísérletekben, valamint az új antibiotikum struktúrák előállításában.

A klórtetraciklin és származék vegyületeit (például a tetraciklint, demetil-klórtetraciklint, demetil-tetraciklint), kereskedelmi mennyiségben állítják elő süllyesztett, levegőztetett fermentációval *Streptomyces aureofaciens* mikroorganizmus alkalmazásával (Dugar, 1948). Ennek a mikroorganizmusnak több mint 30 éves ipari célú manipulálása eredményeképpen kifinomult fermentációs technikák és táptalaj összetételek alakultak ki, amelyek lehetővé tették a fermentációs kitermelés jelentős emelkedését (Goodman, 1985). A kitermelés ilyen javulását elősegítette olyan *Streptomyces aureofaciens* mutánsok izolálása, amelyek megnövekedett antibiotikum-termelő képességgel rendelkeznek (Veselova, 1969). Ezeket a magas termelőképességű mutánsokat főleg mutagén kezeléssel, majd a megnövekedett kitermelésre való véletlenszerű szelekcióval állították elő. Ugyanez a technika tette lehetővé az antibiotikum bioszintézisben blokkolt mutánsok előállítását, amelyek igen hasznos eszközei a

klórtetraciklin keletkezés bioszintézis útjának felderítésében (McCormick, 1968). Ezen hozzájárulások nélkül a klórtetraciklin bioszintézis genetikai szabályozása nem lett volna teljesen megvalósítható. A Streptomyces genetika területén lejátszódó legújabb fejlődés lehetővé tette hogy az iparilag fontos metabolitokat termelő szervezetek molekuláris genetikáját tanulmányozzuk.

A kromoszómális markerek rekombinációjának igazolása Streptomyces protoplasztok fúziójával és azt követő regenerálásával (Hopwood et al., 1978; Baltz et al., 1981) egy döntő lépés volt az aktinomicéták genetikájában. Míg a protoplaszt-fúziós technika kifejlődése előtt a genetikai keresztezéseket csak néhány, konjugációs rendszerrel rendelkező fajban lehetett megbízhatóan kimutatni (Hopwood, 1967), most a genetikai elemzéseket bármely olyan fajban el lehet végezni, amelyből protoplasztok készíthetők és azok regenerálhatók. Még fontosabb, hogy a protoplasztok a későbbiekben ideális szubsztrátnak bizonyultak a plazmid DNS-sel való transzformációhoz, így megteremtve annak lehetőségét hogy ezekben a mikroorganizmusokban rekombináns DNS kísérleteket végezhessünk (Bibb et al., 1978). Számos antibiotikum rezisztencia gén izolálása, úgymint a tiostrepton, viomicin és neomicin rezisztencia géneké, lehetővé tette a könnyen szelektálható klónozó vektorok készítését a Streptomycesek saját plazmidjai alapján (Thompson et al., 1982).

A egyik elsőnek klónozott antibiotikum bioszintézis

gén az undecil-prodigiozin (UDP) antibiotikus hatású pigment keletkezésében szerepet játszó O-metil-transzferáz volt (Feitelson et al., 1980). A gént azon az alapon azonosították, hogy az UDP bioszintézisútjának ismert mutációját képes volt komplementálni. Az ezekben a korai erőfeszítésekben bioszintézis gének izolálására alkalmazott más technikák tartozott a metilenomicin esetében a mutációs klónozás, az OC31 fág alkalmazásával (Chater et al., 1983), az aktinomicin fenoxazinon szintetáz esetében a rekombináns klónok sib szelekciója *in vitro* enzimvizsgálatokban (Jones et al., 1984), valamint a kandicidin termelésben a p-amino-benzoészav szintetáz által biztosított szulfonamid rezisztencia (Gil et al., 1983). A bialaphos bioszintézis géneket a blokkolt mutánsok komplementációja alapján azonosították (Murakami et al., 1986).

Az aktinorodin bioszintézisben szereplő géneket a *Streptomyces coelicolor* blokkolt mutánsainak komplementációja alapján klónozták (Malpartida et al., 1984). Ez utóbbi esetben két olyan átfedőklónt kombináltak egyetlen plazmidon, amelyek különböző osztályba tartozó mutánsokat komplementáltak, és amelyekről igazolták, hogy ha a heterológ *Streptomyces parvulus* gazdaszervezetbe bejuttatják, akkor azt aktinorodin bioszintézisére teszi képessé.

Egy másik fontos megfigyeléssorozat az volt, hogy az antibiotikum bioszintézis génjei fizikailag kapcsolódnak az(ok)hoz a rezisztencia determináns(ok)hoz, amelyek az adott antibiotikumhoz tartoznak az adott

mikroorganizmusban. Egy *Streptomyces griseus*-ból származó, streptomycin rezisztenciát kódoló DNS fragmentről igazolták, hogy folyamatosan kapcsolódik ahhoz a DNS-hez, amelyik a bioszintézis blokkokat komplementálja (Distler et al., 1985). Ugyanez a helyzet tapasztalható *Streptomyces fradiae*-ben, ahol a bioszintézis géneket úgy azonosították, hogy a tilozin bioszintézis út végső enzimének aminosav terminálisa alapján készített kevert oligonukleotiddal mint próbával vizsgálták át egy kozmid könyvtárat a homológiákat keresve (Fishman et al., 1989). Egy korábban klónozott tilozin rezisztencia génről (*tlrB*) kimutatták, hogy abban a DNS-régióban található, amely kilenc különböző blokkolt mutánst képes komplementálni (Baltz et al., 1988). A puromicin (Var2 et al., 1988) és a tetracenomicin esetében (Motamedi et al., 1987) a *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben expresszálandó antibiotikum rezisztenciára való primer szelekcióval vált lehetővé az ugyanazon a klónozott DNS fragmenten található antibiotikum bioszintézis gének azonosítása.

A nukleinsav próbák alkalmazása elősegítette a bioszintézis gének izolálását. Ez a megközelítés azokon a már létező információkon alapul, melyeket a bioszintézis útról vagy korábbi klónozási kísérletekből szereztek. Tehát az előzőekben leírt tilozin esetben próbát készítettünk egy bioszintézis enzim részleges aminosav szekvenciája alapján (Fishman et al., 1987). Hasonlóképpen, az izopenicillin N szintetáz génjét *Streptomyces clavuligerus*-ból klónozták egy olyan klón azonosításával, amely az enzim N-terminális

aminosav szekvenciája alapján készült próbához hibridizál (Leskiw, 1988). Az eritromicin bioszintézisben szereplő géneket azon az alapon azonosítottak, hogy mind egy korábban klónozott rezisztencia determinánshoz hibridizáltak, (Butler et al., 1989), mind egy szintetikus oligonukleotidhoz, amely az anhidro-tetraciklin-oxigenáz bioszintézis enzim (Binnie antitest al., 1989) részlegesen felderített aminosav szekvenciája alapján meghatározott DNS szekvenciát reprezentál. Az actI és actII heterológ próbák lehetővé tették *Streptomyces peucetius*-ban (Stutzman-Engwall et al., 1989) az antraciklin bioszintézisben szereplő gének azonosítását.

Ezeknek a technikáknak az alkalmazása egyenként vagy kombinációban lehetővé tette a teljes bioszintézis út izolálását vagy összeállítását, és néhány esetben heterológ gazdaszervezetben való expressziójukat. A bialaphos teljes bioszintézis clusterét a komplementáló aktivitásokra való szelekciók és a bialaphos rezisztencia heterológ expressziója alapján klónozták (Murakami et al., 1986). Jóllehet említik a teljes bioszintézis út sikeres izolálását *Streptomyces lividans*-ban egyetlen lépésben, de nem említik a bioszintézis gének expresszióját. Az aktinirodin cluster összeállítását a komplementáló klónokból és expresszióját *Streptomyces parvulus*-ban az előzőekben tárgyaltuk (Malpartida et al., 1984).

Egy homológ eredetű eritromicin rezisztencia determinánshoz hibridizáló bifunkcionális kozmid klónt izoláltak *Saccharopolyspora erythraea* könyvtárból, és

igazolták, hogy *Streptomyces lividans*-ba átville eritromicin szintézist eredményez (Stanzak et al., 1986). Egy mind egy oxitetraciklin rezisztencia gén próbához, mind egy bioszintézis gén próbához (anhidro-tetraciklin-oxigenáz) hibridizáló *Escherichia coli* kozmid klón lehetővé tette az oxitetraciklin bioszintézis cluster klónozását *Streptomyces rimosus*-ból (Binnie et al., 1989). A *Streptomyces* plazmidban való ezt követő szubklónozás lehetővé tette az oxitetraciklin termelését *Streptomyces lividans*-ban.

