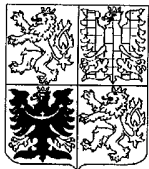


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 21.05.1999
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 26.05.1998
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/9801852
(33) Země priority: SE
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 16.05.2001
(Věstník č. 5/2001)
(86) PCT číslo: PCT/EP99/03509
(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/61634

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4354

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/74 A 61 K 39/108
C 12 N 15/54
C 12 N 15/31
C 12 N 9/10
C 07 K 14/245
C 07 K 14/28
C 07 K 14/435
A 61 K 39/106

//(C 12 N 15/74, C 12 R 1:63)

(71) Přihlašovatel:
ACTIVE BIOTECH AB, Lund, SE;

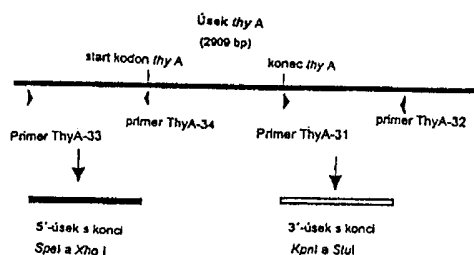
(72) Původce:
Carlin Nils, Hässelby, SE;
Lebens Michael R., Göteborg, SE;

(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob přípravy thy A⁻ kmenů *Vibrio cholerae*,
Deltathy A kmeny *V. cholerae* a vakcína, která je
obsahuje**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje způsob přípravy thy A⁻ kmenu *Vibrio cholerae*, který obsahuje krok místně-cílené mutageneze v chromozómu *V. cholerae*, a sice v lokusu genu thy A. Dále je popsán Dthy A kmen *V. cholerae* postrádající funkční gen thy A. Tento kmen obsahuje jeden nebo několik epizomálních autonomně se replikujících DNA elementů, jako jsou např. plazmidy, které mají funkční gen thy A, např. gen z *E. coli*, což umožňuje kmenu růst v kultivačním médiu bez přítomnosti thyminu, a případně má strukturální gen kódující homologní nebo heterologní protein. Dále jsou popsány proteiny kódované strukturálním genem thy A a 5'-lemujícím úsekem. Řešení rovněž poskytuje vakcínu obsahující Dthy A kmen *V. cholerae* nebo thy A⁻ kmen *V. cholerae*.



CZ 2000 - 4354 A3

201100

PV2000-4304

K2288

178 443/HK

- 1 -

Způsob přípravy $thy A^-$ kmenů *Vibrio cholerae*, $\Delta thy A$ kmeny *V. cholerae* a vakcína, která je obsahuje

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobů přípravy $thy A^-$ kmenů *Vibrio cholerae*, těchto kmenů a jejich použití. Vynález se zejména týká kmenu *Vibrio cholerae*, který byl zbaven genu z chromozómu, tj. $thy A^-$ kmenu *Vibrio cholerae*, který postrádá funkci genu $thy A$. Tento kmen obsahuje jeden nebo několik epizomálních autonomně se replikujících DNA elementů, jako jsou např. plazmidy, obsahujících cizorodý gen $thy A$, 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 $thy A$ a proteinů kódovaných těmito sekvencemi, a dále se týká vakcíny, která jako imunizační složku obsahuje $\Delta thy A$ kmen *Vibrio cholerae* podle vynálezu nebo $thy A^-$ kmen *Vibrio cholerae* připravený způsobem podle vynálezu.

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 by se mohla rezistence k antibiotiku v nežádoucí míře rozšiřovat na další bakterie.

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].

Jiná patentová přihláška [2], která souvisí s předmětem předkládaného vynálezu, popisuje vynález založený na znalosti DNA sekvence *thy A* z *E. coli*. Původci vnesli do buněk gen *thy A* v plazmidu, ale užili hostitelský kmen, kterým byla spontánní mutanta *thy A⁻* selektovaná na základě rezistence k trimethoprimu. Takové mutanty však nejsou dobře definovány (nesou bodové mutace nebo malé delece) a mohou snadno revertovat na divoký typ (tj. *thy A⁺*) s nepříjemně vysokou frekvencí. To by vedlo buď k eliminaci plazmidu z hostitelské

baktérie 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 dihydrofolátreduktázu (*folA*) a tudíž pak není komplementována genem *thyA* obsaženým v plazmidu [3]. Řízení o této patentové přihlášce bylo navíc zastaveno, alespoň v Evropě.

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

Thymidylátsyntetáza kódovaná genem *thyA* z *E. coli* a jiných bakterií katalyzuje metylaci deoxyuridylátu (dUMP) na deoxythymidylát (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].

Spontánní mutanty *thyA*⁻ 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*⁻, stanou se závislými na thyminu, ale v přítomnosti trimethoprimu již dále nespotřebovávají tetrahydrofolát.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na nové nukleotidové sekvenci genu *thy A* z *Vibrio cholerae*. Gen *thy A* 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 *thy A* *Vibrio cholerae*, který obsahuje krok místně-cílené mutageneze v chromozómu *V. cholerae* delecí a/nebo inzercí nukleotidů v lokusu genu *thy A*, 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 *thy A* kmenu *Vibrio cholerae*, kterým je Δ *thy A* kmen *Vibrio cholerae* postrádající funkční gen *thy A*. V tomto provedení vynálezu kmen Δ *thy A* *Vibrio cholerae* obsahuje jeden nebo několik autonomně se replikujících elementů DNA, které nesou funkci genu *thy A*, 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 Δ *thy A* kmen *Vibrio cholerae* podle vynálezu obsahuje v epizomálním autonomně se replikujícím prvku DNA, zejména plazmidu, cizorodý gen *thy A*, např. gen z *E. coli*.

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu Δ thy A kmen *Vibrio cholerae* podle vynálezu obsahuje v jednom nebo několika epizomálních autonomně se replikujících DNA elementech, zejména plazmidech, kromě cizorodého genu *thy A*, 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*.

Třetí aspekt předkládaného vynálezu se týká úseku nukleotidové sekvence sousedící s 5'-koncem (5'-flank) strukturního genu *thy A* 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 (3'-flank) strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 3 na obr. 3.

Nukleotidová sekvence id. č. 1 je užitečná pro vkládání cizorodých genů selektovatelným a místně cíleným způsobem do chromozómu *V. cholerae* a pro místně cílenou mutagenezi při přípravě kmenů *thy A* *Vibrio cholerae*.

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.

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 vynálezu jsou zvláště užitečné pro účely výzkumu a představují potenciální cíle antimikrobiální terapie.

Sedmý aspekt předkládaného vynálezu se týká vakcíny, která obsahuje jakožto imunizační složku $\Delta thy A$ kmen *V. cholerae* podle vynálezu nebo $thy A^-$ 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 složky obsahuje vehikulum, např. fyziologický roztok, a další složky obvykle užívané ve vakcínách jako jsou pufrý a adjuvans. Vhodná vehikula, pufrý a adjuvans a další složky jsou odborníkům známy a jsou popsány např. v Evropském lékopisu nebo Lékopisu USA.

Popis obrázků

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

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*.

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*.

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

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 inserci bloku genu kanamycinové rezistence Kan^R do místa *PstI* v genu *thy A* z *Vibrio cholerae* v pUC19.

Obr. 9 ukazuje polymerázovou řetězovou reakci (PCR) pro vytvoření fragmentu *thyA*-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 v pNEB193.

Obr. 12 ukazuje štěpení *XbaI*, kterým byl vystřižen gen Δ *thyA*Kan z pNEB193 a ligaci do pDM4 naštěpeného *XbaI*.

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

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

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

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

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

Příklady provedení vynálezu

Strategie experimentů

Pro přípravu definovaných *thy A* 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 *thy A* z *V. cholerae* do plazmidu, a to pomocí komplementace *thy A* 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 *thy A* 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 *thy A* z jiných organismů. Klonovaný gen byl navíc schopen komplementovat *thy A* fenotyp *Vibrio cholerae* získaný selekcí na rezistenci k trimethoprimu. Analýza sekvence této mutanty

ukázala, že v genu, který byl identifikován jako gen *thy A*, obsahuje skutečně jednu nukleotidovou záměnu, kterou vzniká stop-kodon a tudíž gen poskytuje nefunkční zkrácený produkt.

