

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

# 33 390

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12N 15/11* (2006.01)

*C12N 15/31* (2006.01)

*C07K 14/00* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36729**

(22) Přihlášeno: **09.10.2019**

(47) Zapsáno: **19.11.2019**

(73) Majitel:  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,  
Brno, Medlánky, CZ

(72) Původce:  
Mgr. Adam Norek, Ph.D., Brno, Štýřice, CZ  
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ

(74) Zástupce:  
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitného vzoru:  
**Genový konstrukt pro produkci  
lipoproteinů a bakteriální display v E. coli, a  
jeho produkt**

CZ 33390 U1

## Genový konstrukt pro produkci lipoproteinů a bakteriální display v *E. coli*, a jeho produkt

### Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká genového konstrukt pro expresi proteinů s N-terminálním cysteinem modifikovaným mastnou kyselinou nebo kyselinami, a bakteriální display v *Escherichia coli* (*E. coli*), a aminokyselinového produktu tohoto genového konstrukt.

10

### Dosavadní stav techniky

Lipoproteiny představují minoritní skupinu proteinů, které však díky schopnosti ukotvení v plasmatické membráně hrají velmi významnou roli v interakci buněk s okolním prostředím. Tato třída proteinů je tedy velmi zajímavá nejen z hlediska fyziologického, ale také z pohledu technologického. Lipidizace uděluje molekulám proteinů unikátní vlastnosti. Příkladem může být zvýšená imunogenicita způsobená připojením mastných kyselin z bakteriální cytoplasmatické membrány, která nachází uplatnění v přípravě vakcín. Lipidickou komponentu lze využít také při imobilizaci proteinů na hydrofobních částicích (např. lipozomy). Navíc, ve spojení s mechanismy zodpovídajícími za vystavení exprimovaných proteinů přímo na povrchu hostitelské bakterie lze expresní systém využít i pro vysokokapacitní screening knihoven proteinových mutantů.

Příprava lipoproteinů v množstvích uplatnitelných v biotechnologických aplikacích je ovšem náročný proces, a to díky rozsáhlé kaskádě podílející se na jejich syntéze. Ačkoliv existuje několik řešení samotné lipidizace (T. Jones a V. Tyron, *Gene*, 1995, 165(1), 145-146; Leião et al., *Archives of Virology*, 2000, 145(8), 1639-1657; Cullen et al., *Plasmid*, 2003, 49(1), 18-29), následná lokalizace na vnější membráně gram-negativních bakterií a přesmyk lipoproteinu na povrchu bakterie, je v současných produkčních systémech nedořešena. Jednotlivé kroky syntézy, procesování a transportu lipoproteinů jsou ovlivněny nejen signální sekvencí molekuly prelipoproteinu (Babu et al., *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(8), 2761-2773), ale také zastoupením aminokyselin za modifikovaným cysteinem (retenční signál), které rozhodují o zadržení lipoproteinu ve vnitřní membráně nebo jeho transportu na membránu vnější. Významnou úlohu hraje i afinita prelipoproteinu k jedné ze tří kaskád zodpovědných za jeho přenesení z cytoplazmy na vnitřní membránu. Tyto transportní mechanismy zároveň určují, zda bude protein transportován ve sbaleném (aktivním stavu), či jako rozvolněný polypeptidový řetězec k jehož sbalení dochází až v průběhu lipidizace a průchodu přes periplazmu (Pathania et al., *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(11), 849-856).

Z našich předcházejících experimentů vyplývá, že o výsledné lokalizaci lipoproteinů rozhoduje nejen signální sekvence a retenční signál, ale také povaha proteinové partikule jako takové (sekvenční i strukturní). Na těchto zjištěních je založeno i předkládané technické řešení, jehož lze využít pro produkci lipoproteinů na fúzním proteinovém nosiči a jejich vystavení na vnější plasmatické membráně *E. coli*.

45

### Podstata technického řešení

Předkládané technické řešení se týká genového konstrukt pro expresi proteinů s N-terminálním cysteinem modifikovaným mastnou kyselinou nebo kyselinami. Vznikající modifikované proteiny, lipoproteiny, jsou následně transportovány z cytoplazmy expresních buněk *E. coli* na vnější plasmatickou membránu, kde jsou ukotveny pomocí mastných kyselin a vystaveny do vnějšího prostředí.

Předmětem technického řešení je genový konstrukt mající sekvenci

5 TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCGACCAAA  
 CTGGTGCTGGGCGCGGTGATTCTGGGCAGCACCTGCTGGCGGGCTGCGATGATAGC  
 GGCAAAGATGGCAACGTCGACACCCTGACCGGTAACCATCACCTGGAAGTTGA  
 ACCGTCTGACACCATCGAAAACGTTAAAGCGAAAATCCAGGACAAAGAAGGTATCC  
 CGCCGGACCAGCAGGAAGTCTTCGCGGGTAAACAGCTGGAAGACGGTCGTACC  
 CTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAATCTACCCTGCACCTGGTTCTGCATCTTGAGT  
 CTGCCACCACCACCTCTGGTCACCACCACCGGTCACCACCACCTCTGGTT  
 10 CTCACCACCTCTGGTGCCGAAAACCTGTACTTCCAGTCTGGTTCTGGTGTGACAC  
 CATGGTTAGCGGTGGATCCGAGCTCAAGCTTCTCGAGTCTGCCACCACCACCTC  
 TGGTCACCACCACCGGTCACCACCACCTCTGGTTCTCACCACCTAATAGCT  
 CGAGTAATAGGCGGCCGC (SEQ ID NO. 1)

15 nebo sekvence obsahující synonymní mutace kódující stejné aminokyseliny.

Předmětem technického řešení je dále aminokyselinová sekvence kódovaná genovým konstruktem podle technického řešení:

20 SRNNFV\*L\*EGDIHMKATKLVLGAVILGSTLLAGCDDSGKDGNDTLTGKTITLEVEPSD  
 TIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLHLESAHHHHS  
 HHHTGHHHSHSGSHHSHGAENLYFQSGSGVDTMVS GGSELKLLSAHHHSHGHHTGH  
 HHHSGSHHH\*\*LE\*\*AA (SEQ ID NO. 2), kde hvězdičky značí stop-kodon.