A tetracenomicin termelőből előállított két átfedő klónt azon az alapon azonosították, hogy a *Streptomyces glaucescens* blokkolt mutánsait komplementálták, és képesek voltak a *Streptomyces lividans*-t tetracenomicin rezisztenssé tenni (Motamedi et al., 1987). Amikor a két klón külön volt *Streptomyces lividans*-ban és együtt fermentálták őket, illetve ha együtt voltak megtalálhatók ugyanabban a *Streptomyces* gazdaszervezetben, akkor tetracenomicin keletkezett. *Streptomyces peucetius* DNS *Escherichia coli* könyvtárából a *Streptomyces coelicolor* actI és actIII próbáihoz való hibridizálás alapján izolált bifunkciós klónokról igazolták, hogy színes antibiotikum szintézisét irányítják, ha *Streptomyces lividans*-ba bejuttatjuk őket (Stutzman-Engwall, 1989).

Emellett, a cefamicin C termelés bioszintézis útjának izolálása is megtörtént (Chen et al., 1988). Ebben az esetben *Streptomyces lividans* random klónjait vizsgáltuk át egyenként, hogy termelnek-e cefamicin C-t, agarkorong fermentációt alkalmazva. A *Streptomyces lividans*

30 000 transzformánsa közül egy termelt cefamicin C-t.

A jelen szabadalmi leírás tartalmazza először a tetraciklin és klórtetraciklin bioszintézis útjába tartozó gének izolálását és alkalmazását.

Az ábrák rövid leírása

1. ábra: A bifunkciós kozmid vektor szerkezete, és módszer kozmid karok előállítására. Az L és R kozmid karokat az A illetve B plazmidokból állítjuk elő, amint az az ábrán látható, és a 3. példában részletesen leírjuk. Az egyszeres vonalak a konstrukció *Escherichia coli* replikon részét jelentik. Az A plazmidban az *Escherichia coli* rész a pBR322 3.7 kb méretű EcoRI-SalI fragmentjéből származik (Sutcliffe, 1979). A B plazmid tartalmazza az SCP2*-ből származó [csíkozott] 5.9 kb méretű EcoRI-SalI fragmentet, amely az aktinomiceszekben működő replikációs origót szolgáltatja (Larson et al., 1986). Mindkét plazmidon három egymás után levő tapadós vég található, amelyek a pHc79 (Hohn et al., 1980) 700 bp méretű BglII-BstEII cos-tartalmú fragmentjéről származnak (nyitott). Az A plazmidon levő tiostrepton-rezisztencia gén [sötét] a pIJ702 plazmidból kinyert 1.1 kb méretű BclI fragmentből származik (Katz et al., 1983). Az a plazmidban egy 1.1 kb méretű spacer régió [pontosított] a Φ bakteriofág SacI fragmentjéből származik (Sanger et al., 1982).

2. ábra: Az LP²127 és LP²128 fizikai térképe. Mindkét plazmid ekvivalens struktúrát mutat a restrikciós térképezés alapján, ennél fogva egyetlen, mindkettőt leíró

szerkezetet mutatunk be itt és a 3. ábrán. A vektor részt dupla vonallal jelöljük; a TC/CTC bioszintézis régiót egyes vonallal jelöljük. A *Streptomyces aureofaciens*-ből klónozott DNS 31.9 kb méretű; a vektor mérete 11.1 kb. A jelzett vektor régiók a pIBI-24 [sraffozott], tiostrepton rezisztencia [csíkozott]. A két (+) jellel jelzett EcoRI hasítási hely vektor eredetű, a Sau3A-BglII kapcsolódási helyet veszik közre, amely a vektor és a *Streptomyces aureofaciens* DNS határát jelzi.

3. ábra: Restriktációs emésztési térkép az LP²127 és LP²128 vektorokban klónozott *Streptomyces aureofaciens* DNS-ről. Az LP²127-ben és LP²128-ban klónozott 31.9 kb méretű DNSt lineáris formában mutatjuk be. A térképet úgy rajzoltuk meg, hogy a vektor úból származó EcoRI hasítási helyeket tartalmazza a kiindulási és vég-pozíciókban, a bal- és jobboldalon. A restriktációs fragmentek méretét kilobázis párban adjuk meg, és ezek a normál agaróz gélelektroforézis feloldási határain belül (körülbelül 500 bp).

A jelen találmány tárgya a tetraciklin és oxitetra-ciklin teljes bioszintézis útjának klóno-zása *Streptomyces aureofaciens*-ből, és expressziója a heterológ *Streptomyces lividans* gazdaszervezetben. A jelen találmány tehát az ezen az antibiotikumok (klór-tetraciklin és tetraciklin) előállításának bioszintézisútját kódoló izolált DNS gén(ek)re (cluster) vonatko-zik, valamint azokra

a DNS-ekre, amelyek a szakterületen ismert, úgynevezett szigorú hibridizálási körülmények között a klór-tetraciklin és tetraciklin keletkezése bioszintézisútját kódoló, izolált gén clusterek DNS-éhez hibridizálnak. A jelen találmány továbbá vonatkozik ezen gének felhasználására ezeknek az antibiotikumoknak a termelési szintje növelésében, valamint a klór-tetraciklin és tetraciklin új analógjai előállításának vizsgálatára.

A bioszintézis gének izolálására a rekombináns *Streptomyces lividans* könyvtárt vizsgáljuk át, hogy tetraciklin rezisztenciát expresszáló klónt izoláljunk. A rekombináns kozmidokban levő *Streptomyces aureofaciens* DNS inszertek, amelyek a könyvtárat képezik, szükségszerűen elég nagyok, mivel az alkalmazott *in vitro* lambda pakolóelegy olyan kozmid molekulákat igényel, amelyekben a DNS inszert mérete 25-40 kb, hogy életképes transzdukáló fágokat kapjunk. Ha a tetraciklin rezisztens klónokat szelektáljuk a *Streptomyces aureofaciens* genomiális klónok említett populációjából, akkor a kozmid klónok egy korlátozott alcsoportját kapjuk. Ezek közül sokról vagy mindegyikről elvárható, hogy a kiválasztott tetraciklin rezisztencia génhez kapcsolódó antibiotikum bioszintézis géneket tartalmaz. Azok között, amelyek elég nagyok, és megfelelő pozícióban vannak, van egy olyan alcsoport, amely lefedi a teljes bioszintézis utat. Tehát a génekvagy valójában az összes gén klónozása lehetséges a régió szerkezetét vagy struktúráját illető bármely előzetes ismeret nélkül. Jóllehet vannak publikációk, amelyekben a

tetraciklin rezisztencia determináns klónozását írják le (Reynes et al., 1988), valamint egy brómperoxidáz klónozását (Vam Pee, 1988) *Streptomyces aureofaciens*ből, ezek a vizsgálatok egyáltalán nem terjedtek ki a klór-tetraciklin bioszintézis génjeinek vagy a teljes gén-clusternek az izolálására.

A jelen találmány részleteesebb leírását az alábbiakban adjuk meg példákon keresztül, amelyek illusztrálják a találmányt, de nem korlátozzák.

A DNS izolálására használt módszerek közé tartozik a sejtek emésztése lizozimmal ozmotikus pufferben, az ezt követő óvatos lízisz, a fehérje extrakciója, majd a nagy molekulású DNS dúsítása és töményítése. Jóllehet az ismertetett módszer hatékony, a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy alternatív módszerek is használhatók, például amelyeket Hopwood és munkatársai közöltek 1985-ben.

A példában alkalmazott össz-DNS eredete a *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzs, de a találmányt semmi nem korlátozza erre az adott törzsré. Számos különböző, a tetraciklin osztályba tartozó antibiotikumokat termelő *Streptomyces aureofaciens* törzset lehet a jelen találmányban alkalmazni, azonos sikerrel. Ezek közé a *Streptomyces aureofaciens* törzsek közé tartoznak a mutáns törzsek, alternatív vad-típusú izolátumok, amelyek klór-tetraciklint, tetraciklint, 6-demetil-klór-tetraciklint, 6-

demetil-tetraciklint, 7-klór-5a,11a-dehidro-tetraciklint, 2-dekarboxamido-2-acetil-tetraciklint és a tetraciklin vegyület-család más tagjait teremelik. A jelen találmány vonatkozik továbbá a klór-tetraciklin, tetraciklin és tetraciklin-rokon vegyületek klónozására más, ezeket a vegyületeket termelő szervezetekből, amelyek közé tartoznak, nem korlátozó jelleggel a *Streptomyces rimosus*, a *Streptomyces avellaneus*, a *Streptomyces lusitanus*, a *Streptomyces viridifaciens*, a *Streptomyces psammoticus*, az *actinomadura brunnea* és a *Dactylosporangium vesca*.

A *Streptomyces aureofaciens* DNS-t Sau3A restrikciós enzimmel részlegesen emésztjük, hogy nagyméretű, a kívánt 35 kb mérettartományba eső DNS fragmenteket állítsunk elő, amelyeknek a vége homológ az alkalmazott bifunkciós kozmid vektor karjainak a végével. Ebben az esetben az optimális emésztési körülményeket tapasztalati úton határozzuk meg, oly módon hogy egy sorozat emésztést végzünk, és a végtermékeket agaróz gélelektroforézissel vizsgáljuk. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy az érdekes DNS klónozásához alternatív könyvtár készítési és kinyerési módszerek léteznek. A példában az *Escherichia coli* alkalmazása, valamint a lambda pakolás által meghatározott méret-szelekció nem korlátozza a jelen találmányt, mivel más vektorok alkalmazása szintén lehetséges. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a monofunkcionális *Streptomyces* vektorok, például a pIJ922 (Lydiate et al., 1985) is alkalmazhatók a jelen találmányban, azzal a feltétellel, hogy a könyvtár

készítése és a plazmid kinyerése aktinomiceszekben történik.