Znalost sekvence genu *thy A* a úseků lemujících tento gen umožnila využít vhodné suicidální ("sebevražedné") vektory pro místně-cílenou mutagenezi. Byly zvoleny následující strategie:

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

které jsou dále podrobněji popsány:

- a) Inzerční inaktivace genu *thy A* byla provedena vložením genového bloku Kan^R (se suicidálním vektorem pNQ705 [14]).
- b) delece úseku přibližné velikosti 400 bp byla provedena u kmenu nesoucího blok Kan^R, čímž byl odstraněn úsek velikosti asi 200 bp jak z genu *thy A* proti směru transkripce od místa inzerce tak i z genu Kan^R 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 Δ *thyA*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 Δ *thyA*.

Pro expresi rekombinantních genů vtěchto Δ *thyA* kmenech *V. cholerae* byly zkonstruovány dva expresní vektory. Každý

obsahoval *thy A* gen z *E. coli*, replikační počátek z obecně užívaného víceúčlového vektoru pUC19, promotor *tac* a terminátor transkripce *trpA* nezávislý na faktoru ρ . V jednom z těchto vektorů byl vložen také gen *lacI^q*, 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 Δ *thyA*. První gen kódoval B-subjednotku lidského tepelně labilního enterotoxinu z *E. coli* (LTB) (viz obr. 16) a druhý byl gen *sj26* kódující glutathion-S-transferázu (GST) ze *Schistosoma japonicum* (viz obr. 17).

LTB je strukturně podobný B-podjednotce cholerickeho toxinu přirozeně produkovaného hostitelským kmenem a byl secernován do kultivačního média. Druhý protein je eukaryotického původu a pochází z asijské jaterní motolice. *Sj26 GST* je exprimována ve vysoké hladině v *E. coli* a akumuluje se v cytoplazmě. Exprese 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 delecii 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*- (selektován na základě rezistence k trimethoprimu) a kultury byly nanášeny na plotny s modifikovaným Syncase (MS) agarem [11], s přidavkem 50 µg/ml 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 dvojitým 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 na 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 ³²P 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- plazmidem Thy A 1:2

Pro ověření toho, že klonovaný fragment *EcoRI/HindIII* podporuje růst *V. cholerae* fenotypu *thyA-*, 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 přídavku 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 inaktivaci genu *thyA* vložení genového bloku Kan^R a pak následnou parciální delecí genu *thyA* a genového bloku Kan^R.

Druhá strategie je zaměřena na úplnou delecí genu *thyA* z chromozómu *V. cholerae* pomocí 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.

Inaktivace genu *thyA* inzercí genového bloku Kan^R

Zde strategie zahrnovala inaktivaci genu *thyA* inzercí (vložením) genu rezistence ke kanamycinu do jedinečného místa *PstI* v genu *thyA* ve formě genového bloku Kan^R (Pharmacia) (viz obr. 8). Tento konstrukt byl amplifikován pomocí PCR (užitím systému Expand[™] High Fidelity PCR, Boehringer Mannheim) s oligonukleotidovými primery, které vnesly do konstruktů 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:

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 konjugační experimenty.

Jelikož recipientní kmen JS 1569 4.4 je rezistentní k rifampicinu a senzitivní k chloramfenikolu a donorový kmen *E. coli* S-17 je rezistentní jak k chloramfenikolu tak

kanamycinu, transkonjuganty 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 *thy A* nesoucí genový blok Kan^R do chromozómu a ztratily plazmid pNQ705 pak mohou být selektovány z těch, které jsou citlivé k chloramfenikolu, ale zůstaly rezistentní ke kanamycinu.

Pro ověření inserce genu rezistence ke kanamycinu do genu *thy A* byl celý gen *thy A* amplifikován pomocí PCR s oligonukleotidovými primery *thyA-10* a *thyA-11*, a velikost takto vzniklého fragmentu byla porovnána s velikostí nativního genu *thy A*. Byl nalezen očekávaný fragment velikosti 2,6 kb na rozdíl od nativního genu *thy A* 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^R . Sekvencování amplifikovaného fragmentu ukázalo, že jediný defekt v genu byl způsoben insercí genu rezistence ke kanamycinu. To ukazuje, že rekombinační událost, která vedla k inkorporaci inserčně 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 $\mu\text{g/ml}$).

Částečná delece genu *thyA* a genového bloku Kan^R .

Pro další zajištění stálosti mutace *thy A* byl inserčně inaktivovaný *thy A* subklonován jako *XbaI* fragment do plazmidu pNEB 193 (New England Biolabs). PCR primery byly navrženy

tak, že došlo k delecii úseku 209 páru bazí z genu *thyA* a 261 páru bazí z genového bloku Kan^R.

Takže gen *thyA* byl dále narušena 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 v 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 selektovány na plotnách obsahujících ampicilin. Byly izolovány jednotlivé kolonie a znovu očkovací kličkou nanášeny na plotny. DNA získaná minipreparací plazmidů z jednotlivých kolonií po štěpení restričními enzymy *XbaI*, *XhoI*, *HindIII* a *RsaI* poskytla očekávaný restriční vzorec.

Neúplný gen *thy A* nesoucí inaktivovaný gen rezistence ke kanamycinu byl z vektoru vyštěpen 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 (Δ *thyA*ΔKan) do buněk kmenu *E. coli* S-17 byly provedeny transkonjugační experimenty. V tomto případě byl kmen *V. cholerae* JS 1569 *thyA*Kan 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 klony nesoucí sebevražedný plazmid a byly zachovány pouze exkonjuganty, které plazmid ztratily.

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

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*.

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

Amplifikovaná DNA byla naštěpena vhodným restrikcími enzymy a klonována do vektoru pMT-SUICIDE 1 (obr. 14 a 15), čímž byl vytvořen plazmid pMT Δ thyAV.*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. Exkonjugaty, které ztratily sebevražedný plazmid byly selektovány na základě vnímavosti k chloramfenikolu.

Výsledky: Kolonie vnímavé k chloramfenikolu a rezistentní k rifampicinu byly selektovány. PCR amplifikace úseku *thy* A s primery ThyA-10 a ThyA-11 vedla ke vzniku fragmentu velikosti 1,4 kb z nativního genu *thy* A a fragmentu velikosti 0,6 kb z genu Δ thy A. Tím bylo potvrzeno, že strukturní 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

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

Byly zkonstruovány expresní vektory, obsahující gen *thy* A z *E. coli*, replikační počátek z vektoru s vysokým počtem kopií pUC19, promotor *tac* a terminátor transkripce *trpA* nezávislý na faktoru ρ . Vjednom z těchto dvou vektorů

byl vložen gen *lacI^q*, aby byla regulována exprese z promotoru *tac*, který obsahuje také sekvenci *lac* operátoru (obr. 16 a 17).

Expresse proteinu LTB v kmenu *V. cholerae JS1569 ΔthyA*

Expresní vektor ukázaný na obr. 16 byl elektroporací vnesen do buněk *V. cholerae JS1569 ΔthyA*. 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 μg/ml LTB. SDS-PAGE a westernový přenos se specifickými monoklonálními protilátkami dále potvrdily, že secernovaný protein byl LTB.

Expresse proteinu GST v kmenu *V. cholerae JS1569 ΔthyA*

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^q*, která dovoluje regulovat expresi rekombinantního proteinu. Vektor byl elektroporací vnesen do buněk *V. cholerae JS1569 ΔthyA*. 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 GST (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.
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 polyglutamylolation. *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.
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. 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*. 14:1664-1673.
6. Neuhard, 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.
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.
9. Wilson, K. 1994. Preparation of genomic DNA from Bacteria. *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. 2.4.1-2.4.2 John Wiley & Sons, New York.