25 Genový konstrukt podle předkládaného technického řešení lze začlenit do některého expresního vektoru s indukovatelným promotorem a selekčním genem (např. rezistenci na antibiotikum) a do něj vložit insert kódující libovolný protein, jehož nukleotidová sekvence je ve stejném čtecím rámci jako nukleotidová sekvence genového konstrukt. Takto exprimovaný protein ukotvený na vnější membráně lze využít při aktivitních nebo afinitních studiích, stejně tak lze protein izolovat pro další použití. Mezi vhodné expresní vektory umožňující vložení genového konstrukt patří například vektory z rodiny pET a pUEx a od těchto odvozené. K usnadnění inkorporace genového konstrukt do expresního vektoru je konstrukt vybaven počátečním a koncovým místem rozpoznávaným restrikcími endonukleázami *XbaI* a *NotI*.

35 Genový konstrukt podle předkládaného technického řešení je tvořen kombinací nukleotidových sekvencí kódujících aminokyselinovou sekvenci, v níž je fúzováno pět funkčních oblastí zajišťujících, v postupných krocích, tvorbu cílového proteinu modifikovaného mastnými kyselinami. Jednotlivé signální a funkční aminokyselinové sekvence zajišťují v následujících krocích 1.) hydrolyzu signální aminokyselinové sekvence; 2.) post translační modifikaci N-terminálního cysteinu diacylglycerolem na atomu síry a acylem na volné NH-skupině, přičemž acylové skupiny představují satureované mastné kyseliny sumárního vzorce  $C_xH_{2x}O_2$ ; 3.) transport modifikovaného proteinu k vnější plazmatické membráně; 4.) ukotvení modifikovaného proteinu do vnější plazmatické membrány a 5.) umožnění dostatečné konformační volnosti k zajištění přirozeného sbalení proteinu, přístupnosti z vnějšího prostředí a možnosti tvorby vyšších organizačních struktur (dimery, oligomery). Genový konstrukt je doplněn o histidinovou kotvu pro usnadnění izolace cílového proteinu. Konstrukt dále obsahuje aminokyselinovou sekvenci rozpoznávanou a hydrolyzovanou TEV proteázou, jež může být využita ke specifickému štěpení modifikovaného proteinu na povrchu *E. coli* a tím k jeho uvolnění do vnějšího prostředí. Genový konstrukt je upraven tak, aby do něj bylo možno vložit gen kódující protein, jež spolu s popisovaným konstruktem prochází po indukci stejnými kroky post translační modifikace  
 45 N-koncového cysteinu a následně je transportován a ukotven na vnější plazmatickou membránu *E. coli*.

## 1. Signální sekvence

Signální sekvence je krátký peptid na N-koncové části translatovaného genového konstruktů, díky které je při expresi udělena produkovanému proteinu afinita k Sec translokáze, jež tento protein přenáší z cytoplazmy gramnegativní bakterie *E. coli* přes vnitřní cytoplazmatickou membránu. Na vnější straně plazmatické membrány je tato sekvence rozpoznána kaskádou enzymů zajišťující její hydrolýzu doprovázenou acylací cysteinu následujícího za signální sekvencí (signální peptidáza, Lgt, Lsp, Lnt). Odštěpením signální sekvence zajišťuje signální peptidáza II.

> *DNA kódující Signální sekvenci*

ATGAAAGCGACCAAACTGGTGCTGGGCGCGGTGATTCTGGGCAGCACCCCTGCTGGC  
GGGC

> *Aminokyselinová sekvence Signální sekvence*

MKATKLVLGAVILGSTLLAG

## 2. Retenční signál

Retenční signál je skupina tří aminokyselin, v translatovaném genovém konstruktů, následujících za signální sekvencí, z nichž na první pozici je cystein, jež je v průběhu odštěpení signální sekvence modifikován diacylglycerolem a acylem za účasti lipoproteinové kaskády využívající enzymy (Lgt, Lsp, Lnt) přes meziproducty apolipoprotein (diacyl lipoprotein) a hololipoprotein (triacyl lipoprotein). Následující dvě kladně nabitě aminokyseliny zajišťují rozpoznání hololipoproteinu Lol kaskádou a její transport přes periplazmatický prostor.

> *DNA kódující Retenční signál*

TGCCGATGAT

> *Aminokyselinová sekvence Retenčního signálu*

CDD

## 3. Fúzní komponenty pro bakteriální display

Retenční signál je následován krátkou aminokyselinovou sekvencí odvozenou z přirozeného lipoproteinu (dále jen lipoproteinová aminokyselinová sekvence) spojenou s fúzním kulovitým proteinem, ubikvitinem. Lipoproteinová aminokyselinová sekvence uděluje translatovanému konstruktů hydrofilní povahu na N-terminálním konci a spolu s acylací N-koncového cysteinu umožňuje ukotvení exprimovaného proteinu do vnější plazmatické membrány. Mimo ukotvení proteinu do vnější plazmatické membrány poskytuje dostatečnou míru konformační volnosti umožňující jednak oddálení vloženého proteinu od plazmatické membrány, čímž je zajištěna přístupnost z vnějšího prostředí a za druhé poskytuje dostatek flexibility umožňující exprimovanému proteinu zaujmout přirozenou konformaci, a to i v případě tvorby dimerních či oligomerních formací.

Fúzní ubikvitin zařazený za lipoproteinovou sekvenci slouží k odstínění hydrofobního prostředí na vnější plazmatické membráně a tím usnadňuje vystavení hydrofilních proteinů na povrchu *E. coli*. Zároveň je ubikvitin fúzován s histidinovou kotvou pro usnadnění purifikace.

> *DNA kódující Lipoproteinovou aminokyselinovou sekvenci*

AGCGGCAAAGATGGCAACGTCGAC

> *Aminokyselinová sekvence Lipoproteinové aminokyselinové sekvence*

SGKDGNV

>DNA kódující Ubikvitin s histidinovou kotvou

ACCCTGACCGGTA AAAACCATCACCTGGAAGTTGAACCGTCTGACACCATCGAAAAC  
 GTTAAAGCGAAAATCCAGGACAAAGAAGGTATCCCGCCGGACCAGCAGGAACTGAT  
 CTTCGCGGGTAAACAGCTGGAAGACGGTCGTACCCTGTCTGACTACAACATCCAGAA  
 5 AGAATCTACCCTGCACCTGGTTCTGCATCTTGAGTCTGCCACCACCACCCTCTGGT  
 CACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGTTCTCACCACCCTCTGGTGCCGAA  
 AACCTGTACTTCCAGTCTGGTTCTGGTGTGCGACA

>Aminokyselinová sekvence Ubikvitinu s histidinovou kotvou

10 TLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQELIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLH  
 LVLHLESAHHHSHGHHHTGHHHSHGSHHSHGAENLYFQSGSGVDT

#### 4. Doplnkové funkční komponenty konstruktů

15 Konstrukt je koncipován tak, aby do něj bylo možno vložit libovolný úsek DNA kódující protein, jehož nukleotidová sekvence je ohraničena restričními oblastmi rozpoznávanými endonukleázami *NcoI*, *BamHI*, *SacI*, *HindIII* a *XhoI* nebo jejich vhodnou kombinací, přičemž její čtecí rámec přímo navazuje na čtecí rámec konstruktů. Při použití *XhoI* v kombinaci s jinou restriční endonukleázou dochází k odstranění C-koncové histidinové kotvy.