A példákban következő eljárások közé tartozik a kozmid karok és a méret szerint frakcionált DNS ligálási termékeinek in vitro pakolása, transzdukció az *Escherichia coli* X2819T törzsbe, a transzduktánsok populációjának összegyűjtése, majd ezekből a DNS izolálása egy kozmid könyvtár előállítása céljából. Az alkalmazott módszerek ismertek, de a találmány nem korlátozódik a példákban leírtakra. Alternatív módszerek is alkalmazhatók ugyanazzal a végeredménnyel, következmények nélkül. Azaz a ligálásnál és az in vitro pakolásnál alternatív módszerek alkalmazhatók, valamint alternatív rekombináció deficiens (*recA*) *Escherichia coli* gazdaszervezetek, amplifikálási eljárások (azaz például szelektív táptalajon való növesztés), és plazmid izolálási eljárások, ezeket már mindegyiket publikálták a tudományos szakirodalomban [Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1982)].

A példákban az ezt követő lépések leírják az egyesített kozmid DNS preparátumok bejuttatását *Streptomyces lividans*-ba, egy sejt-könyvtár előállítását, majd ezt követően egy ilyen könyvtár átvizsgálását olyan *Streptomyces lividans* transzformánsok izolálása céljából, amelyek 100 µg/ml tetraciklinre rezisztensek. Jóllehet sokkal munkaigényesebb, a transzformánsokat közvetlenül vizsgálhatjuk tetraciklin rezisztenciára replikázással.

Eltérő tetraciklin rezisztencia szint alkalmazható a vizsgálatokban, ahogy azt a gazdasejt vagy a kiindulási mikroorganizmus által mutatott eredeti rezisztencia diktálja. Más tetraciklin érzékeny, nem restriktív gazdaszervezetek, például a *Streptomyces griseofuscus* alkalmazható a *Streptomyces lividans* helyett.

Ezt követően, a rekombináns plazmid kinyerése a tetraciklin rezisztens *Streptomyces lividans*ból, majd az említett DNS in vitro pakolása és transzdukciója *Escherichia coli*-ba történik. Az ilyen transzduktánsokból izolált plazmid DNS-eket szerkezetileg restriktációs térképezéssel jellemezzük; majd a példában izolált két két plazmidről, az LP²127 és LP²1228 plazmidokról kiderült, hogy azonos szerkezettel rendelkeznek. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy hasonló DNS régiókat alternatív mikroorganizmusokból klónozva polimorfizmust kaphatunk a restriktációs hasítási helyek elrendezésében, de egy elég nagy, tetraciklin rezisztenciát biztosító DNS fragment valószínűleg a leírt tulajdonságokat mutatja.

A tetraciklin rezisztencia plazmidon való elhelyezkedését az erősíti meg, hogy az LP²127 és LP²128 plazmidokkal kapott tiostrepton rezisztens *Streptomyces lividans* transzformánsok tetraciklin rezisztensek is. A tetraciklin-szerű antibiotikum keletkezését agaron való termelődéssel lehet igazolni, az említett tiostrepton és tetraciklin rezisztens *Streptomyces lividans* törzsszel oly módon hogy a keletkező antibiotikum aktivitás hatékony

Escherichia coli ellen, de kevésbé hatékony egy tetraciklin rezisztens *Escherichia coli* ellen.

Végül azt is igazoljuk, hogy a tetraciklin szintézist az LP²127 irányítja a *Streptomyces lividans* heterológ gazdaszervezetben. Ezt mind agaron, mind táptalajon fermentálva el lehet érni. Mind az eredetileg tetraciklin rezisztens *Streptomyces lividans*, mind a *Streptomyces lividans* LP²127 transzformáns termel tetraciklint és klór-tetraciklint, olyan körülmények között, amelyek között ugyanezeket a termékeket izolálják a DNS forrásául szolgáló *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzsből. Másrészt viszont, egy *Streptomyces lividans* transzformáns, amely inszert nélküli plazmid vektort tartalmaz, nem mutat antibiotikum termelést.

A heterológ gazdaszervezet által való tetraciklin termelés nem korlátozódik a példában leírt fermentációs körülményekre vagy a HPLC analitikai rendszerekre, jóllehet ezek tisztán lehetővé teszik a hatékony elemzést. Nagyszámú fermentációs eljárást és a tetraciklinek elemzését írták le, és helyettesíthető a továbbiakban. Emellett, jóllehet a *Streptomyces lividans* használjuk heterológ gazdaszervezetként a példákban, az antibiotikum bioszintézis gének heterológ expressziója várható számos aktinomicétában és más baktérium csoportban, ideértve, de nem korlátozva magunkat a *Bacillus*okra, *Corynebaktérium*okra, *Thermoactinomyces*ekre, mindaddig, amíg transzformálhatók az alábbiakban ismertetett viszonylag nagy plazmidokkal. A transzformáltak közé tartozik például

a *Streptomyces griseofuscus* és a *Streptomyces ambofaciens*, amelyekről ismert, hogy viszonylag kevésbé restriktívek.

1. Példa:

A *Streptomyces aureofaciens* össz-DNS előállítása

A *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzs liofilezett preparátumát 0.8 ml 1x szintetikus sóoldatban szuszpendáljuk (6g Na₂HPO₄/liter, 3g KH₂PO₄/liter, 0.57 g nátrium-citrát /liter), majd Bennett agarra szuszpendáljuk (1g élesztőkivonat/liter, 2g NZ-Amin A/liter, 1g húskivonat/liter, 20g D-glükóz/liter, 20 g Bacto-agar/liter). Két napig 28°C-on inkubáljuk, majd a sejteket az egyik lemezről 5 ml Tryptic Soy Broth-ba (Difco) kaparjuk bele, és röviden besugározzuk ultrahanggal (körülbelül 10 másodperc) egy Heat Systems Ultrasonics W200P, mikrocsúccsal ellátott berendezésben. Oltó-tenyészetet állítunk elő oly módon hogy 2 ml ultrahanggal besugárzott tenyészetet oltunk bele 50 ml Tryptic Soy Broth-ba (TSB), majd ezt követően 2 napig 28°C-on rázatjuk 200/perc fordulatszámmal. Az oltó tenyészetből öt ml-t oltunk be 100 ml TSB táptalajba, amelyet 2% glicinnel egészítünk ki, és 48 órán át 28°C-on rázatjuk 200/perc fordulatszámmal.

A sejteket centrifugálással szedjük össze (9800 g, 30 perc). A sejt-üledéket 200 ml P táptalajjal mossuk (összetétele: 100 g/liter szacharóz, 0.2 g/liter K₂SO₄, 2 ml nyomelem oldat /liter, amelynek összetétele 40 mg/l ZnCl₂, valamint 10-10 mg/liter FeCl₃ x 6H₂O, CuCl₂ x 2 H₂O,

$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{B}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ és $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$). A sejt-üledéket -20°C -on lefagyasztjuk, majd felolvasztjuk és 12 ml P^+ táptalajban (kiegészített P táptalaj, amely 25 mmol TES-t, 25 mmol CaCl_2 -t, 10 mmol MgCl_2 -t, és 3.7 mmol KH_2PO_4 -et tartalmaz). A sejteket szobahőmérsékleten inkubáljuk 2 óra hosszat, ezalatt a protoplasztok képződése nyilvánvaló lesz. 2.5 mg Proteinase K-t adunk hozzá (Boehringer Mannheim), majd az elegyet 15 percig 37°C -on inkubáljuk. A lízist úgy érjük el, hogy 10 ml 0.2 molos EDTA ($\text{pH}=8.0$), 0.1 mol TRIS-HCl $\text{pH}=8.0$ összetételű oldatot adunk hozzá, majd ezt követően azonnal hozzáadunk 2.4 ml 10%-os nátrium-lauril-szulfátot (SDS). A viszkózus elegyet 60 percig inkubáljuk 50°C -on, alkalmankénti rázogatóással.