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.
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* 74:5463-5467.
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.
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: 4914-4918.
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., FitzHugh, 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., 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.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy *thy A⁻* kmenu *Vibrio cholerae* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok místně-cílené mutagenese v chromozómu *V. cholerae*, kterou se odstraní a/nebo vloží nukleotidy do lokusu genu *thy A*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 1 uvedenou na obr. 1.
2. Kmen *thy A⁻ Vibrio cholerae*, který je Δ *thy A* kmen postrádající funkci genu *thy A*.
3. Kmen *V. cholerae* podle nároku 2 obsahující jeden nebo několik epizomálních autonomně se replikujících DNA elementů, které obsahují funkční gen *thy A*, což umožňuje kmenu růst v kultivačním médiu bez přítomnosti thyminu.
4. Kmen Δ *thy A V. cholerae* podle nároku 3, kde epizomální autonomně se replikující DNA element je plazmid.
5. Kmen Δ *thy A V. cholerae* podle nároku 3 nebo 4, který obsahuje cizorodý gen *thy A*.
6. Kmen Δ *thy A V. cholerae* podle nároku 5, kde cizorodý gen *thy A* je gen z *E. coli*.
7. Kmen Δ *thy A V. cholerae* podle kteréhokoliv z nároků 3 až 6, kde jeden nebo několik epizomálních autonomně se replikujících DNA elementů také obsahuje strukturální gen kódující homologní nebo heterologní protein.

8. Kmen Δ thy A *V. cholerae* podle nároku 7, kde kódovaný protein je vybrán ze skupiny obsahující B-podjednotku tepelně labilního enterotoxinu *E. coli* (LTB) a glutathion-S-transferázový protein 26 kD ze *Schistosoma japonicum* (GST 26 kD).
9. Nukleotidová sekvence genu *thy A* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 1 uvedenou na obr. 1.
10. Nukleotidová sekvence 5'-lemujícího úseku strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 2 uvedenou na obr. 2.
11. Nukleotidová sekvence 3'-lemujícího úseku strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae*, který má v podstatě nukleotidovou sekvenci id. č. 3 uvedenou na obr. 3.
12. Protein kódovaný nukleotidovou sekvencí genu *thy A* z *Vibrio cholerae* podle nároku 9.
13. Protein podle nároku 12, který má aminokyselinovou sekvenci id. č. 4 uvedenou na obr. 4.
14. Protein kódovaný nukleotidovou sekvencí 5'-lemujícího úseku strukturního genu *thy A* z *Vibrio cholerae* podle nároku 10.
15. Protein podle nároku 14, který má aminokyselinovou sekvenci id. č. 5 uvedenou na obr. 5.
16. Vakcína v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jakožto imunizační složku Δ thy A kmen *Vibrio cholerae*.

201100

- 25 -

podle kteréhokoliv z nároků 2 až 8 nebo thy A⁻ kmen *Vibrio cholerae* připravený způsobem podle nároku 1.

201100

P/2010-4354

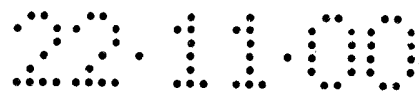
1/18

Obr. 1

RUB

Sekvence id. č. 1

GAGAAGGTTT GTTATGCCTC AGGTTATCT GCAGTTTCCC AATATTGACC CCGTATTGTT 60
 TTCGATCGGC CCTCTAGCGG TGCCTGGTA TGGCTTGATG TATTTGGTGG GTTTCCTTTT 120
 TGCTATGTGG TTGGCCAATC GCCGAGCGGA TCGCGCGGGC AGTGGTTGGA CGCGTGAGCA 180
 AGTCTCTGAC TTGTTATTCG CCGGCTTTTT AGGTGTAGTG ATCGGTGGCC GAGTTGGTTA 240
 TGTGATCTTC TACAATTTTG ATCTGTTCTT TGCTGACCCT CTTTATTTAT TCAAAGTGTG 300
 GACTGGCGGC ATGTCCTTCC ACGGCGGCTT ATTGGGTGTG ATCACCGCCA TGTTCTGGTA 360
 TGCGCGTAAA AACCAACGCA CCTTCTTTGG TGTGGCCGAT TTTGTTGCC CTTTAGTGCC 420
 ATTCGGTTTG GGGATGGGAC GTATCGGTAA CTTTATGAAT AGTGAAC TTT GGGGACGAGT 480
 AACGGATGTG CCTTGGGCTT TTGTATTCCC TAATGGTGGC CCACTGCCGC GCCATCCTTC 540
 ACAGCTTTAT GAATTCGCCT TAGAAGGCGT GGTTCTGTTC TTTATTCTTA ATTGGTTTAT 600
 TGGTAAACCT CGTCCGCTAG GCAGCGTATC CGGACTGTTT TTAGCTGGAT ACGGTACATT 660
 CCGCTTCCTT GTGGAATACG TCCGTGAGCC AGATGCTCAG TTGGGTCTGT TTGGTGGCTT 720
 CATTTC AATG GGGCAAATCC TCTCCTTACC TATGGTGATC ATCGGTATTT TGATGATGGT 780
 TTGGTCTTAC AAGCGCGGTT TGTATCAAGA CCGTGTAGCA GCAAATAGG GTAGTTAGGT 840
 GAAACAGTAT TTAGATCTTT GTCAGCGCAT CGTCGATCAA GGTGTTTGGG TTGAAAATGA 900
 ACGAACGGGC AAGCGTTGTT TGACTGTGAT TAATGCCGAT TTGACCTACG ATGTGGGCAA 960
 CAATCAGTTT CCTCTAGTGA CTACACGCAA GAGTTTTTGG AAAGCTGCCG TAGCCGAGTT 1020
 GCTCGGCTAT ATTCGTGGTT ACGATAATGC GGCGGATTTT CGCCAATTAG GTACCAAAC 1080
 CTGGGATGCT AATGCCAATT TAAACCAAGC ATGGCTCAAC AATCCTTACC GTAAAGGTGA 1140
 GGATGACATG GGACGCGTGT ATGGTGTTC A GGGTAGAGCT TGGGCTAAGC CTGATGGTGG 1200
 TCATATTGAC CAGTTGAAAA AGATTGTTGA TGATTTGAGC CGTGGCGTTG ATGACCGAGG 1260
 TGAAATTCTT AACTTCTACA ATCCGGGTGA ATTTACATG GGGTGTTC GCCCTTGCAT 1320
 GTACAGCCAT CATT TTTTCAT TGCTGGGGGA TACCTTGTAT CTCAACAGTA CTCAGCGTTC 1380
 ATGTGATGTG CCCTTGGGGT TGAATTTCAA CATGGTGCAG GTTTATGTGT TCCTTGCGCT 1440
 GATGGCACAG ATCACAGGA AAAAGCCGGG CTTGGCGTAT CACAAGATCG TCAATGCGCA 1500



Obr. 1 (pokrač.)