>DNA kódující úsek pro vložení insertu

20 CCATGGTTAGCGGTGGATCCGAGCTCAAGCTTCTCGAG

>Aminokyselinová sekvence úseku pro vložení insertu

25 MVSGGSELKLE

>DNA kódující C-koncovou histidinovou kotvu

30 TCTGCCACCACCACCCTCTGGTCACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGT  
 TCTCACCACCACTAATAGCTCGAGTAATAGGCGGCCGC

>Aminokyselinová sekvence C-koncové histidinové kotvy

35 SAHHHSHGHHHTGHHHSHGSHHH

35 Expres lipoproteinů na vnější membráně *E. coli* umožňuje relativně snadný přístup k přirozeně posttranslačně modifikovaným molekulám. Navrhovaný genový konstrukt je založen na přítomnosti konzervované N-terminální části, která se skládá ze signální sekvence, krátké hydrofobní oblasti a partikule ubiquitinu. Signální sekvence zaručuje zpracování nascentního proteinu lipidizační kaskádou a na něj navazujícím transportním systémem, jež je zodpovědný za přenesení molekuly přes periplasmatický prostor. Na signální sekvenci navazuje krátký hydrofobní úsek, umožňující stabilní ukotvení cílové molekuly v prostředí bivalentních molekul fosfolipidů. Poslední část konzervovaného úseku je tvořena konzervovanou kulovitou molekulou ubiquitinu, jejíž hlavní úlohou je odstínění cílového proteinu od hydrofobní oblasti vnější plazmatické membrány gram-negativní buněčné stěny. Tato kombinace uplatněná v genovém konstruktě vede k vnesení uniformních vlastností v klíčové oblasti v okolí plazmatické membrány a tím k možnosti volného zaměňování polypeptidického řetězce na C-koncové oblasti fúzního proteinu. Díky tomu je navrhovaný systém teoreticky schopen produkovat libovolný protein v lipidizované podobě v případě, že jeho biochemické vlastnosti umožňují jeho expozici do vnějšího prostředí buňky.

50 Zvolená strategie exprese umožňuje produkci přirozených nebo umělých lipoproteinů na povrchu technologicky dobře zvládnutého hostitelského organismu. Expresní systém umožňuje kromě prvotního cíle, tedy exprese lipoproteinů (ať již s korpuskulární komponentou, nebo v přirozené formě), také přípravu přirozeně nelipidizovaných proteinů s touto posttranslační modifikací a jejich exponování na povrchu *E. coli*. Tímto způsobem lze významně zvýšit jejich imunogenicitu ať již v podobě atenuovaných bakterií, nebo ve formě čistých izolovaných

proteinů s nízkým rizikem vzniku nových nepřírodných epitopů. V neposlední řadě lze genový konstrukt využít pro tzv. bakteriální display, tedy záměrnou expresi zkoumaných proteinů na povrchu živého pomnožujícího se hostitelského organismu (např. knihovny mutantních enzymů pro studium jejich biologické aktivity, vazebných molekul využitelných pro vysokokapacitní screening afinity k vybraným molekulám či antigenům a tak podobně).

### Objasnění výkresů

10 Obrázek 1: SDS-PAGE buněk exprimujících GFP (vlevo), respektive OspC (uprostřed) z plasmidu pLipDis. Odpovídající proteiny jsou označeny šipkou, hmotnostní standard (MW) vpravo.

15 Obrázek 2: Porovnání výskytu mastných kyselin u proteinů exprimovaných z pLipDis expresního vektoru určených pomocí plynové chromatografie a hmotnostní analýzy. Kontrola – proteiny bez lipoproteinové signální sekvence; Lipoproteiny – proteiny s lipoproteinovou signální sekvencí; Hydrolyzované lipoproteiny – lipoproteiny opracované lipázou.

20 Obrázek 3: Inverzní fotografie snímku z fluorescenčního mikroskopu. Černé body odpovídají přítomnosti fluorescenčního signálu. Vlevo negativní kontrola, vpravo buňky exprimující OspC protein z vektoru pLipDis.

### Příklady uskutečnění technického řešení

25

#### 1. Sestavení genového konstruktů

30 Genový konstrukt pro produkci lipoproteinů a bakteriální display byl sestaven *in silico* z jednotlivých výše popsaných funkčních celků organizovaných v podobě nukleotidových kazet tak, aby jej bylo možno vložit do expresního vektoru dle výběru technikou restrikčního štěpení a ligace na komplementární místa. Jednotlivé funkční celky jsou odděleny dalšími restrikčními místy umožňující jejich modifikaci dle experimentálních potřeb. Navržená sekvence byla optimalizována pro expresi v *E. coli* (zastoupení kodonů), uměle syntetizována (jako SEQ ID NO. 1), a vložena do pomnožovacího plasmidu pUC57.

35

#### 2. Vložení genového konstruktů do expresního vektoru pUbEx20

##### 2.1 Příprava genového konstruktů pro vložení do expresního vektoru pUbEx20

40 Genový konstrukt obsažený v pomnožovacím plasmidu pUC57 byl izolován za pomoci štěpení restrikčními endonukleázami *XbaI* a *NotI*. 1 µg pomnožovacího plasmidu byl inkubován s 10 jednotkami každého enzymu po dobu 60 minut při teplotě 37 °C v prostředí pufru CutSmart (NEB). Štěpená směs plasmidu a genového konstruktů byla separována na DNA gelové elektroforéze a fragment migrující do oblasti odpovídající velikosti genového konstruktů byl vyříznut z gelu a izolován pomocí izolační soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel).