Ha egyszer a lízis teljes, akkor 20 ml kiegyensúlyozott fenolt (50 g fenol + 6.5 ml 100 mmolos NaCl, 10 mmol TRIS $\text{pH}=8$, 1 mmol EDTA $\text{pH}=8$ + 0.05 g 8-hidroxy-kinolin) adunk hozzá, a preparátumot enyhén rázogatójuk, majd egy asztali centrifugán lecentrifugáljuk ($1500 \times g$, 30 perc). A felső, vizes fázist összegyűjtjük, majd újra extraháljuk a fentiekben leírtak szerint; az első extrakcióból megmaradt fenolt vissza-extraháljuk 20 ml 10 mmolos TRIS-HCl $\text{pH}=7.4$, 1 mmol EDTA $\text{pH}=8$ összetételű pufferrel (TE). Az összegyűjtött vizes fázisokat ezután azonos térfogatú kloroformmal extraháljuk, a fentiek szerint extraháljuk, majd 10 ml-enként külön csövekbe mérjük szét. Egy ml 3 molos ammónium-acetátot ($\text{pH}=5$) adunk hozzájuk, majd 10 ml hideg etanolt rétegünk a viszkózus oldatra. A DNS-t óvatosan egy üvegbotra csavarjuk, kétszer

öblítjük hideg etanollal, majd éjszakán át 4°C-on oldjuk 8 ml TE pufferben. 260 nm-en végzünk egy spektrofotometriás mérést, hogy meghatározzuk a jelenlevő összes nukleinsav mennyiségét (túlnyomó részben DNS).

2. Példa

A Streptomyces aureofaciens DNS részleges emésztése és méret szerinti dúsítása

Azokat a részleges emésztési körülményeket, amelyek a Streptomyces aureofaciens DNS-ből a 35 kb mérettartományba eső Sau3A emésztési termékeket eredményeznek, tapasztalati alapon határozzuk meg. Egy reakcióelegy sorozatot készítünk, mindegyikben 25 µg DNS található 300 µl reakcióelegyben, melynek összetétele 100 mmol NaCl, 10 mmol TRIS pH=7.4, 10 mmol MgCl₂, majd Sau3A restriktációs endonukleáz (New England Biolabs) adunk hozzá 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 illetve 0.005 enzim egység/µg DNS mennyiségben. A reakcióelegyeket 60 percig 37°C-on inkubáljuk, majd 20 percre 65°C-ra tesszük, végül jégre tesszük. 20 µl alikvot részt 0.5%-os agaróz gélre viszünk, hogy ismert hosszúságú fragmentekkel összehasonlítva (lambda DNS, HindIII, XhoI és emésztetlen) meghatározzuk a méretüket. A megmaradó térfogatban levő DNS-t 50 µl ammónium-acetát és 1 ml etanol egymás után való hozzáadásával kicsapjuk, -20°C-ra hűtve az elegyeket. A kicsapott DNS-t ezután 8800 x g-vek centrifugálva ülepitjük, újra oldjuk 300 µl 0.3 mol ammónium-acetátban,

hasznló módon kicsapjuk, üleptjük, etanollal öblítjük, vákuumban szárítjuk, és a megszáradt üledéket végül 100 μ l TE pufferben oldjuk. Az etídium-bromiddal festett, éjszakán át 1 volt/cm feszültségeséssel elektroforetizált agaróz gél vizsgálata alapján kiderül, hogy a 0.05 egység Sau3A restriktációs enzim / μ g DNS ad olyan restriktációs emésztési termékeket, amelyeknek a mérete főleg a kívánt 35 kb mérettartományba esik.

3. Példa

A kozmid karok előállítás

A bifunkcionális kozmid vektor komponenseit az 1. ábrán látható A és B plazmidokból nyerjük ki. Az A plazmid a pIBI24-et tartalmazza, amely replikációs origót és ampicillin rezisztencia gént szolgáltat az Escherichia coli-ban való replikációhoz és szelekcióhoz. Ez a plazmid szolgáltat még egy tiostrepton-rezisztencia gént is, amely a plazmid aktinomiceszekben való szelekcióját teszi lehetővé, valamint egy többszörös tapadó véget (cos) a lambda bakteriofágból, amely az in vitro pakolás szubsztrátjaként működik. A B plazmidot úgy tervezték, hogy egy SCP* replikációs origót szolgáltatson a plazmid aktinomiceszekben való fennmaradáshoz, valamint többszörös cos helyeket.

Az A plazmidot Asp718 restriktációs enzimmal emésztjük, majd borjúból alkalikus foszfátázzal (CIAP) defoszforilezzük. A DNS-t ezután chlorpan-nal és kloroformmal extraháljuk, etanollal kicsapjuk, és vákuumban

szárítjuk. A DNS-t ezután szuszpendáljuk és BglII restriktációs enzimmel emésztjük. A B plazmidot SalI restriktációs enzimmel emésztjük, majd ezt követően CIAP-pal kezeljük. A chlorpan extrakció, etanol kicsapás és vákuumban való szárítás után a DNS-t reszuszpéndáljuk és BglII restriktációs enzimmel emésztjük.

Az előzőekben említett emésztési reakcióelegyeket agaróz gélre visszük, majd éjszakán át elektroforetizáljuk. Az A plazmidból egy 6 kb méretű fragmentet, a B plazmidból egy 8.0 kb méretű fragmentet, amelyek az előzőekben leírt funkcionális régiókat tartalmazzák, elektroelúcióval izoláljuk az agaróz gélből.

4. Példa

A kozmid karok ligálása a Sau3A restriktációs enzimmel emésztett genomiális DNS-hez, és in vitro pakolásuk

A *Streptomyces aureofaciens* DNSSau3A restriktációs enzimmel emésztett és méret alapján "ellenőrzött" genomiális fragmentjeit kozmid karokhoz kapcsoljuk in vitro ligálással. Négy μ l Sau3A restriktációs enzimmel emésztett *Streptomyces aureofaciens* DNS-t (megfelel körülbelül 8 μ g-nak) kombinálunk 1-1 μ g 1-es illetve 2-es kozmid karral, 10 μ l ligáló reakcióelegyben, melynek összetétele: 66 mmol TRIS pH=7.4, 10 mmol $MgCl_2$, 1 mmol ATP, 10 mmol ditiotritol és 40 egység (tapadó vég egység) T4 DNS ligáz (New England Biolabs). A ligáló reakcióelegyet 18 órán át

11°C-on inkubáljuk, majd in vitro pakoljuk, a teljes 10 µl reakcióelegyet egy Packagene^R lambda DNS pakoló rendszer kivonathoz adva (Promega Biotec). Miután 2 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáltuk, 500 µl fág higító puffert (PDB, összetétele: 100 mmol NaCl., 10 mmol TRIS-HCl pH=7.4, 10 mmol MgSO₄) adunk hozzá, majd 25 µl kloroformot. Az elegyet vortexeljük és 4°C-on tároljuk.

5. Példa

Transzdukció Escherichia coli-ba, és bifunkciós kozmid könyvtár készítése

Az in vitro pakoló reakcióelegyből származó fág-preparátumot Escherichia coli X2819 törzsbe transzdukáljuk (R. Curtiss), azzal a céllal, hogy sokezer transzduktánst kapjunk, amelyekből egy egyesített plazmid DNS preparátum, vagy bifunkciós kozmid könyvtár kapható. Ezért 0.3 ml Escherichia coli X2819 éjszakán át növesztett tenyészetet oltunk be 10 ml 20-10-5 táptalajba (20 g/liter Trypton, 10 g/liter élesztőkivonat, 5 g/liter NaCl, 50 mg/liter tmidin), majd 2.5 órán át 28°C-on inkubáljuk. Ezután négy rész 0.4 ml-es Escherichia coli X2819 sejtet kombinálunk 0.8 ml PDB-vel és mikrocentrifugában teljes sebességgel 5 percig centrifugáljuk. Az ülepített sejteket 100 µl PDB-ben szuszpendáljuk. Ezután az in vitro pakolásból származó 50-50 µl fág-preparátumot adunk mindegyikhez. A fágok 25 percig adszorbeálódnak a sejtekre 37°C-on. Mindegyik keverékhez 2 ml 20-10-5 táptalajt adunk, majd a

szuszpenziót 28°C-on 2 óra hosszat rázatjuk. Egytized ml-es alikvot részeket szélesztünk összesen 50 db Petri-csészére, amelyek 100 mg/liter ampicillinnel (nátrium-só, Sigma) kiegészített 20-10-5 táptalajt (20-10-5 táptalaj és 20 g/liter Bacto agar) tartalmaznak. A lemezeket éjszakán át 28°C-on inkubáljuk, majd három napig szobahőmérsékleten hagyjuk. Öt jellemző lemez telepszámának meghatározásából kiderül, hogy összesen körülbelül 12 000 ampicillin rezisztens telepet kaptunk.