CATTTACCAA 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 GGCAGTTCGC GTAAGAAAGG 1920
AATACCGTAA ATCAAGACCG TAGCCATCAA GTTAAAGCTT AAGTGCACCA GCGCAATTTG 1980
CAGAGCAAAC ACGGCAAACCT CACCAGAGAC AGCGGTTGCG GCGAGCAGAG CAGTAATACA 2040
AGTGCCAATG TTCGCACCTA AGGTAAATGG GTAGATTTCA CGCACTTTCA GCACGCCAGA 2100
GCCCACGAGA GGAACCATTA GGCTGGTTGT GGTCGATGAA GATTGAACTA ATACCGTAAC 2160
CACTGTACCT GAAGCAATAC CGTGTAGTGG GCCTCGGCCA ATCGCATTTT GTAGAATTTT 2220
ACGTGCGCGG CCAACCATCA AACTCTTCAT CAGTTTGCCC ATCACCGTAA TGGCGACGAA 2280
AATGGTCGCA ATACCCAATA CGATAAGTGC GACACCACCG AAAGTATTAC CCAATACCGA 2340
AAGCTGGGTT TCAAGCCCTG TGATGACAGG TTTGGTAATC GGTTTGATAA AATCAAAACC 2400
TTTCATGCTC ATATCGCCAG TCGCAAGCAG AGGCGAAACG AGCCAGTGTG AGACTTTCTC 2460
TAAAATGCCA AACATCATTT CTAGAGGTAG GAAGATCAGC ACCGCGAGAA GATTGAAAAA 2520
ATCGTGGATG GTGGCACTGG CGAAAGCAGG 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
TTTCGTGGTC AGCGAAATCG GCGCTGCAG 2909

Sekvence id. č. 2

GAGAAGGTTT GTTATGCCTC AGGGTTATCT GCAGTTTCCC AATATTGACC CCGTATTGTT 60
TTCGATCGGC CCTCTAGCGG TGCCTGGTA TGGCTTGATG TATTTGGTGG GTTTCCTTTT 120
TGCTATGTGG TTGGCCAATC GCCGAGCGGA TCGCGCGGGC AGTGGTTGGA CGCGTGAGCA 180
AGTCTCTGAC TTGTTATTCTG CCGGCTTTTT AGGTGTAGTG ATCGGTGGCC GAGTTGGTTA 240
TGTGATCTTC TACAATTTTG ATCTGTTCCCT TGCTGACCCT CTTTATTTAT TCAAAGTGTG 300
GACTGGCGGC ATGTCCTTCC ACGGCGGCTT ATTGGGTGTG ATCACCGCCA TGTTCTGGTA 360
TGC GCGTAAA AACCAACGCA CCTTCTTTGG TGTGGCCGAT TTTGTTGCCC CTTTAGTGCC 420
ATTCGGTTTG GGGATGGGAC GTATCGGTAA CTTTATGAAT AGTGAAC TTT GGGGACGAGT 480
AACGGATGTG CCTTGGGCTT TTGTATTCCC TAATGGTGGC CCACTGCCGC GCCATCCTTC 540
ACAGCTTTAT GAATTCGCCT TAGAAGGCGT GGTTCGTTC TTTATTCTTA 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 GCAAATAGG GTAGTTAG 838

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
GCCCAAGTTG	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	TCAAACCTCT	CATCAGTTTG	CCCATCACCG	TAATGGCGAC	GAAAATGGTC	600
GCAATACCCA	ATACGATAAG	TGCGACACCA	CCGAAAGTAT	TACCCAATAC	CGAAAGCTGG	660
GTTTCAAGCC	CTGTGATGAC	AGGTTTGGTA	ATCGGTTTGA	TAAAATCAAA	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	ACCCACCGGC	AACGAGACCA	ACAATAATAG	AAGTCACCGT	GCTTGAGGAT	1020
TGAATCAGTG	CCGTTGCCAC	TAAACCAATC	ATCAATCCTG	CAATTGGGTG	GGAAGCAAAT	1080
TCAAATAGAA	CTTTGGCTTG	ATCGCCGGTT	GCCCATTTAA	AACCGCTGCC	GACCATCGCG	1140
ACTGCAAGAA	GTAGTAAATA	CAGCATGAAA	GCCAAGTTTG	CCCAACGTAG	GCCTTTCGTG	1200
GTCAGCGAAA	TCGGCGCTGC	AG				1222