45

##### 2.2 Příprava expresního vektoru pUbEx20 pro vložení genového konstruktů

50 Expresní vektor pUbEx20 s indukovatelným promotorem a genem pro rezistenci ke kanamycinu byl linearizován pomocí štěpení restrikčními endonukleázami tak, aby byly vytvořeny kompatibilní kohézní konce umožňující vložení štěpeného genového konstruktů. Vektor byl opracován restrikčními endonukleázami *XbaI* a *NotI*. 1 µg expresního vektoru byl inkubován s 10 jednotkami každého enzymu po dobu 60 minut při teplotě 37 °C v prostředí pufru CutSmart

55 (NEB). Štěpená směs plasmidu byla separována na DNA gelové elektroforéze a fragment

migrující do oblasti odpovídající velikosti linearizovaného vektoru (přibližně 5 000 bp) byl vyříznut z gelu a izolován pomocí izolační soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel).

### 5 2.3 Ligace a transformace

Izolované produkty restriktivního štěpení, vektor pUbEx20 a genový konstrukt byly ligovány pomocí T4 DNA ligázy v prostředí T4 ligačního pufru. Ke 100 ng plasmidové DNA bylo přidáno 10 ng izolovaného genového konstruktů a 10 jednotek T4 DNA ligázy. Ligační reakce probíhala při 16 °C 16 hodin. Následně byl produkt ligační reakce použit k transformaci chemokompetentních pomnožovacích buněk *E. coli* DH10B pomocí teplotního šoku (42 °C 60 sec) v prostředí KCM. K transformaci bylo použito 10 ng ligovaného plasmidu.

Transformované buňky byly vysety na ztužený LB agar s přidavkem 1% glukózy. Jako selekční marker bylo využito antibiotikum kanamycin. Pět náhodně vybraných kolonií bylo odebráno z každé transformace, buňky byly kultivovány a byla izolována plasmidová DNA (Plasmid isolation kit, Machery-Nagel). Přítomnost genového konstruktů, jeho správná orientace a intaktnost byly ověřeny pomocí sekvenování. Ověřený konstrukt byl anotován jako pLipDis.

Funkčnost technického řešení byla ověřena na dvou experimentálních příkladech. V prvním případě se jednalo o protein OspC (Outer Surface Protein C), jenž se v nativní formě exprimuje jako dimerní lipoprotein na povrchu bakterie *Borrelia* a jeho biochemické vlastnosti umožňují expozici do vnějšího prostředí. Ve druhém případě se jednalo o zelený fluorescenční protein (GFP), jenž je běžně exprimován v cytoplazmě jako intracelulární protein bez posttranslačních modifikací.

## 3. Úprava genů kódujících OspC a GFP

### 3.1 Úprava OspC genu

Gen pro OspC byl modifikován tak, aby vyhovoval experimentálnímu ověření funkčnosti genového konstruktů inkorporovaného do expresního vektoru pLipDis. Úpravy zahrnovaly odstranění přirozené schopnosti procházet lipidizační kaskádou (OspC signální sekvence pro signální peptidázu II, N-koncového cysteinu, retenčního signálu včetně prvních 19 aminokyselin zralého nativního OspC). Takto modifikovaný gen byl doplněn o nukleotidové sekvence odpovídající restriktivním místům pro *NcoI* a *BamHI*, kompatibilními s úsekem pro vložení insertu.

>DNA kódující sekvence modifikovaného OspC

40 CCATGGAGGCATCTACTAATCCTGATGAGTCTGCGAAAGGACCTAATCTTACAGAAA  
 TAAGCAAAAAATTACAGATTCCAATGCAGTTGTACTAGCTGTGAAAGAAGTTGAG  
 GCTTTGCTTTTCATCTATAGATGAACTTGCTAAAACCTATTGGTAAAAAATAGAGGCA  
 AATGGTTTGGGTAACGAAGCGGATAAAAACGGATCATTATTAGCAGGAGCCTATGC  
 AATATCAACCCTAATAAAAACAAAAATTAGATGGATTGAAAGGTCTAGA  
 45 AGGATTAAATAAAGAAATTGCGGAGGCCAAGAAATGTTCCGAAGCATTACTAAAA  
 AGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGAAAAACGTAATGCTACTGATGCTGATTCAA  
 AAGAAGCAATTTTGAACAAATGGGACTAAAACCTAAGGGTGCTAAAGAAGCTTGA  
 GAGTTGTTTAAATCAGTAGAAAGCTTGTCAAAAGCAGCTAAAGAAGCATTAAAGTAAT  
 TCAGTTAAAGAGCTTACAAGCCCTGTTGTAGCAGAAAGTCCAAAAAACCTTAAGG  
 50 ATCC (SEQ ID NO. 3)

>Aminokyselinová sekvence modifikovaného OspC

MEASTNPDESAKGNLTEISKKITDSNAVVLAVKEVEALLSSIDELAKTIGKKIEANGLGN  
 EADKNGSLLAGAYAISTLIKQLDGLKGLEGLNKEIAEAKKCSEAFKTLQDSNADLGG

RNATDADSKEAILKTNGTKTKGAKLELELFSVESLSKAAKEALSNSVKELTSPVVAESP  
KKP (SEQ ID NO. 4)

### 3.2 Úprava genu kódujícího GFP

5

Pro účely ověření funkčnosti pLipDis expresního vektoru byl gen pro zelený fluorescenční protein ponechán v nezměněném stavu, pouze 3'- a 5'- konce kódující DNA byly doplněny o kompatibilní restrikční místa *NcoI* a *BamHI* umožňující začlenění do úseku pro vložení insertu genového konstruktů.

10

>DNA kódující sekvence modifikovaného GFP

CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGCGTGGTTCGATTCTGGTGGAGC  
TGGACGGCGATGTTAATGGTCATAAGTTTAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAAGGTGAC  
GCGACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAATTCATCTGCACCACCGGTAAACTGCCGGTG  
15 CCGTGGCCGACCCTGGTTACCACCCTGACCTACGGCGTTCAGTGCTTTAGCCGTTATC  
CGGACCACATGAAGCAACACGATTTCTTTAAAAGCGCGATGCCGGAGGGCTACGTG  
CAGGAACGTACCATCTTCTTTAAGGACGATGGTAACTATAAAACCCGTGCCGGAAGTG  
AAGTTCGAAGGCGACACCCTGGTTAACCGTATCGAGCTGAAGGGTATTGACTTTAAA  
GAAGATGGCAACATTCTGGGTCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGT  
20 GTATATCATGGCGGATAAGCAGAAAAACGGCATTAAAGGTTAACTTCAAATCCGTCA  
CAACATTGAAGACGGTAGCGTGCAACTGGCGGATCACTACCAGCAAAACACCCCGA  
TTGGCGACGGTCCGGTCTGCTGCCGATAACCACTATCTGAGCACCCAAAGCGCGC  
TGAGCAAGGACCCGAACGAGAAACGTGATCAC  
ATGGTGCTGCTGGAATTTGTTACCGCGGCGGGCATCACCTGGGCATGGACGAAC  
25 TGTATAAGGGATCC (SEQ ID NO. 5)