Mindegyik lemezt 5 ml 50 mmol glükóz, 25 mmol TRIS-HCl pH=8, 10 mmol EDTA pH=8 összetételű oldattal (GTE) árasztjuk el. A telepeket egy steril szélesztőbottal szuszpendáljuk, majd mindegyik eluátumot egyesítjük, így kapunk egy sejt-szuszpenziót, amelyet 5 percig 9800 g-vel centrifugálunk. Az ülepitett sejteket 72 ml GTE-be 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-t (8g/liter NaOH, 10 g/liter SDS) adunk hozzá, ezáltal enyhe keverés után egy viszkózus lizátumot kapunk. Miután 20 percig jégen tartottok, 80 ml kálium-acetátot adunk hozzá, összekeverjük, majd további 20 percig jégen tartjuk. A preparátumot ezután 20 percig 9800 g-vel centrifugáljuk, a felülúszót összegyűjtjük és 200 ml hideg izopropanolt adunk hozzá, összekeverjük, és 15 percig jégen inkubáljuk, majd 20 percig 9800 g-vel centrifugáljuk. A nukleinsav üledéket 20 ml, 1% nátrium-szarkozináttal kiegészített TE pufferben oldjuk. Huszonkét gramm CsCl-t adunk hozzá, majd feloldjuk,

és 2 ml 10 mg/ml koncentrációjú etídium-bromid oldatot adunk hozzá. A CsCl-etídium-bromid elegyet megfelelő csövekbe töltjük, majd Beckman 70.1Ti rotorban centrifugáljuk 55 000/perc fordulatszámmal 19 órán át. A csöveket eltávolítjuk a rotorból, majd a plazmid csíkokat oldalról, fecskendővel leszívjuk. Az etídium-bromidot eltávolítjuk a mintából, oly módon hogy négyszer azonos térfogatú, vízzel telített butanollal extraháljuk. A vizes oldat térfogatát 6 ml-re állítjuk be TE pufferrel; 1 ml 3 molos ammónium-acetátot adunk hozzá, majd a plazmid DNS-t 18 ml etanollal kicsapjuk. -20°C-ra hűtjük az elegyet, majd a DNS-t centrifugálással ülepitjük (3400 g, 30 perc). Egy második kicsapást hasonlóképpen hajtunk végre, majd a DNS-t etanollal öblítjük, vákuumban szárítjuk, 1 ml TE-ben oldjuk, és a DNS koncentrációt spektrofotometrián meghatározzuk.

6. Példa

Plazmid könyvtár bejuttatása Streptomyces

lividansba, majd Streptomyces lividans rekombináns

sejt-könyvtár létrehozása

Az előző lépésben előállított bifunkciós plazmid könyvtárat Streptomyces lividans TK54 sejtekbe transzformáljuk, ahol a Streptomyces gének fenotipikus expressziója elérhető. Ebből a célból a Streptomyces lividans TK54 sejtekből protoplasztokat állítunk elő, lényegében a standard módszerekkel (Hopwood et al., 1985).

Röviden, a *Streptomyces lividans* TK54 45 órás tenyészetéből származó sejteket, amelyek úgy szaporodtak el, hogy 0.2-0.2 ml spóraszuszpenziót oltottunk komplett YEME táptalaj 10 db 50 ml-es alikvot részébe (YEME: 3 g/liter élesztőkivonat, 5 g/liter pepton, 3g/liter malátakivonat, 10 g/liter glükóz, 340 g/liter szacharóz, 5 g/liter glicin, 5 mmol $MgCl_2$, 40 mg/liter L-hisztidin illetve L-leucin), centrifugálással ülepitjük (9800 g, 15 perc). A sejt-üledéket kétszer mossuk P táptalajban, majd 60 ml P^+ -ban oldjuk. Ezután 14 mg/ml koncentrációjú lizozimet tartalmazó P^+ oldatból húsz ml-t adunk hozzá, majd a szuszpenziót 30°-s vízfürdőben 150/perc fordulatszámmal rázatjuk 90 percig. Ezt követően 100 ml P^+ táptalajt adunk hozzá, és a protoplaszt szuszpenziót steril, nem abszorbeáló gyapoton szűrjük át. A szűrletet 10 percig 3800 g-vel centrifugáljuk, a protoplaszt üledéket reszuszpendáljuk és mossuk 100 ml P^+ táptalajjal, majd egy második centrifugálás után 120 ml P^+ táptalajban szuszpendáljuk. A protoplaszt preparátumot 1.8 ml-es fagyálló csövekbe osztjuk szét, majd -70°C-ra lefagyasztjuk. A transzformálást oly módon végezzük el, hogy 0.3-0.3 ml TK54 protoplaszt preparátumot (körülbelül 1×10^9 protoplasztot tartalmaz) adunk 4 centrifuga csőhöz, amelyek 4 ml P^+ táptalajt tartalmaz. A protoplasztokat leülepitjük, oly módon hogy 3400 g-vel centrifugáljuk 10 percig, majd a reziduális térfogatban szuszpendáljuk. Körülbelül 10 μ g kozmid könyvtár DNS-t adunk mindegyikhez, majd 0.5 ml 25%-os PEG 1000-et (1 g PEG 1000 [SIGMA], 3 ml oldatban oldva, amelynek összetétele: 25 g/liter szacharóz,

2 ml 500 x nyomelem oldat/liter, 0.25 g/liter K_2SO_4 , 100 mmol $CaCl_2$, 50 mmol TRIS-maleát pH=8) adunk hozzá. Összekeverjük, majd 30 másodpercig inkubáljuk, és 5 ml P^+ oldatot adunk hozzá. A protoplasztokat ezután ülepitjük és 1 ml P^+ -ban szuszpendáljuk. Egytized ml-es térfogatokat ezután szárított R_2YE agarra szélesztünk (összetétele: 100 g/liter szacharóz, 0.25 g/liter K_2SO_4 , 2 ml 500 x nyomelem oldat/liter, 2 g/liter L-prolin, 20 g/liter D-glükóz, 5 g/liter élesztőkivonat, 0.05 g/liter KH_2PO_4 , 25 mmol TES, 25 mmol $CaCl_2$, 5 mmol $MgCl_2$, 20 g/liter Bacto-agar) és $28^\circ C$ -on inkubálunk. 24 óra elteltével mindegyik lemezt 500 $\mu g/ml$ tiostrepton tartalmazó 3 ml lágy R agarral rétegezzük le (összetétele megegyezik az előzővel, de nem tartalmaz élesztőkivonatot, glükózt vagy K_2HPO_4 -et, de tartalmaz 8g/liter Bacto agart), és további 12 napig inkubáljuk.

Körülbelül 9100 tiostrepton rezisztens telepet kapunk. Ezeket úgy nyerjük ki, hogy az agarlemezekeken levő telepeket 3 olyan csőbe kaparjuk bele, amelyek 25-25 ml 20%-os glicerint tartalmaznak. A telepszuszpenziókat ultrahanggal besugározzuk 90 másodpercig, egyesítjük, majd 1.8 ml-es fagyálló csövekbe mérjük szét és $-70^\circ C$ -ra lefagyasztjuk. Ez a lefagyasztott preparátum alkotja a *Streptomyces lividans* rekombináns sejt-könyvtárat.

7. Példa

A *Streptomyces lividans* LL535, egy tetraciklin

rezisztens transzformáns izolálása, amelyből az
LP²₁₂₇ plazmid származik

A *Streptomyces lividans* rekombináns sejt-könyvtárat ezután tetraciklin rezisztencia alapú vizsgálatnak vetjük alá. A fragmentált *Streptomyces lividans* sejt-könyvtár egytized ml-es részeit 100 µg/ml tetraciklinnel kiegészített Bennett agarra szélesztjük. Miután 5 napig 28°C-on inkubáltuk, két tetraciklin rezisztens telepet tudtunk kimutatni. Ezek közül az egyiket, az LL535-öt (eredeti jelzése LL529-2) választjuk ki a további elemzés céljára. Az LL535 telepet friss, 100 µg/ml tetraciklint tartalmazó Bennett agarra szélesztjük. A növekedést 3 napi, 28°C-on való növesztés után figyelhetjük meg. A kapott növekedést 50 ml, 10 g/liter glükózzal és 100 µg/ml tetraciklinnel kiegészített TSB-be (TSBG) kaparjuk, majd a szuszpenziót 3 napig 30°C-on rázatjuk. Az LL535 tenyészetet röviden besugározzuk ultrahanggal, majd egy részét 1.8 ml-es fagyálló csövekbe mérjük szét és -70°C-on tartjuk. A megmaradó térfogatot használjuk négy darab, 500-500 ml módosított, 100 µg/ml tetraciklint tartalmazó YEME táptalajt (összetétele megegyezik az előzőekben leírtakkal, de tartalmaz 16 g/liter glicint, 25 mmol MOPS-ot, de nincs benne MgCl₂, L-hisztidin vagy L-leucin) tartalmazó 2 literes lombik beoltására. A két nap után kapott növekedést azután feldolgozzuk a plazmid DNS izolálása céljából az előzőekben leírt módon, azzal a különbséggel, hogy minden térfogat a négyszerese annak, mint amit az előző példában

használtunk. A végső DNS csapadékot 1 ml TE pufferben oldjuk.

A *Streptomyces lividans* LL535 transzformánsból izolált plazmid DNS 10 μ l-es részét egy in vitro pakolási reakciónak vetjük alá, majd *Escherichia coli* X2819T sejtekbe transzdukáljuk, az előzőekben leírt módon. Egy ampicillin rezisztens transzdukánst (jele LL537) 100 μ g/ml ampicillint tartalmazó 20-10-5 agarra szélesztjük, majd az egy nap után 30°C-on kapott növekedést használjuk 2 500-500 ml-nyi, 100 μ g/ml ampicillint tartalmazó 20-10-5 táptalaj beoltására. Miután 30°C-on inkubáltuk, plazmid DNS-t izolálunk az előzőekben leírt módon. Az izolált DNS jele LP²127; a plazmid becsült mérete 43 kb pár.