001100

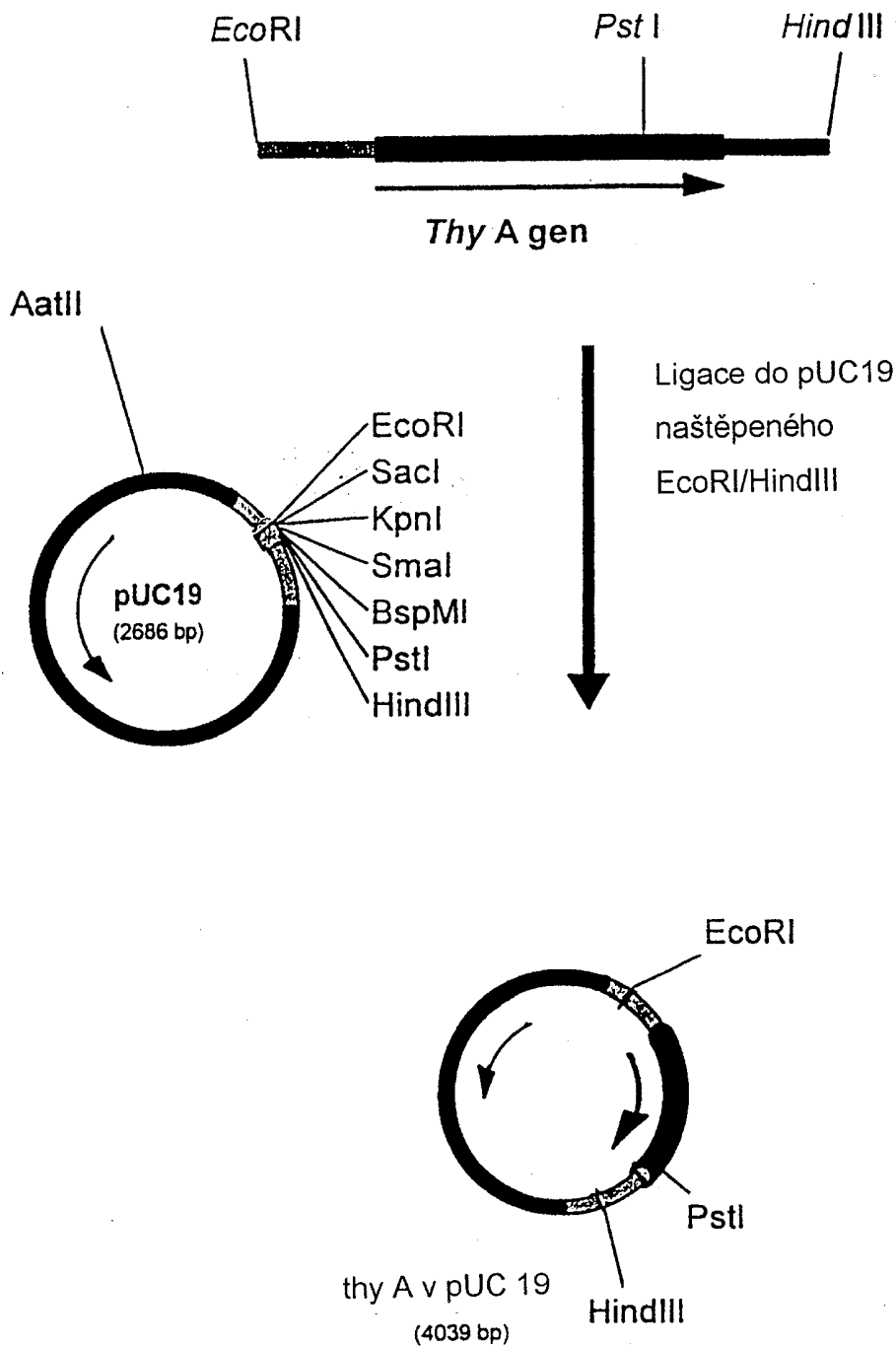
5/18

Obr. 4

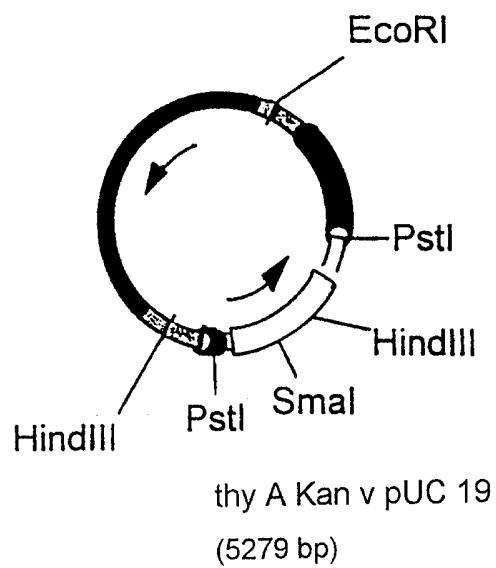
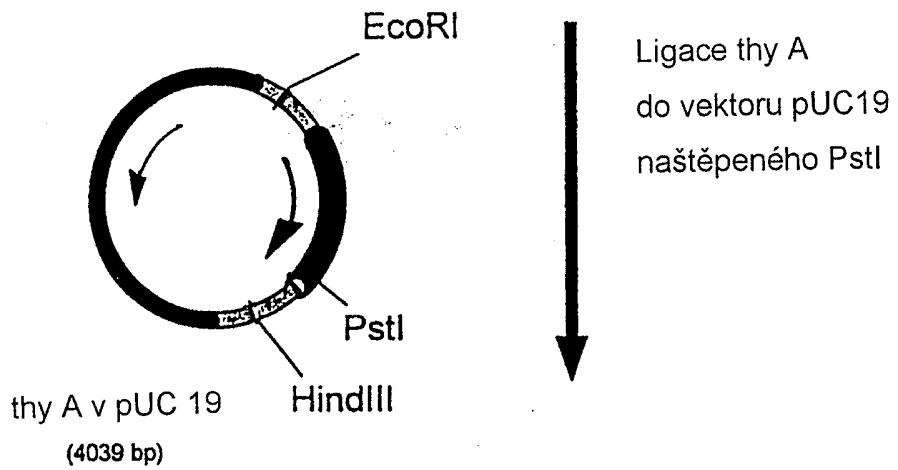
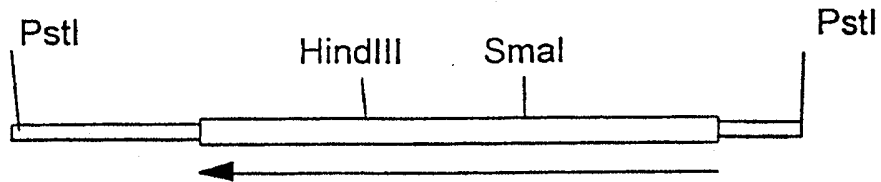
Sekvence id. č. 4

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								

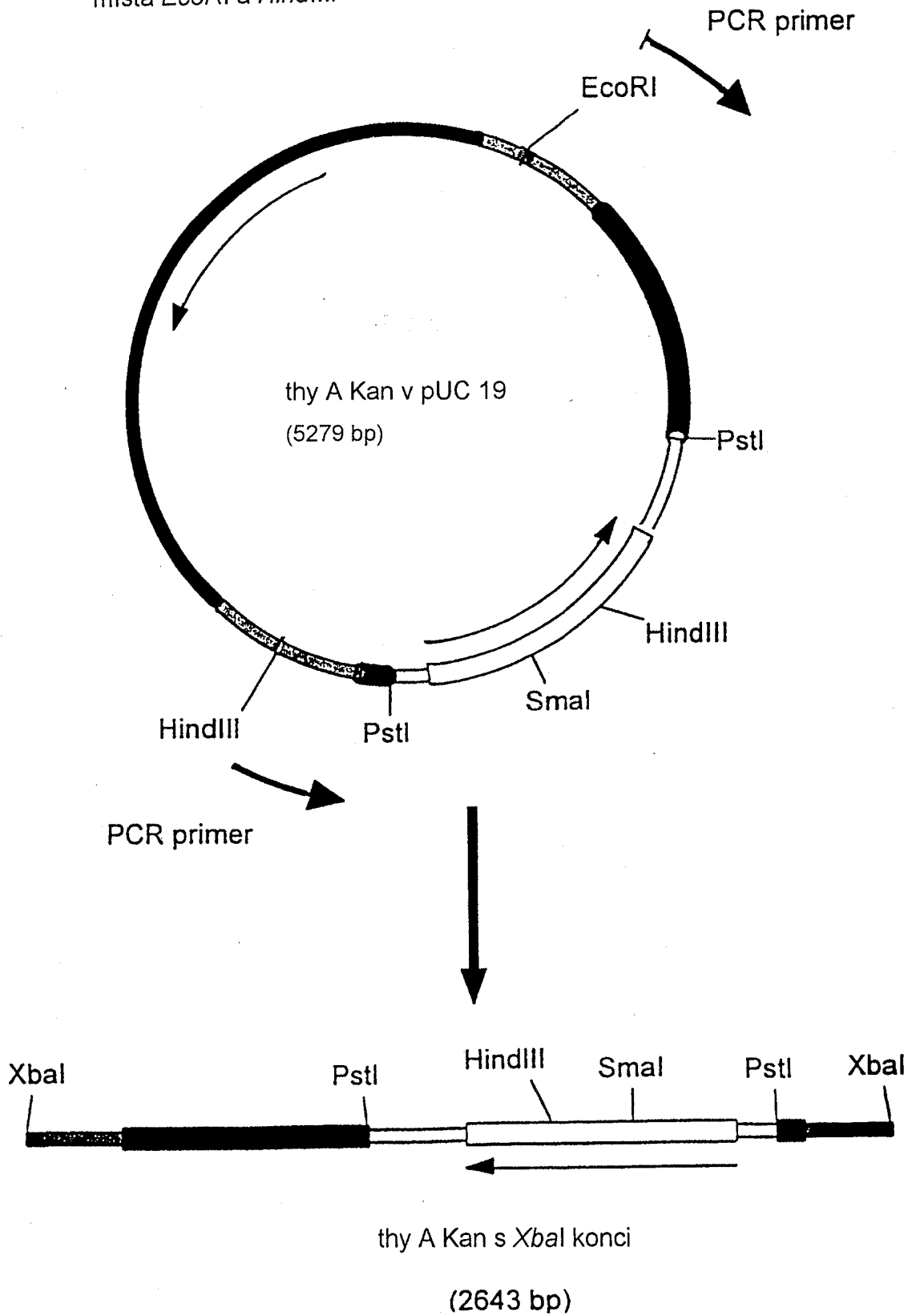
Obr. 6



štěpení genového bloku Kan
z pUC4K enzymem PstI

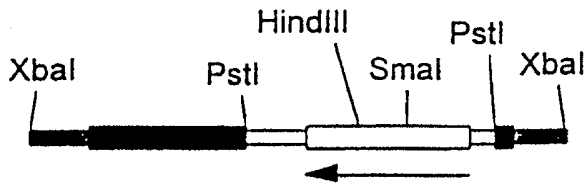


PCR pro vytvoření fragmentu thyA-kan-ThyA s konci XbaI.
Primery byly vybrány tak, aby byla eliminována
místa EcoRI a HindIII.