>Aminokyselinová sekvence modifikovaného GFP

MVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVWP  
TLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG  
30 DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV  
QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDE  
LYKGS (SEQ ID NO. 6)

### 4. Klonování OspC a GFP do expresního vektoru pLipDis

35

Expresní vektor pLipDis a modifikované geny pro proteiny OspC a GFP byly podrobeny štěpení restrikčními endonukleázami a byly separovány pomocí DNA agarózové elektroforézy. Odpovídající hydrolyzované úseky DNA byly vyříznuty z gelu a izolovány s využitím izolační soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel). 100 ng izolovaného  
40 linearizovaného vektoru pLipDis bylo smícháno s 10 ng modifikovaného OspC nebo GFP a ligovány pomocí T4 DNA ligázy 12 hodin při 16 °C.

### 5. Transformace pLipDis OspC a pLipDis GFP do pomnožovacích buněk

45

Produkty ligační reakce OspC s pLipDis a GFP s pLipDis byly použity k transformaci chemokompetentních pomnožovacích buněk *E. coli* DH10B pomocí teplotního šoku (42 °C, 60 sec) v prostředí KCM. K transformaci bylo použito 10 ng ligovaného plasmidu.

50

Transformované buňky byly vysety na ztužený LB agar s přidávkem 1% glukózy. Jako selekční marker bylo využito antibiotikum kanamycin. Pět náhodně vybraných kolonií bylo odebráno z každé transformace, buňky byly kultivovány a byla izolována plasmidová DNA (Plasmid isolation kit, Macherey-Nagel). Přítomnost odpovídajících insertů OspC, respektive GFP, byla ověřena sekvenací.

55

>DNA kódující sekvence OspC v expresním vektoru pLipDis



ATGAAAGCGACCAAACCTGGTGCTGGGCGCGGTGATTCTGGGCAGCACCCCTGCTGGC  
 GGGCTGCGATGATAGCGGCAAAGATGGCAACGTCGACACCCTGACCGGTAAAACCA  
 TCACCCTGGAAGTTGAACCGTCTGACACCATCGAAAACGTTAAAGCGAAAATCCAG  
 GACAAAGAAGGTATCCCGCCGACCAGCAGGAACTGATCTTCGCGGGT  
 5 AAACAGCTGGAAGACGGTCGTACCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAATCTACC  
 CTGCACCTGGTTCTGCATCTTGAGTCTGCCACCACCACCCTCTGGTCACCACCACA  
 CCGGTCACCACCACCCTCTGGTTCTCACCACCCTCTGGTGCCGAAAACCTGTACTT  
 CCAGTCTGGTTCTGGTGTGACACCATGGAGGCATCTACTAATCCTGATGAGTCTGC  
 GAAAGGACCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCCAATGCAGTTG  
 10 TACTAGCTGTGAAAGAAGTTGAGGCTTTGCTTTCATCTATAGATGAACTTGCTAAAA  
 CTATTGGTAAAAAATAGAGGCAAATGGTTTGGGTAACGAAGCGGATAAAAAACGGA  
 TCATTATTAGCAGGAGCCTATGCAATATCAACCCTAATAAAAAACAAAATAGATGGA  
 TTGAAAGGTCTAGAAGGATTAATAAAGAAATTGCGGAGGCCAAGAAATGTTCCGA  
 AGCATTACTAAAAAGCTACAAGATAGTAACGCAGATCTTGAAAACGTAATGCTAC  
 15 TGATGCTGATTCAAAGAAGCAATTTTAAAAACAAATGGGACTAAAACCTAAGGGTG  
 CTAAGAACTTGAAGAGTTGTTTAAATCAGTAGAAAGCTTGTCAAAAGCAGCTAAA  
 GAAGCATTAAGTAATTCAGTTAAAGAGCTTACAAGCCCTGTTGTAGCAGAAAGTCCA  
 AAAAAACCTTAAGGATCCGAGCTCAAGCTTCTCGAGTCTGCCACCACCACCCTCT  
 GGTACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGTTCTCACCACCCTAATAGCTC  
 20 GAG (SEQ ID NO. 7)

*>DNA kódující sekvence GFP v expresním vektoru pLipDis*

ATGAAAGCGACCAAACCTGGTGCTGGGCGCGGTGATTCTGGGCAGCACCCCTGCTGGC  
 GGGCTGCGATGATAGCGGCAAAGATGGCAACGTCGACACCCTGACCGGTAAAACCA  
 25 TCACCCTGGAAGTTGAACCGTCTGACACCATCGAAAACGTTAAAGCGAAAATCCAG  
 GACAAAGAAGGTATCCCGCCGACCAGCAGGAACTGATCTTCGCGGGTAAACAGCT  
 GGAAGACGGTCGTACCCTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAATCTACCCTGCACCT  
 GGTTCTGCATCTTGAGTCTGCCACCACCACCCTCTGGTCACCACCACACCGGTCA  
 CCACCACCCTCTGGTTCTCACCACCCTCTGGTGCCGAAAACCTGTACTTCCAGTCT  
 30 GGTTCTGGTGTGACACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT  
 GCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG  
 GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC  
 ACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTG  
 CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCC  
 35 ATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTAC  
 AAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCT  
 GAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGG  
 CAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT  
 GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCG  
 40 AGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC  
 GGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAA  
 GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGG  
 GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGATCCGAGCTCAAGCTTCTCGAGTC  
 TGCCCACCACCACCCTCTGGTCACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGTTC  
 45 TCACCACCCTAATAGCTCGAG (SEQ ID NO. 8)

## 6. Transformace do expresních buněk

Plasmidy, u nichž byla potvrzena přítomnost genu *OspC* (pLipDis\_*OspC*), respektive GFP  
 (pLipDis\_*GFP*), byly použity ke transformaci expresních buněk *E. coli* BL21 RILP. 50 ng  
 50 plasmidové DNA bylo smícháno s 50 µl kompetentních buněk, které byly transformovány  
 teplotním šokem (42 °C, 60 s) ve vodní lázni. Transformované buňky byly vysety na kultivační  
 plotny se ztuženým LB agarem, doplněným o 1% glukózu a kanamycin 250 µg/ml a kultivovány  
 16 hodin při 37 °C. Z narostlých kolonií bylo náhodně vybráno 15, kterými bylo inokulováno  
 55 100 ml LB média s kanamycinem (250 µg/ml) a 1% glukózou v 500 ml Erlenmayerových

baňkách. Inokulovaná média byla kultivována při 37 °C, 180 otáčkách za minutu. Po 12 hodinách byly narostlé kultury centrifugovány (4 000 g/4 °C/15 min), pelety byly rozsuspendovány v 10% glycerolu a zamrazeny při -80 °C v 500 µl alikvotech označených jako *E. coli* BL21 RIPL pLipDis OspC, respektive *E. coli* BL21 RIPL pLipDis GFP.