Az LP²127-ről restrikciós térképet készítünk, oly módon hogy egyszeres és kétszeres emésztéseket végzünk restrikciós endonukleázokkal. A BamHI, BclI, BglII, BstBI, ClaI, EcoRI, MluI, NcoI, SacI, ScaI SphI és StuI restrikciós enzimek (New England Biolabs) hasítási helyét oly módon határozzuk meg, hogy mindegyik enzimmel emésztünk külön, majd olyan enzimekkel kombinálva, amelyekről ismert hogy a vektor részen belül ismert helyeken hasítanak, ilyen például az EcoRI, EcoRV vagy HindIII restrikciós enzim. A restrikciós endonukleázos emésztéseket oly módon végezzük, hogy 1-2 μ g plazmid DNS-t kombinálunk 4 μ l olyan 10x sóoldattal, amely optimális az alkalmazott restrikciós enzimhez, valamint körülbelül 5-40 egység enzimmel 40 μ l össztérfogatban. A használt 10x sóoldatok összetétele az alábbi:

BamHI, EcoRV és SalI enzimekhez:

1.5 mol NaCl, 0.06 mol TRIS-HCl pH=8, 0.06 mol
MgCl₂;

BglII és ScaI enzimekhez

1.0 mol NaCl, 0.1 mol TRIS-HCl pH=7.4, 0.1 mol
MgCl₂;

BclI enzimhez:

0.75 mol KCl, 0.06 mol TRIS-HCl pH=7.4, 0.1 mol
MgCl₂;

BstBI enzimhez:

0.6 mol NaCl, 0.06 mol TRIS-HCl pH=7.4, 0.06 mol
MgCl₂;

ClaI enzimhez:

0.5 mol NaCl, 0.06 mol TRIS-HCl pH=8.0, 0.06 mol
MgCl₂;

EcoRI enzimhez

0.5 mol TRIS-HCl pH=8.0, 0.1 mol MgCl₂;

MluI enzimhez:

0.5 mol NaCl, 0.1 mol TRIS-HCl pH=7.4, 0.1 mol
MgCl₂;

SacI enzimhez:

0.1 mol TRIS-HCl pH=7.4, 0.1 mol MgCl₂;

StuI enzimhez:

1.0 mol NaCl, 0.1 mol TRIS-HCl pH=8.0, 0.1 mol
MgCl₂.

A dupla emésztéseket mindkét enzim számára megfelelő sóoldattal végezzük, a gyártó javaslatai alapján. Az összes emésztési reakciót 37°C-on hajtjuk végre, a BclI-es

emésztés kivételével, amelyet 50°C-on végzünk, és a BstBI-es emésztés kivételével, amelyet 65°C-on végzünk. Az inkubálás hossza 60-120 perc. Egy 5 µl térfogatú stop-keveréket (50% glicerin, 0.1 mol EDTA pH=8, 0.25% brómfenolkék) adunk a reakció leállításához, és a minta agaróz gélre való felviteléhez.

Az emésztési eredményeket 0.8%-os agaróz gélen végzett elektroforézissel tesszük láthatóvá. A térképet az LP²127 közvetlen emésztésével, valamint a szubklónozott fragmentek emésztésével állítjuk össze. A BclI valamint a ClaI hasítási helyek térképezését a gazdaszervezet metilációja gátolja, és ezért az LP²258 alkalmazásával végezhető el, amelyet úgy kapunk, hogy az LP²127-et in vitro pakoljuk, transzdukáljuk *Escherichia coli* GM19(dam-dcm-) törzsbe, majd az előzőekben leírt módon plazmid izolálunk belőle. Az LP²127 fizikai szerkezetét a 2. ábrán láthatjuk. Az LP²127-ben klónozott 31.9 kb méretű *Streptomyces aureofaciens* DNS restrikciós endonukleázos térképét a 3. ábrán mutatjuk be.

8. Példa:

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

A *Streptomyces lividans* LL529-TT2 izolálását hasonló módon végezzük, mint az LL535 izolálását, azzal a különbséggel, hogy a rekombináns *Streptomyces lividans*

sejt-könyvtárat 50 $\mu\text{g/ml}$ tiostreptont és 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklint tartalmazó Bennett agarra szélesztjük. Miután 28°C-on 11 napig inkubáltuk, két rezisztens telepet kaptunk. Ezek közül az egyiket, az LL529-TT2-t mindkét antibiotikumot tartalmazó Bennett agarra szélesztjük. Miután három napig 28°C-in inkubáltuk, a kapott növekedést használjuk arra, hogy 50 ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ tiostreptont és 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciklint tartalmazó TSB-t oltunk vele. Öt napig inkubáljuk 28°C-on 200/perc fordulatszámmal rázatva, majd a plazmid DNS-t miniprep módszerrel preparáljuk, amely hasonlít az előzőkben leírtakhoz, egészen az izopropanolos kicsapásig. Ebben az esetben azonban az alkalmazott térfogat körülbelül egynegyede az előzőkben említettnek. Az izopropanolos kicsapás után a nukleinsav üledéket 1 ml TE-ben oldjuk, majd azonos térfogatú chlorpennal (500 g fenol és 0.5 g 8-hidroxí-kinolin, 100 mmol NaCl-t, 1 mmol EDTA pH=8.0, 10 mmol nátrium-acetát pH=6 összetételű oldattal egyensúlyba hozva, plusz 500 ml kloroform) extraháljuk kevertetéssel, majd 3 percre mikrocentrifugában centrifugáljuk teljes sebességgel. A vizes fázist újra extraháljuk chlorpennal, majd kloroformmal extraháljuk hasonló módon. A végső vizes fázist összegyűjtjük, majd 100 μl ammónium-acetátot és 1.8 ml etanolt adunk hozzá a nukleinsav kicsapására. Lehűtjük -20°C-ra, majd a csapadékot 30 percre 8800 g-vel centrifugáljuk. A kapott csapadékot 300 μl 0.3 molos ammónium-acetátban oldjuk, hasonló módon kicsapjuk 1 ml etanollal és centrifugáljuk. A kapott csapadékot etanollal mossuk, vákuumban szárítjuk,

majd 1 ml TE-ben oldjuk.

Az LL529-TT2 plazmid minipreparátumot használjuk arra, hogy az előzőekben leírt módon in vitro pakolást végezzünk vele. Egy ampicillin rezisztens transzduktánst (jele LL538) választunk a plazmid előállítására, amelyet az LL535 előállítását leíró példa szerint végzünk. A kapott tisztított plazmid jele LP²128. Azt a restriktációs emésztési mintázatot, amelyet akkor kapunk, amikor az LP²128-et 20 különböző restriktációs enzimmel emésztjük, összehasonlítjuk az LP²-vel kapottal, a restriktációs enzimes emésztési képet ugyanazon az agaróz gélen hasonlítva össze. Az LP²128-cal kapott gél mintázat azonos azzal, amelyet az LP²127-tel kapunk, jelezve, hogy a két plazmid egyenlő. Ezért a 2. és 3. példa leírja mind az LP²128 mind az LP²127 plazmid szerkezetét.

9. Példa

Az LP²127 és LP²128 plazmidok egy plazmidhoz
kapcsolt tetraciklin rezisztenciát mutatnak

Annak igazolására, hogy a megfigyelt tetraciklin rezisztencia plazmidon található, az LP²127 és LP²128 plazmidokat *Streptomyces lividans* protoplasztokba transzformáljuk, és a kapott tiostrepton rezisztens transzformánsokat vizsgáljuk, hogy tetraciklin rezisztensek-e. A *Streptomyces lividans* protoplasztok készítését és transzformálását, valamint a tiostrepton rezisztens transzformánsok ezt követő szelektálását az

előzőkben leírt módon végezzük. 10 µg-ot transzformálunk mind az LP²127 mind az LP² 128 plazmidből, valamint a tetraciklin érzékeny kontrollból, az LP²111-ből (ez a vektor tartalmazza a pIBI24-et, az SCP2* replikációs origót és stabilitási régiót, valamint a tiostrepton rezisztencia gént). Mindegyik plazmidből 150 transzformánst vizsgálunk le és izolálunk 100 µg/ml tetraciklint illetve 25 µg/ml tiostreptont tartalmazó Bennett agarlemezre.

Az izolálások eredményét 5 napi, 28°C-on való növekedés után értékeljük ki. Az LP²111-ből származó összes tiostrepton-rezisztens transzformáns tetraciklin érzékenynek bizonyult, míg az akár az LP²127-ből, akár az LP²128-ből tiostrepton rezisztens transzformánsok 80%-a tetraciklin rezisztensnek bizonyult.