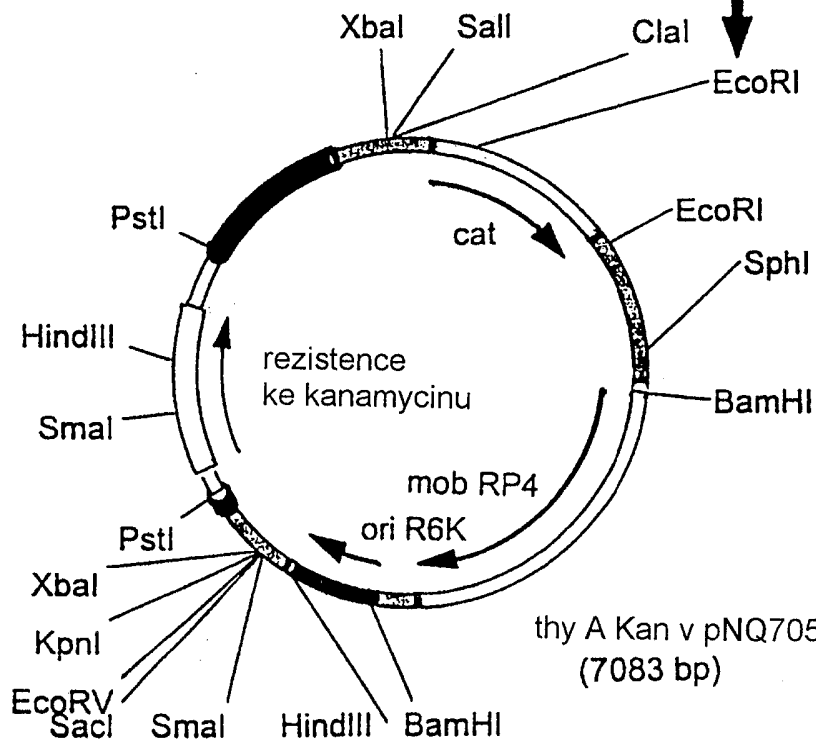
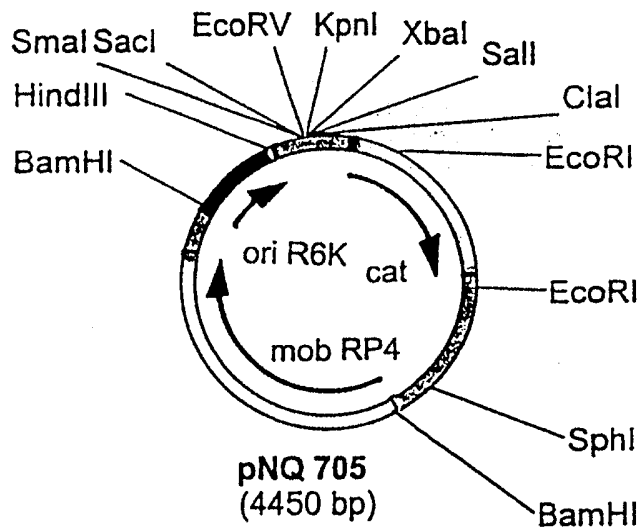
11/18

Obr. 10



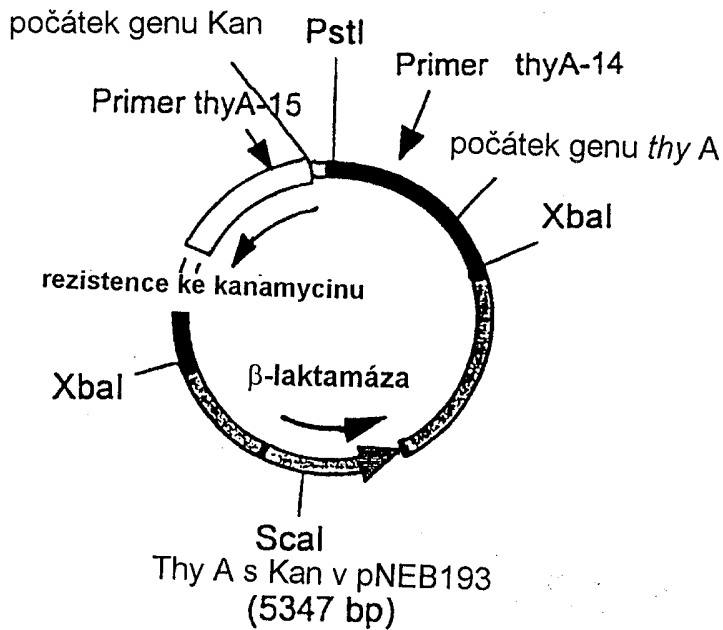
thy A Kan s XbaI konci
(2643 bp)

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

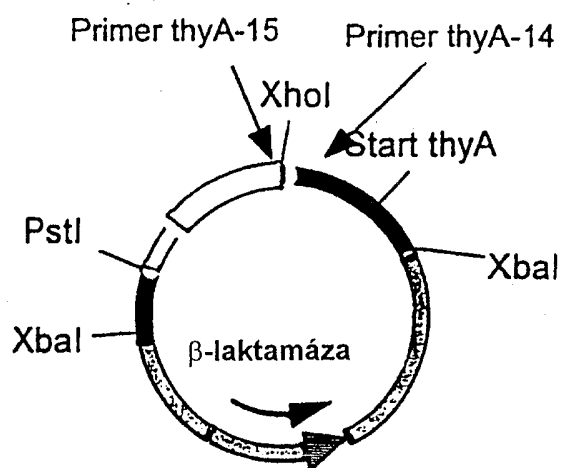
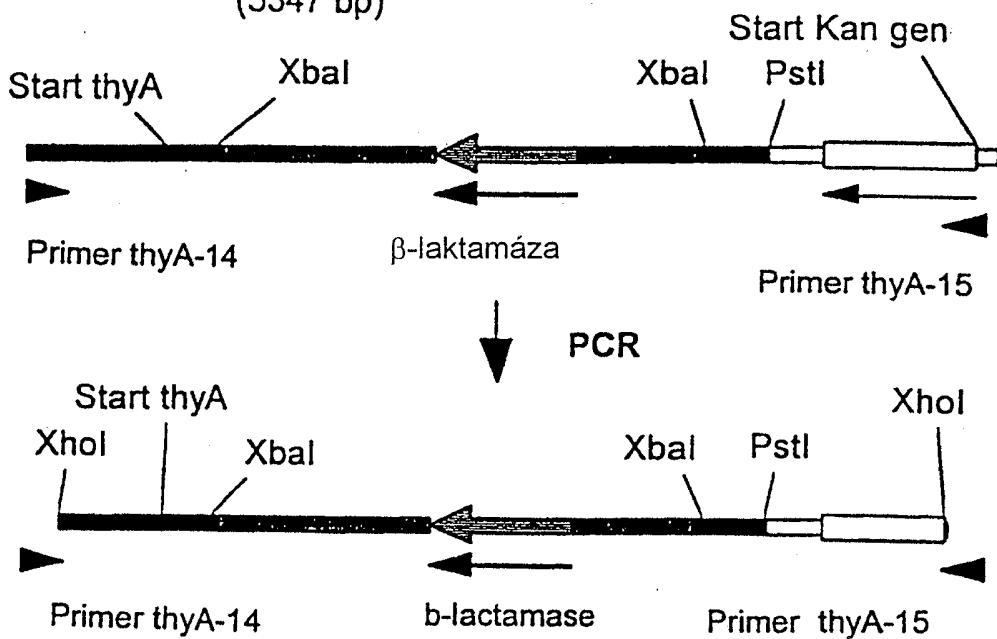


thy A Kan v pNQ705
(7083 bp)