5

#### 7. Expres proteinů OspC a GFP

500 ml autoindukčního LB média (složení: 10 g Tryptonu; 5 g Kvasničního extraktu; 3,3 g síranu amonného; 50 mM fosfátový pufr pH 6,7; 0,5 g glukózy; 2 g Laktózy na 1 litr média) bylo inokulováno 500 µl zamražené bakteriální suspenze *E. coli* BL21 RIPL pLipDis OspC, respektive *E. coli* BL21 RIPL pLipDis GFP. Kultura byla inkubována při 22 °C/180 otáčkách za minutu po dobu 18 hodin. Úspěšná indukce byla ověřena pro oba konstrukty pomocí SDS elektroforézy na akrylamidovém gelu (Obrázek 1) a MS analýzou. OspC pozitivní identifikace se skóre 4944,12, identifikován na 38 peptidů s pokrytím sekvence 62,82 %. GFP byl potvrzen pozitivní identifikací se skóre 629,53, identifikován na 21 peptidů s pokrytím sekvence 76,89 %. Oba proteiny byly identifikovány na hladině hodnoty FDR 0,01.

10

15

#### 8. Ověření lipidizace OspC a GFP

Lipidizace purifikovaných proteinů OspC a GFP exprimovaných z expresního vektoru pLipDis nesoucího genový konstrukt byla ověřena pomocí analýzy mastných kyselin metodou hmotnostní spektrometrie. Indukované proteiny OspC a GFP byly izolovány na Ni-NTA koloně a dočištěny s využitím gelové filtrace. K odmytí nespecificky navázaných lipidů byla použita dialýza s faktorem ředění 1:1000. Stejným postupem byl opracován kontrolní OspC protein bez lipoproteinové signální sekvence a retenčního signálu. Výsledek analýzy potvrdil významně vyšší přítomnost nenasycených mastných kyselin ve vzorcích exprimovaných z pLipDis expresního vektoru (Obrázek 2). Redukce zastoupení mastných kyselin po opracování lipoproteinu lipázou (hydrolýza vazby diacylglycerolu na N-koncovém cysteinu) prokázala, že detekované mastné kyseliny jsou na lipidizovaný protein vázány kovalentně.

25

30

#### 9. Ověření povrchové lokalizace exprimovaného OspC a GFP

Lokalizace proteinů OspC exprimovaných z vektoru pLipDis obsahující genový konstrukt byla ověřena pomocí imunofluorescenční detekce a fluorescenční mikroskopie. Indukované buňky byly zafixovány na podložním skle, blokovány v 3% roztoku bovinního sérového albuminu v PBS (60 min). Blokované vzorky byly následně inkubovány s monoklonální protilátkou vázající OspC protein v roztoku 1% bovinního sérového albuminu (60 min). K detekci specifické vazby byla použita sekundární anti-myší protilátka nesoucí zelenou fluorescenční značku. Jako negativní kontrola byly použity buňky exprimující OspC protein bez lipoproteinové signální sekvence.

35

40

## SEQUENCE LISTING

<110> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

<120> Genový konstrukt pro produkci lipoproteinů a bakteriální display v E. coli, a jeho produkt

<130> P

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 587  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> genový konstrukt

<400> 1  
 tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac atatgaaagc gaccaaactg 60  
 gtgctgggag cggtgattct gggcagcacc ctgctggcgg gctgcatga tagcggcaaa 120  
 gatggcaacg tcgacaccct gaccggtaaa accatcaccc tggagttga accgtctgac 180  
 accatcgaag acgttaaagc gaaaatccag gacaaagaag gtatcccgcc ggaccagcag 240  
 gaactgatct tcgctgggtaa acagctggaa gacggctgta ccctgtctga ctacaacatc 300  
 cagaagaat ctaccctgca cctggttctg catcttgagt ctgcccacca ccaccactct 360  
 ggtcaccacc acaccggtca ccaccaccac tctggttctc accaccactc tgggtgccgaa 420  
 aacctgtaact tccagtctgg ttctggtgtc gacaccatgg ttagcgggtg atccgagctc 480  
 aagcttctcg agtctgcccc ccaccaccac tctggtcacc accacaccgg tcaccaccac 540  
 cactctggtt ctcaccacca ctaatagctc gagtaatagg cggcgcg 587

<210> 2  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> produkt genového konstrukt

<400> 2

Ser Arg Asn Asn Phe Val Leu Glu Gly Asp Ile His Met Lys Ala Thr  
 1 5 10 15

Lys Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Leu Gly Ser Thr Leu Leu Ala Gly  
 20 25 30

Cys Asp Asp Ser Gly Lys Asp Gly Asn Val Asp Thr Leu Thr Gly Lys  
 35 40 45

Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys  
 50 55 60

Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Glu Leu  
65 70 75 80

Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr  
85 90 95

Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu His Leu Glu Ser  
100 105 110

Ala His His His His Ser Gly His His His Thr Gly His His His His  
115 120 125

Ser Gly Ser His His His Ser Gly Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser  
130 135 140

Gly Ser Gly Val Asp Thr Met Val Ser Gly Gly Ser Glu Leu Lys Leu  
145 150 155 160

Leu Glu Ser Ala His His His His Ser Gly His His His Thr Gly His  
165 170 175

His His His Ser Gly Ser His His His Leu Glu Ala Ala  
180 185

<210> 3  
<211> 560  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> sekvence vkládaného OSpC