10. Példa

Klór-tetraciklin és tetraciklin előállítás LP²127-et és LP²128-antitest tartalmazó Streptomyces lividans-szal

Kísérletsorozatot végzünk annak demonstrálására, hogy az LP²127 és LP²128 klór-tetraciklin (CTC) és tetraciklin (TC) bioszintézisét szabályozza a Streptomyces lividans heterológ gazdaszervezetben. Az eredeti LL535 izolátum, valamint az LP²127-tel transzformált Streptomyces lividans termel CTC-t és TC-t mind agaron, mind folyadék táptalajon, míg az inszert nélküli plazmid klónozó vektor nem termel tetraciklin antibiotikumot. A Streptomyces

lividansba transzformált LP²128 plazmid egy *Escherichia coli* elleni aktivitással rendelkező antibiotikum szintézisét irányítja, amely tetraciklinként írható le. Ilyen aktivitást a *Streptomyces lividans* gazdaszerkezet nem termel.

Először a *Streptomyces lividans* LL535-öt a tiostrepton rezisztens izolátumot, amelyből az LP²-t izoláltuk, Bennett agarra szélesztjük (amely 25 µg/ml tiostreptont tartalmaz), olyan higításban, hogy körülbelül 200 telepet kapjunk lemezenként. A *Streptomyces lividans* LL531 törzset (amely az előzőekben említett LP²111 plazmid vektort tartalmazza), hasonlóképpen szélesztjük, körülbelül 400 telep per lemez sűrűségben.

Miután nyolc napig inkubáltuk 30°C-on, az LL535 telepek sárga UV fluoreszcenciát mutatnak 366 nm-es UV lámpával való besugárzás után. Ez jellemző a tetraciklin termelő tenyészetekre, és nem figyelhető meg az LL531-nél.

Ezután mindegyik lemezen megvizsgáljuk a biológiai aktivitást, oly módon, hogy a telepeket 5 ml olyanlagy 20-10-5 agarral (8 g/liter Bacto Agar) rétegezzük le, amelyet 0.1 ml éjszakán át növesztett teszt-organizmussal oltottunk be. Az alkalmazott vizsgáló mikroorganizmusok: a *Bacillus subtilis* T1325 törzs, amelyet a University of Leicester-ről kaptunk (dr. Eric Cundliffe), amelyik a tiostrepton rezisztenciát biztosító plazmidot tartalmazza), az *Escherichia coli* MM294 és MM294 (ATCC 33625), amely a pBR322 plazmidot tartalmazza (ez hordozza a tetraciklin és ampicillin rezisztenciát). A tenyészeteket éjszakán át

növesztjük 37°C-on 10 ml 20-10-5 táptalajban, amelyet a T1325 számára 25 µg/ml tiostreptonnal, és az MM294/pBR322 számára 100 µg/ml ampicillinnel egészítünk ki. Miután lerétegeztük és éjszakán át inkubáltuk 37°C-on, a lemezeken megvizsgáljuk a gátlási zónákat a rétegző mikroorganizmusban. Az LL531 törzs nem ad zónákat az *Escherichia coli* törzsekkel, és csak néhány telep ad kisméretű lokalizált gátlási zónát a Gram-pozitív T1325-tel. Mindez utóbbi telep vörös pigmentet termel, amely az aktinorodin expresszióra jellemző; a *Streptomyces lividans*-ról ismert, hogy ezt a normális körülmények között kriptikus bioszintézis utat megfigyelhető frekvenciával expresszálja (Horinouchi et al., 1989). Összehasonlítva, az LL535 törzs egy olyan antibiotikumot termel, amely teljesen gátolja a T13225 és MM294 növekedését a rétegzett agarban (a későbbi kísérletekben kevesebb teleppel lemezenként, kicsi, diszkrét és nagyon nagy gátlási zónák láthatók a megfelelően szeparált telepek körül ezekkel a vizsgáló mikroorganizmusokkal). A jelen kísérletben MM294/pBR322-vel felülrétegzett LL535 telepek diszkrét gátlási zónákat mutatnak a telepek körül. Az MM294/pBR322-vel látható redukált aktivitást úgy lehet venni, hogy egy csökkent érzékenységet mutat, a pBR322-n található tetraciklin rezisztencia gén expressziója következtében.

Az agaron keletkező antibiotikumot úgy jellemezzük, hogy egybefüggő tenyészetet adó lemezeknél agar-blokkokból extraháljuk az antibiotikumot. Az LL535 és LL531 törzseket 25 µg/ml tiostrepton tartalmazó Bennett agaron növesztjük;

a *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13899 törzset, amely a klónozott LP²127 és LP²128 DNS forrása, antibiotikum nélküli Bennett agarra szélesztjük. Miután öt napig növesztettük 30°C-on, 2.5 cm-es négyzet alakú agar-blokkokat vágunk ki és maceráljuk 3 ml savas metanollal (11.5 ml tömény kénsav 4 liter metanolban). Miután öt percig Vortexeltük, a felülúszót egy Acro LC-25-ös membrán-szűrőn szűrjük át, és HPLC elemzésnek vetjük alá.

A HPLC elemzéseket izokratikus körülmények között végezzük C18 fordított fázisú oszlopon egy olyan mobil fázissal, amelynek összetétele pH=2.9-es oxalát puffer, benne 22% DMF (N,N,-dimetil-formamid). Az áramlási sebesség 1 ml/perc, az eluátumot 365 nm-en követjük. Standardként autentikus tetraciklint és klór-tetraciklint alkalmazunk.

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

Az LP²127-tel, LP²128-cal és LP²63-mal (ez utóbbi egy olyan plazmid vektor, amely a pIBI24-et tartalmazza a pIJ702 SacI hasítási helyére klónozva) kapott *Streptomyces lividans* tiostrepton rezisztens transzformánsokat hasonlóképpen analizáljuk a rétegzési technikával az antibiotikum-termelés szempontjából, a T1325 és MM294 mikroorganizmusok alkalmazásával. Az LP²127 és LP²128 transzformánsok mutatják mindkét vizsgáló mikroorganizmussal szemben antibiotikum aktivitás

termelődését, míg az LP²63 transzformánsok nem, ezzel jelezve, hogy az antibiotikum-termelő képesség az LP²127 és LP²128 plazmidokban levő *Streptomyces aureofaciens* DNS-hez kötődik.

Folyadék-fermentációkat is végzünk, annak ismételt megerősítésére, hogy az LP²127 plazmidot tartalmazó *Streptomyces lividans* által termelt antibiotikumok a tetraciklin és a klór-tetraciklin. Ötven-ötven ml-es oltóanyag tenyészeteket állítunk elő az ATCC 13899, az LL531 és LL873 törzsekből (az utóbbi a *Streptomyces lividans*nak egy LP²127 transzformánsa) 5 µg/ml tiostrepton tartalmazó S táptalajt alkalmazva (az S táptalaj összetétele: 4 g/liter élesztőkivonat, 4 g/liter pepton, 10 g/liter glükóz, 0.5 g/liter MgSO₄ x 7H₂O); az ATCC 13899-et tiostrepton nélkül növesztjük. Miután három napig inkubáltuk 30°C-on, 0.5 ml oltóanyagot átviszünk 25 ml-es táptalajba, amely 10 µg/ml tiostrepton tartalmaz (az ATCC 13899-et antibiotikum nélkül növesztjük). Miután tíz napig 28°C-on inkubáltuk, a végső tenyészetből 0.5 ml-es alikvot részeket hígítunk 4.5 ml savas metanolban, az előzőekben leírt módon feldolgozzuk, majd HPLC elemzésnek vetjük alá. Az LL531 törzs nem eredményez tetraciklin vegyületeket, míg az ATCC 13899, az LL535 és az LL873 37, 56 illetve 6 µg/ml klór-tetraciklint termel. Kismennyiségű tetraciklin is kimutatható az említett három törzs fermentlevében.

Az LL537 és LL538 *Escherichia coli* törzsek az *Escherichia coli* transzdukánsok, amelyekből az LP²127 és LP²128 plazmidot izoláltuk, és a Budapesti Egyezmény

alapján letétbe helyeztünk az American Type Culture Collection-nál (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland), az ATCC letéti számok az alábbiak. Az LP²127-et tartalmazó *Escherichia coli* X2818T letéti száma ATCC 68537, és az LP²128-at (LL538) tartalmazó *Escherichia coli* X2819T törzs letéti száma ATCC 68358. Mindkettőt 1990 július 10-én helyeztük letétbe, és legális igény esetén bárki számára hozzáférhető.

A leírásban hivatkozott publikációkat az alábbiakban adjuk meg részletesen.