Obr. 11



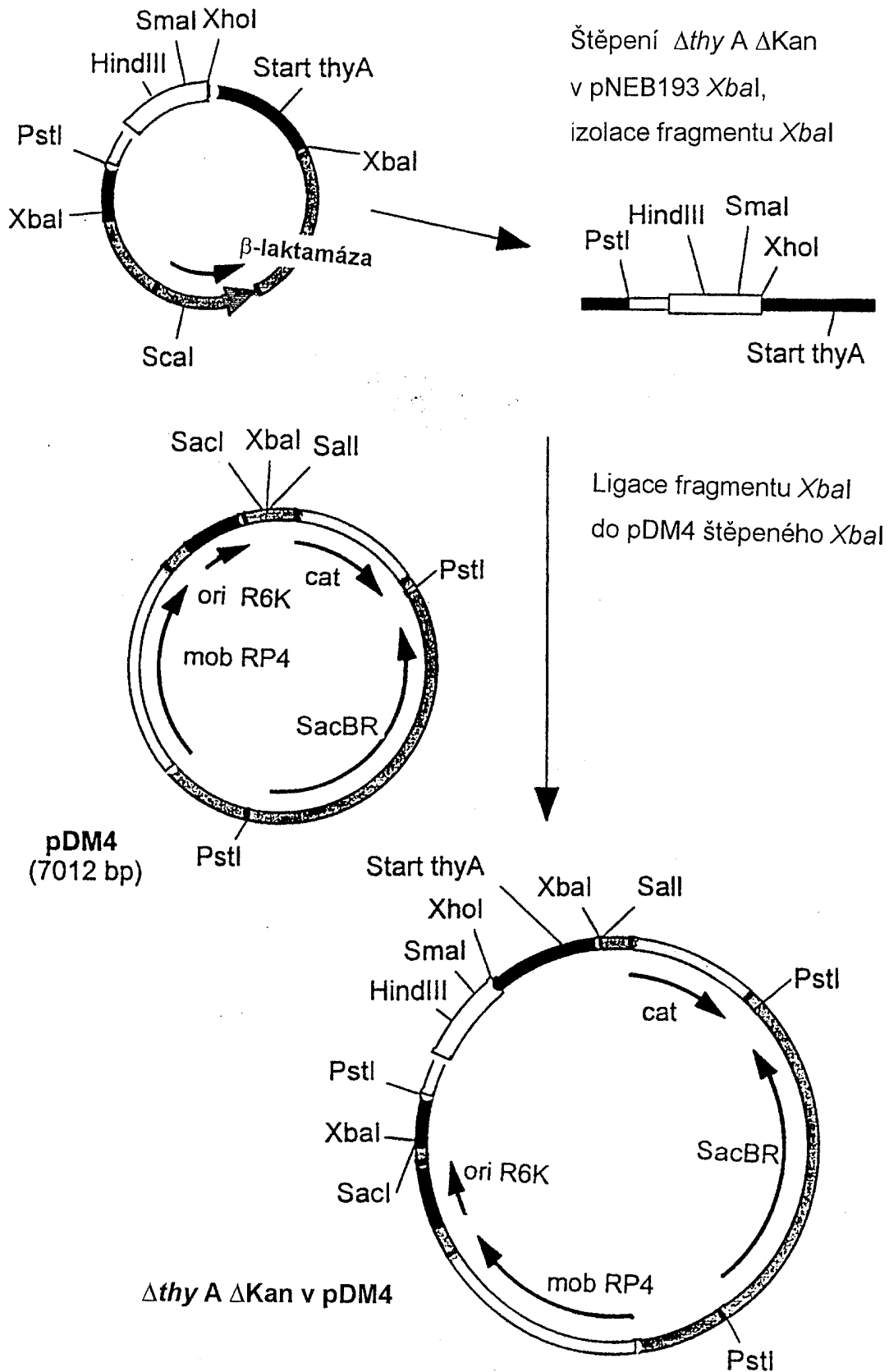
PCR použitá k delecii
části genu *thy A*
a počátku genu rezistence
ke kanamycinu



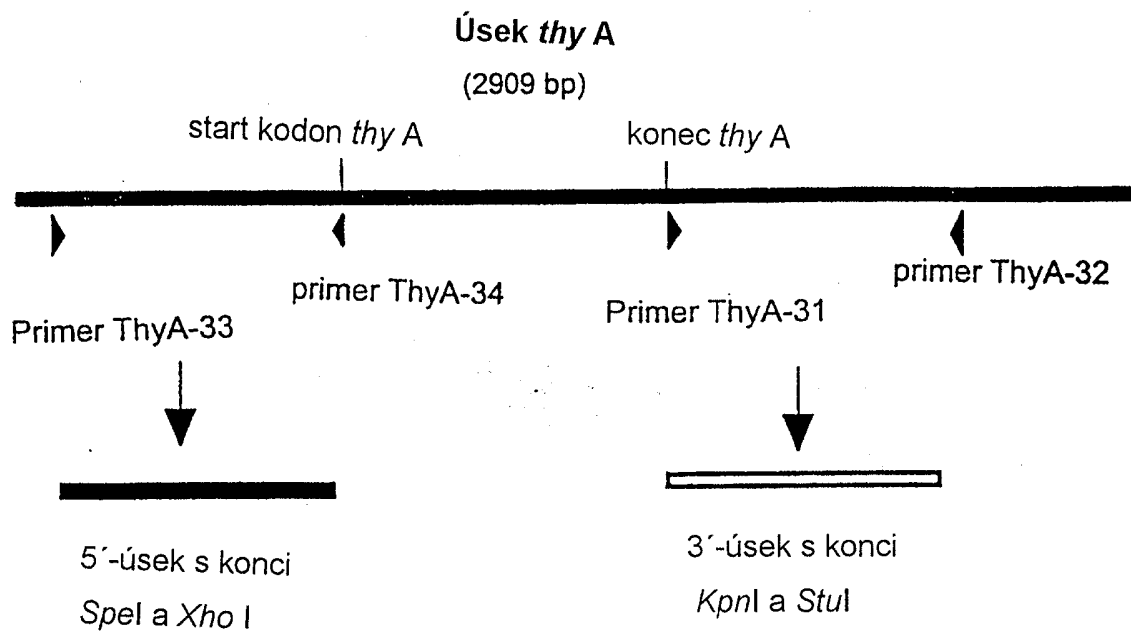
štěpeno XhoI
a self-ligováno

Δ *thy A* Δ Kan v pNEB193
(4877 bp)