<400> 3  
ccatggaggc atctactaat cctgatgagt ctgcgaaaagg acctaactctt acagaaataa 60  
gcaaaaaaaaa tacagattcc aatgcagttg tactagctgt gaaagaagtt gaggctttgc 120  
tttcactctat agatgaactt gctaaaaacta ttggtaaaaa aatagaggca aatggtttgg 180  
gtaacgaagc ggataaaaac ggatcattat tagcaggagc ctatgcaata tcaaccctaa 240  
taaaacaaaa attagatgga ttgaaaggtc tagaaggatt aaataaagaa attgcggagg 300  
ccaagaaatg ttccgaagca ttactaaaa agctacaaga tagtaacgca gatcttggaa 360  
aacgtaatgc tactgatgct gattcaaaaag aagcaatfff gaaaacaaat gggactaaaa 420  
ctaagggtgc taaagaactt gaagagttgt ttaaatcagt agaaagcttg tcaaaaagcag 480  
ctaaagaagc attaagtaat tcagttaaag agcttacaag ccctgttgta gcagaaagtc 540  
caaaaaaac ttaaggatcc 560

<210> 4  
<211> 183  
<212> PRT  
<213> artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sekvence vkládaného OspC

&lt;400&gt; 4

Met Glu Ala Ser Thr Asn Pro Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu  
 1 5 10 15

Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Val Leu Ala  
 20 25 30

Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys  
 35 40 45

Thr Ile Gly Lys Lys Ile Glu Ala Asn Gly Leu Gly Asn Glu Ala Asp  
 50 55 60

Lys Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser Thr Leu Ile  
 65 70 75 80

Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Gly Leu Glu Gly Leu Asn Lys Glu  
 85 90 95

Ile Ala Glu Ala Lys Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr Lys Lys Leu Gln  
 100 105 110

Asp Ser Asn Ala Asp Leu Gly Lys Arg Asn Ala Thr Asp Ala Asp Ser  
 115 120 125

Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr Lys Thr Lys Gly Ala Lys  
 130 135 140

Glu Leu Glu Glu Leu Phe Lys Ser Val Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala  
 145 150 155 160

Lys Glu Ala Leu Ser Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val  
 165 170 175

Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro  
 180

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 725

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; sekvence vkládaného GFP

&lt;400&gt; 5

ccatgggtgag caagggcgag gagctgttta ccggcgtggt tccgattctg gtggagctgg 60

acggcgatgt taatggatcat aagtttagcg tgagcggcga gggcgaaggt gacgcgacct 120

acggcaagct gaccctgaaa ttcactctgca ccaccggtaa actgccggtg ccgtggccga 180

```

ccctggttac caccctgacc tacggcgttc agtgctttag ccgttatccg gaccacatga      240
agcaacacga tttctttaaa agcgcgatgc cggagggcta cgtgcaggaa cgtaccatct      300
tctttaagga cgatggtaac tataaaaccc gtgcggaagt gaagttcgaa ggcgacaccc      360
tggttaaccg tatcgagctg aagggtattg actttaaaga agatggcaac attctgggtc      420
acaagctgga gtacaactat aacagccaca acgtgtatat catggcggat aagcagaaaa      480
acggcattaa ggttaacttc aaaatccgtc acaacattga agacggtagc gtgcaactgg      540
cggatcacta ccagcaaac accccgattg gcgacgggtcc ggttctgctg ccggataacc      600
actatctgag caccctaaagc gcgctgagca aggacccgaa cgagaaacgt gatcacatgg      660
tgctgctgga atttgttacc gcggcgggca tcaccctggg catggacgaa ctgtataagg      720
gatcc                                                                 725

```

```

<210> 6
<211> 241
<212> PRT
<213> artificial

```

```

<220>
<223> sekvence vkládaného GFP

```

```

<400> 6

```

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1           5           10           15

```

```

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
          20           25           30

```

```

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
          35           40           45

```

```

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
          50           55           60

```

```

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65           70           75           80

```

```

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
          85           90           95

```

```

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
          100          105          110

```

```

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
          115          120          125

```

```

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130           135           140

```

```

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

```



```

ccttaaggat ccgagctcaa gcttctcgag tctgcccacc accaccacte tggtcaccac      1020
cacaccggtc accaccacca ctctggttct caccaccact aatagctcga g                    1071

<210> 8
<211> 1236
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> sekvence GFP v expresním vektoru