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. Tsai and J.F.-Y. Tsai. 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.* 259:14151-14157.
 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 Streptomycetes. 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. A tetraciklin és klór-tetraciklin bioszintézisútját kódoló izolált DNS cluster
2. Az 1. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy szigorú hibridizációs körülmények között az 1. igénypont szerinti DNS-sel hibridizál.
3. A 2. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy az említett DNS-t prokarióta gazdaszervezetben expresszáljuk.
4. A 3. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy az említett gazdaszervezet *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces ambofuchsus*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Corynebacterium* vagy *Thermoactinomyces*.
5. A 4. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy az említett gazdaszervezet *Streptomyces lividans*.
6. Az 5. igénypont szerinti DNS, azzal jellemezve, hogy az említett DNS az LP²127-en vagy az LP²128-on található gén-cluster.
7. Eljárás a tetraciklin, klór-tetraciklin vagy analógjaik kitermelésének növelésére, azzal jellemezve, hogy az említett antibiotikumokat termelő mikroorganizmus bioszintézisútját úgy szabályozzuk, hogy az említett bioszintézis utat kódoló gén-clustert úgy manipuláljuk, hogy a tetraciklin, klór-tetraciklin vagy analógjaik kitermelése növekedjék.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett DNS-t prokarióta gazdaszervezetben expresszáljuk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett gazdaszervezet *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces ambofuchsus*, *Actinomycetes*, *Bacillus*, *Corynebacterium* vagy *Thermoactinomyces*.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett gazdaszervezet *Streptomyces lividans*.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett DNS az LP²127-en vagy az LP²128-on található gén-cluster.

12. Eljárás a tetraciklin vagy klór-tetraciklin antibiotikum analógok szűrővizsgálatára, azzal jellemezve, hogy a bioszintézis utat vagy annak egy részét kódoló DNS gén-clustert tartalmazó rezisztens transzformánsokat megvizsgáljuk a tetraciklin vagy klór-tetraciklin termelés szempontjából.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett DNS szigorú hibridizációs körülmények között hibridizál a 12. igénypontban szereplő DNS-sel.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett DNS-t prokarióta gazdaszervezetben expresszáljuk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal

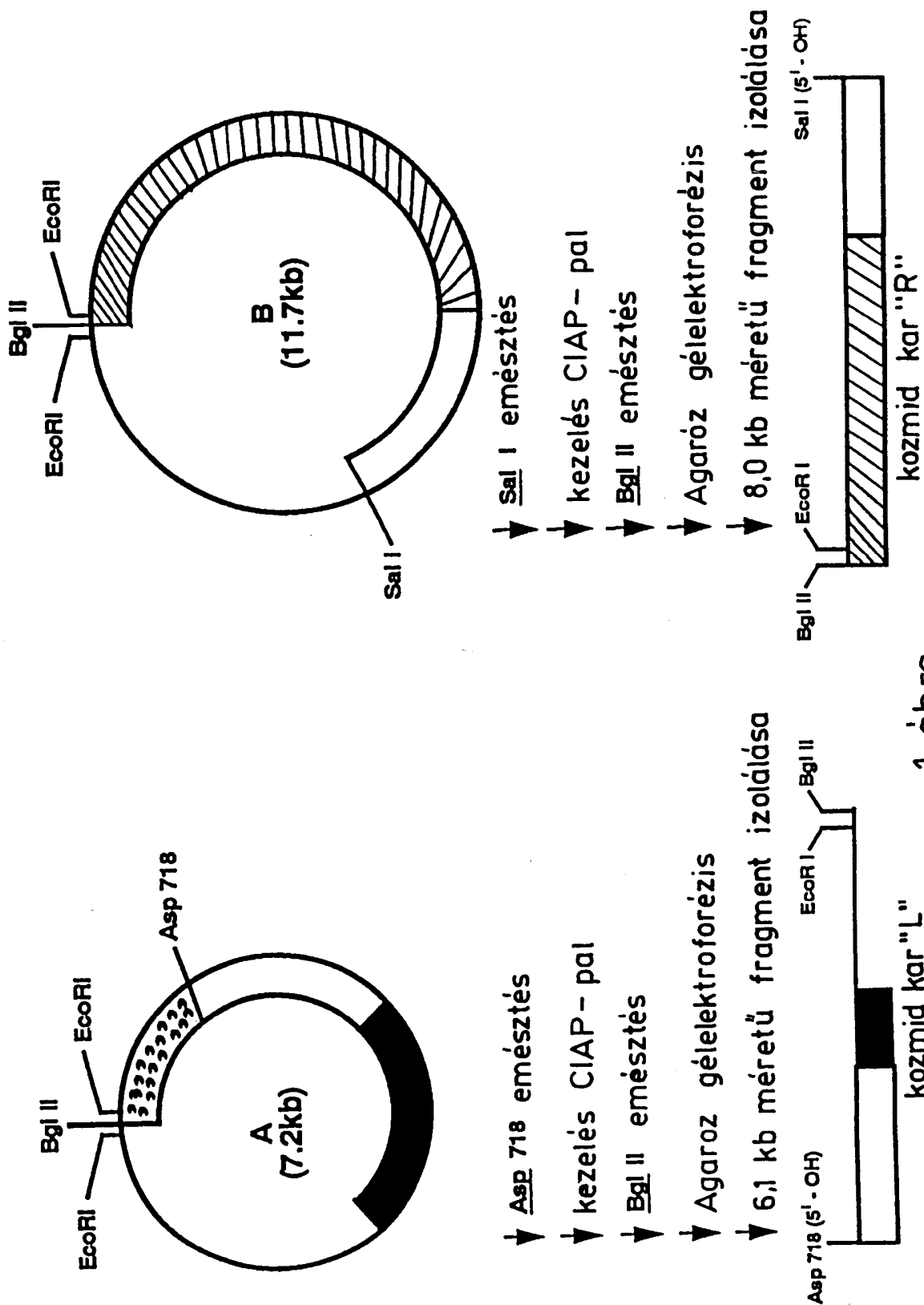
jellemezve, hogy az említett DNS cluster az LP²127 vagy az LP²128 plazmidon található

A meghatalmazott:

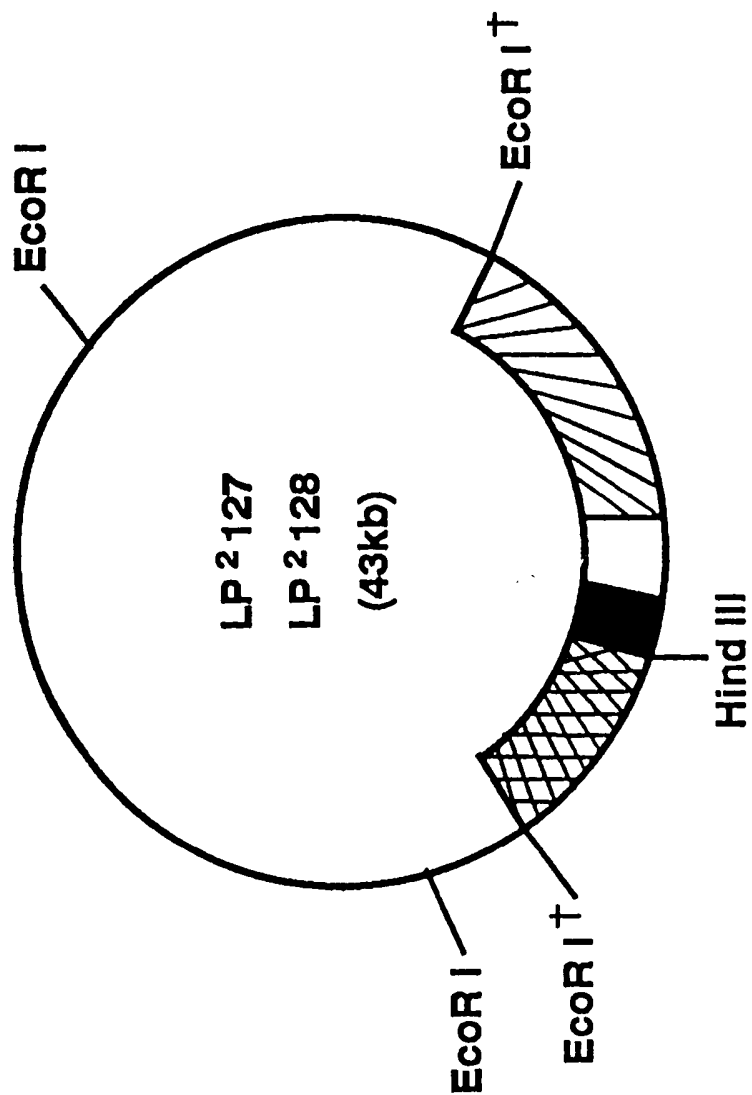
46 oldal + 3 ábrás oldal

Földvár

DANIELA
Szabadalmi és Belső Iroda Kft.
23. 1052



1. ábra



2. ábra

1.0	6.9	11.8	2.6	5.9	1.2	1.4	Bam HI
	16.8	4.7		10.4			Bcl I
1.7	22.5		1.3	6.4			Bgl II
4.2	27.7						Bam I
	9.4	22.5					Bst BI
3.0	6.6	22.3					Cla I
1.8	20.1	10.0					EcoRI
	28.1				3.8		Mlu I
2.7	4.3	5.7	1.6	9.6	5.5	1.8	Nco I
2.7	3.8	3.2	2.0	2.3	1.6	11.2	Sac I
4.5	13.7	7.4	5.8				Sca I
2.5	2.5	9.9	1.0	2.5	6.9	6.6	Sph I
	7.8	11.2	2.6	6.4	2.4	1.5	Stu I

Kbs



3.6bra