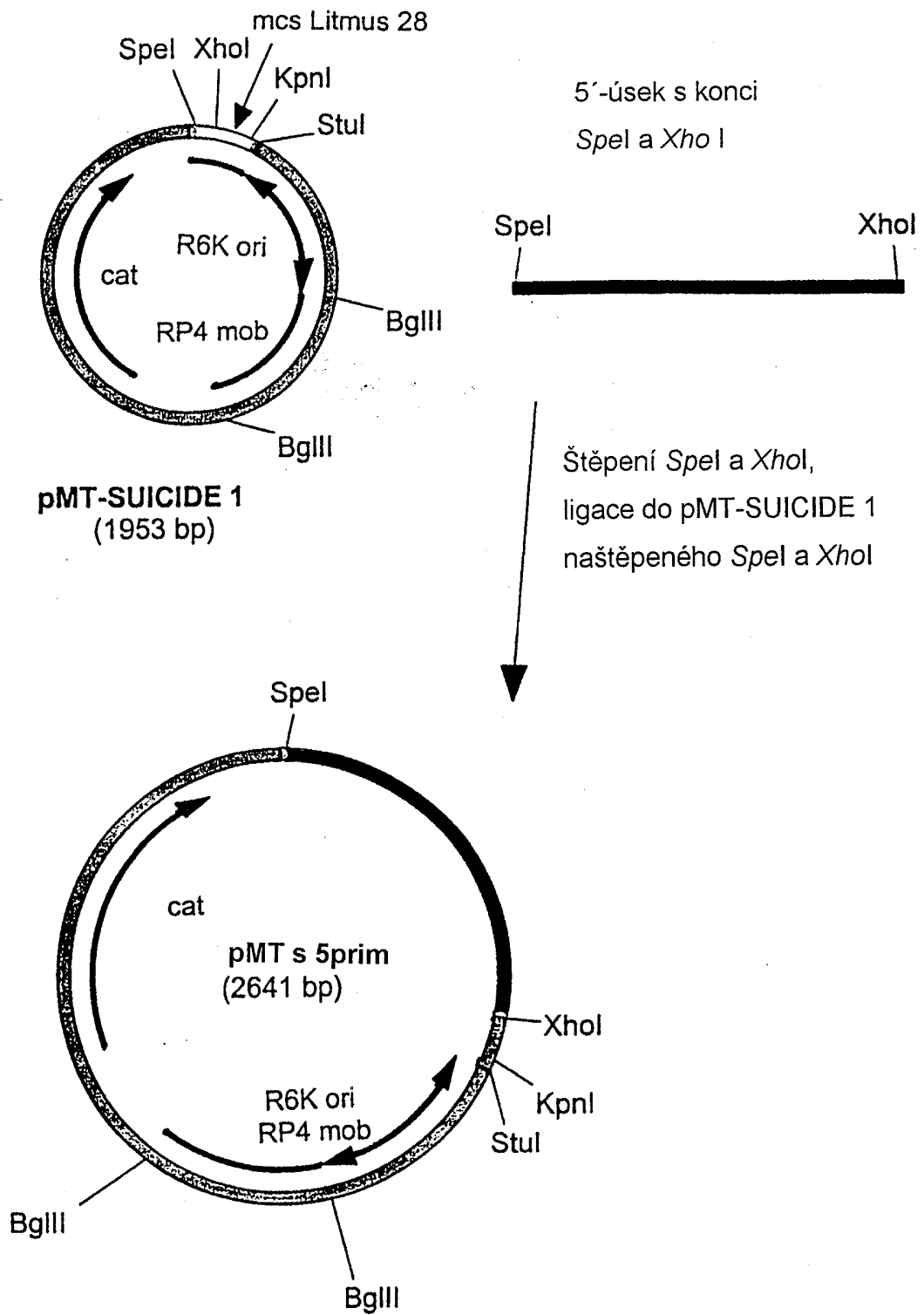
Obr. 12



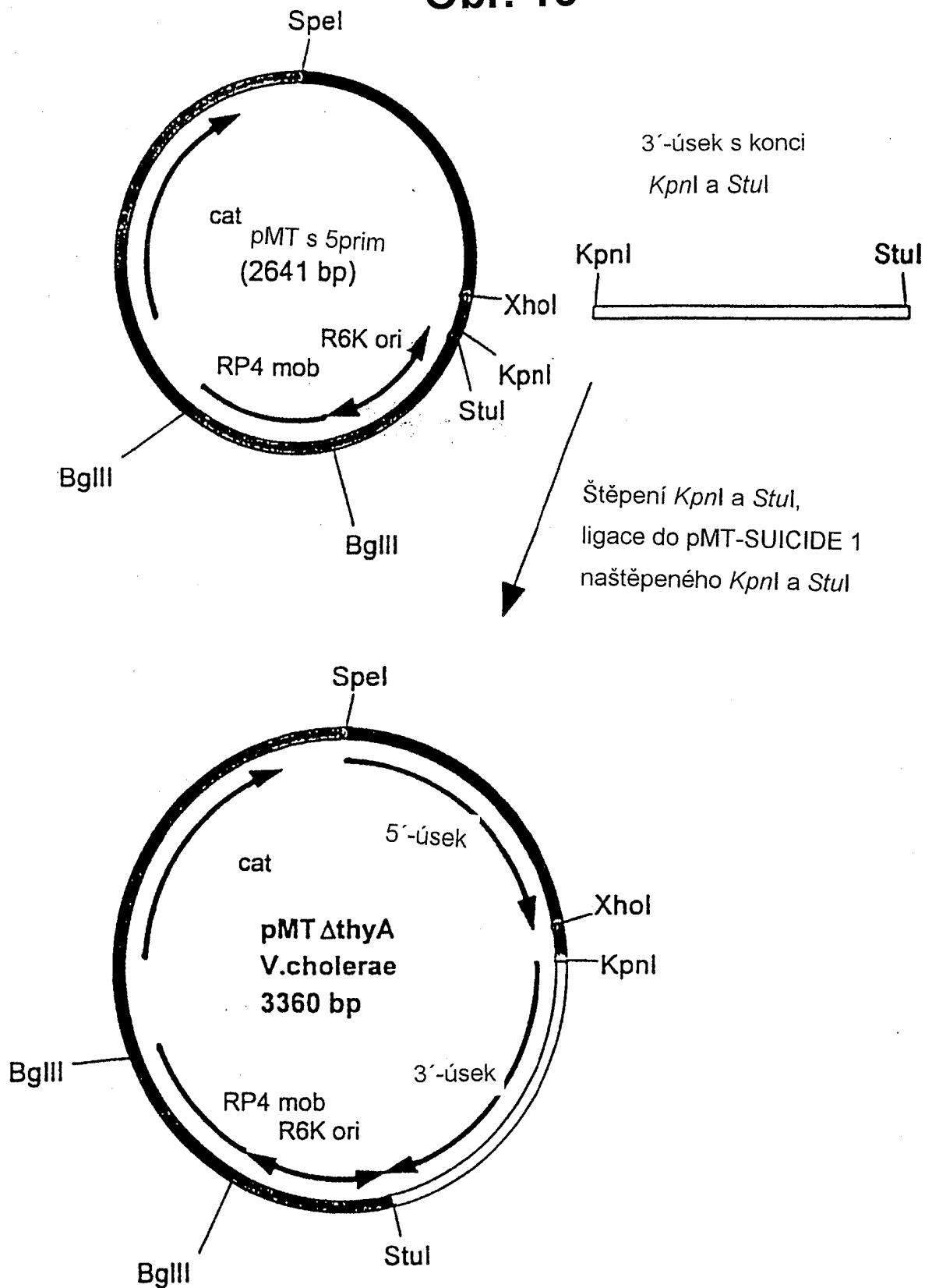
Obr. 13



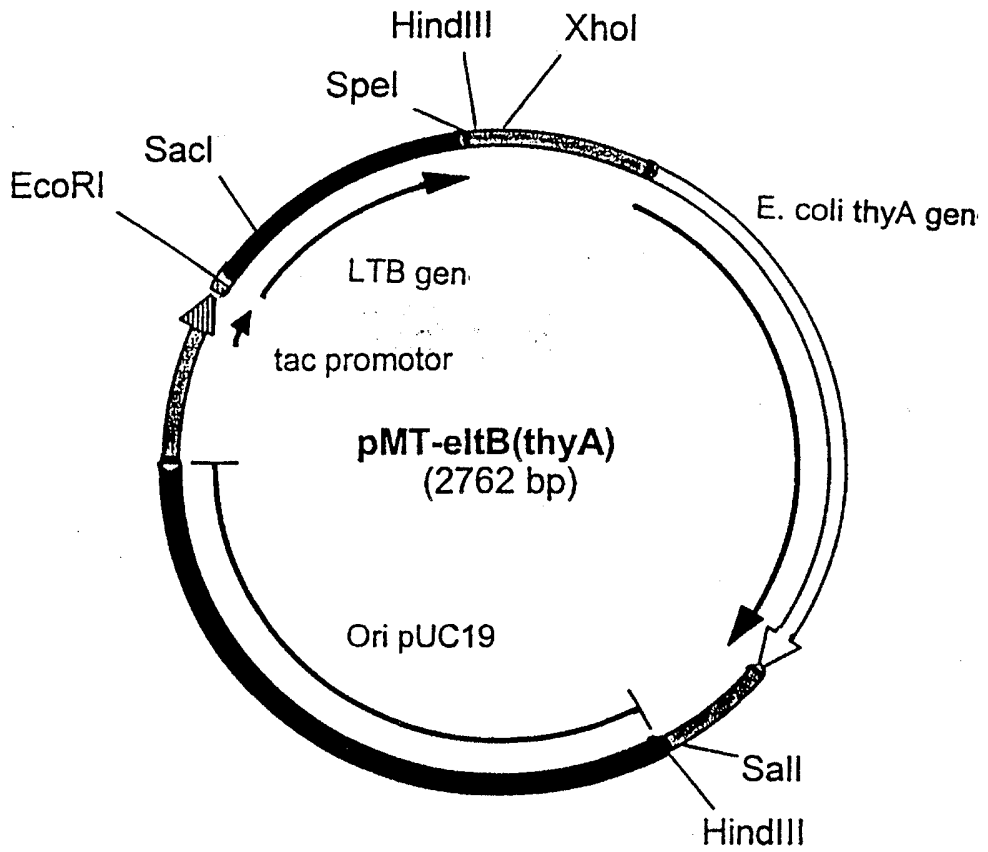
Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16



Obr. 17