<400> 8
atgaaagcga ccaaactggt gctgggcgcg gtgattctgg gcagcaccct gctggcgggc      60
tgcatgata gcggaaga tggcaacgtc gacaccctga ccggtaaaac catcaccctg      120
gaagttgaac cgtctgacac catcgaaaac gttaaagcga aaatccagga caaagaaggt      180
atccccccgg accagcagga actgatcttc gcgggtaaac agctggaaga cggtcgtacc      240
ctgtctgact acaacatcca gaaagaatct accctgcacc tggttctgca tcttgagtct      300
gcccaccacc accactctgg tcaccaccac accggtcacc accaccacte tggttctcac      360
caccactctg gtgccgaaa cctgtacttc cagtctgggt ctggtgtcga caccatgggt      420
agcaagggcg aggagctggt caccggggtg gtgcccctcc tggctcgagct ggacggcgac      480
gtaaaccggc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag      540
ctgaccctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgcccctggc caccctcgtg      600
accaccctga cctacggcgt gcagtgtctc agcccctacc ccgaccacat gaagcagcac      660
gacttcttca agtccgccat gcccgaaagg tactgtccagg agcgcaccat cttcttcaag      720
gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac      780
cgcatcgagc tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg      840
gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc      900
aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cggcgaccac      960
taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccaactacctg     1020
agcaccagct ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatccat ggtcctgctg     1080
gagttcgtga ccgccccgg gatcactctc ggcattgacg agctgtacaa gggatccgag     1140
ctcaagcttc tegagtctgc ccaccaccac cactctggtc accaccacac cggtcaccac     1200
caccactctg gttctacca ccactaatag ctcgag                                     1236

```



## NÁROKY NA OCHRANU

5

1. Genový konstrukt pro produkci lipoproteinů a bakteriální display v *E. coli*, **vyznačený tím**, že má sekvenci

10 TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGCGACCAAA  
 CTGGTGCTGGGCGCGGTGATTCTGGGCAGCACCCCTGCTGGCGGGCTGCGATGATAGC  
 GGCAAAGATGGCAACGTCGACACCCTGACCGGTAACCATCACCCCTGGAAGTTGA  
 ACCGTCTGACACCATCGAAAACGTAAAGCGAAAATCCAGGACAAAGAAGGTATCC  
 CGCCGGACCAGCAGGAAGTCTTCGCGGGTAAACAGCTGGAAGACGGTCGTACC  
 CTGTCTGACTACAACATCCAGAAAGAATCTACCCTGCACCTGGTTCTGCATCTTGAGT  
 15 CTGCCACCACCACCCTCTGGTCACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGTT  
 CTCACCACCCTCTGGTGCCGAAAACCTGTACTTCCAGTCTGGTTCTGGTGTGACAC  
 CATGGTTAGCGGTGGATCCGAGCTCAAGCTTCTCGAGTCTGCCACCACCACCCTC  
 TGGTCACCACCACACCGGTCACCACCACCCTCTGGTTCTCACCACCCTAATAGCT  
 CGAGTAATAGGCGGCCGC (SEQ ID NO. 1)

20

nebo sekvenci obsahující synonymní mutace k SEQ ID NO. 1 kódující stejné aminokyseliny.

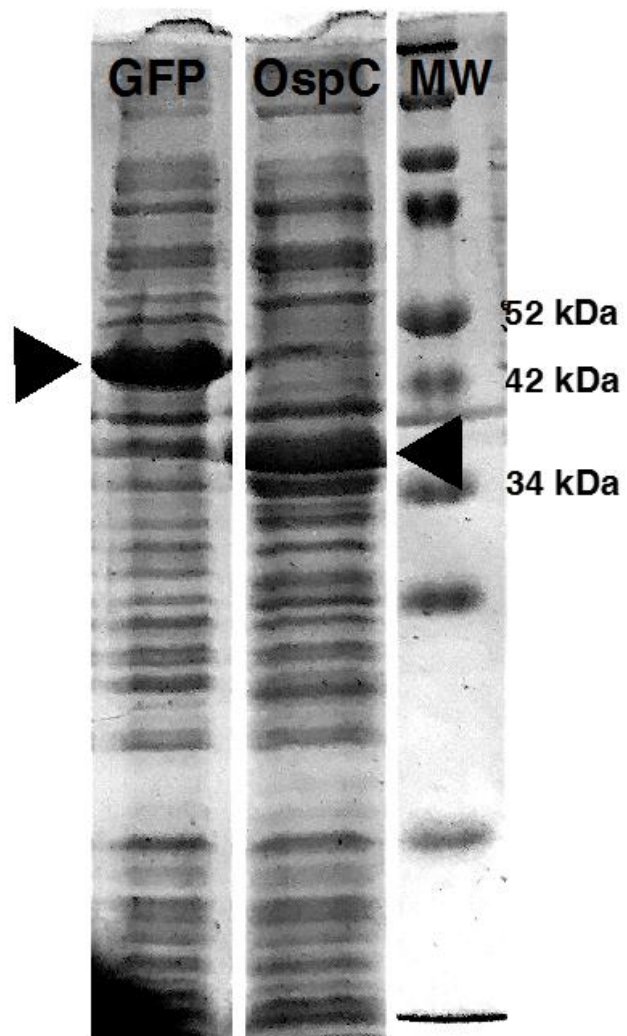
2. Aminokyselinová sekvence kódovaná genovým konstruktem podle nároku 1, **vyznačená tím**, že má sekvenci:

25

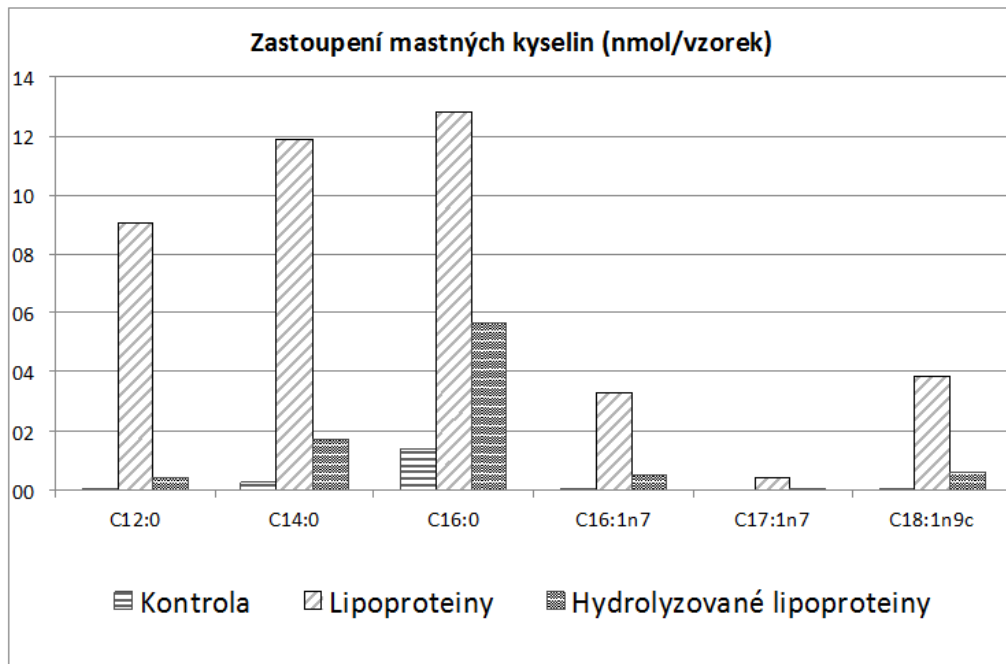
SRNNFV\*L\*EGDIHMKATKLVLGAVILGSTLLAGCDDSGKDGNDTLTGKTITLEVEPSD  
 TIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVHLESAAAAHSG  
 HHHTGHHHSGSHHHSAGAENLYFQSGSGVDTMVS GGSELKLESAAAAHSGHHHTGH  
 HHHSGSHHH\*\*LE\*\*AA (SEQ ID NO. 2), kde hvězdičky značí stop-kodon.

30

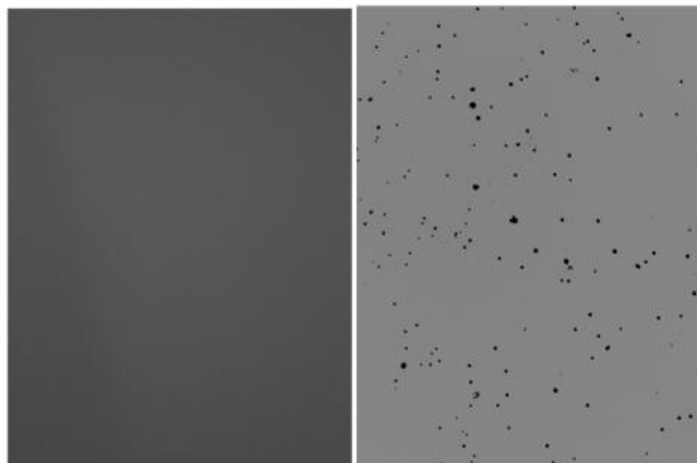
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3