

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 404

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-36726**

(22) Přihlášeno: **09.10.2019**

(47) Zapsáno: **19.11.2019**

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

(72) Původce:
RNDr. Lubomír Janda, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ
Mgr. Adam Norek, Ph.D., Brno, Štýřice, CZ
Mgr. Šárka Kobzová, Vratimov, Horní Datyně, CZ

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

(54) Název užitého vzoru:
**Genový konstrukt a fúzní termostabilní
lysostafin**

CZ 33404 U1

Genový konstrukt a fúzní termostabilní lysostafin

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká genového konstrukt pro expresi bakteriocinových lytických enzymů s katalytickou aktivitou dvoubodové termostabilní varianty β -lytické endopeptidázy a fúzních endolysinů.

10

Dosavadní stav techniky

Lysostafin (EC 3.4.24.75) je monomerní enzym patřící do skupiny peptidů a proteinů známých jako bakteriociny. Jedná se o extracelulární enzym produkovaný bakterií *Staphylococcus simulans*. Lysostafin hydrolyticky štěpí peptidovou vazbu mezi 3. a 4. glycinovým zbytkem pentaglycinové spojky peptidoglykanu v buněčných stěnách bakterií *Staphylococcus aureus*. Struktura aktivní formy lysostafinu je tvořena katalytickou doménou a vazebnou doménou, která interaguje s peptidoglykanem buněčných stěn. Obě domény jsou spojeny linkerem, což je řetězec asi 15 aminokyselin.

20

Předkládané řešení si klade za cíl poskytnout genový konstrukt pro efektivní expresi termostabilní varianty β -lytické endopeptidázy a fúzních endolysinů s vysokou aktivitou a stabilitou a snadnou expresí.

25

Podstata technického řešení

Předkládané technické řešení poskytuje genový konstrukt obsahující kódující sekvenci termostabilní varianty β -lytické endopeptidázy s dvěma bodovými mutacemi, který obsahuje kódující sekvenci ubikvitinu Ub2 a ve směru čtení od sekvence ubikvitinu Ub2 sekvenci kódující 14 His-Tag, přičemž sekvence kódující 14 His-Tag je následována sekvencí kódující štěpné místo pro TEV proteázu a sekvence kódující štěpné místo pro TEV proteázu je následována nukleotidovou sekvencí kódující termostabilní variantu β -lytické endopeptidázy N39P_T178L s optimalizovanou frekvencí kodonů pro *E. coli*. Tato sekvence je zde uvedena jako SEQ ID NO. 1.

35

```

atgcagatcttcgtaaaccctgaccggtaaaaccatcacctggaagtgaaccgtctgacaccatcgaaaacgtaaagcgaaaatcca
ggacaagaaggtatcccggcggaccagcaggaactgatcttcgagggtaaacagctggaagacggctgacctgtctgactacaacat
ccagaagaatctacctgcacctggtctgcagctcgagggtgtcaccaccactctggtcaccaccacccggcaccaccaccac
40 tctggttctcaccaccactctggtgtgaaaacctgtacttcagctctggtggtggtaccatggcgCACGAACACAGCGCGCA
GTGGCTGAACAACACTACAAGAAAGTTATGGCTATGGTCCGTATCCGCTGGGTATCAA
TGGTGGTATGCACTACGGCGTGGACTTCTTTATGCCGATCGGTACCCCGGTGAAGGC
GATCAGCAGCGGCAAAATTGTTGAGGCGGGTTGGAGCAACTATGGTGGCGGTAACC
AGATCGGCCTGATTGAAAACGACGGTGTGCACCGTCAATGGTACATGCACCTGAGCA
45 AGTATAACGTGAAAGTTGGCGATTACGTTAAGGCGGGTCAGATCATTGGCTGGAGCG
GTAGCACCGGTTATAGCACCGCGCCGCACCTGCACTTCCAGCGTATGGTGAACAGCT
TTAGCAACAGCACCGCGCAAGACCCGATGCCGTTCCCTGAAGAGCGCGGGTTATGGTA
AAGCGGGCGGATCCGTTACCCCGACCCCGAACACCGGCTGGAAGACCAACAAATAC
GGCACCCCTGTATAAAAGCGAGAGCGCGAGCTTCACCCCGAACACCGACATCATTCTG
50 CGTACCACCGGCCCGTTTCGTAGCATGCCGCAGAGCGGCGTGTGAAGGCGGGTCA
AACCATCCACTATGACGAAGTTATGAAACAGGATGGTCACGTGTGGGTTGGTTACAC
CGGCAACAGCGGTCAACGTATTTATCTGCCGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAA
TACCCTGGGCGTTCTGTGGGGCACCATCAAGTAAAGATCTCTCGAG (SEQ ID NO. 1)

```

55 Původní gen kódující β -lytickou endopeptidázu obsahuje enzymovou část a predoménu

ovlivňující aktivitu enzymu (gen ENA|CAA29494|CAA29494.1 *Staphylococcus simulans* bv. *staphylolyticus*). V rámci předkládaného řešení byla sekvence kódující enzymovou část (velká písmena v SEQ ID NO. 1) vyňata z genu a byla optimalizována frekvence kodonů pro *E. coli*. Navíc byly provedeny změny kodonů vedoucí k mutacím N39P a T178L. Dále byl připojen fúzní protein ubiquitin Ub2 a His-Tag kotvička.

Dalším předmětem technického řešení je proteinový produkt exprese genového konstruktů majícího sekvenci SEQ ID NO. 1. Proteinový produkt – fúzní termostabilní lysostafin - obsahuje sekvence ubikvitinu 2, 14 His-Tagu, přičemž sekvence kódující His-Tag je následována podtrženou sekvencí (NLYFQ) kódující štěpné místo pro TEV proteázu a β -lytické termostabilní endopeptidázy N39P_T178L (aM23-SH3b) má sekvenci SEQ ID NO. 2:

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQELIFAGKQLEDGRTLSDYNIQ
 KESTLHLVLQLEGGHHHSGHHHTGHHHSGSHHSGGENLYFQSGGGTMAHEHSAQ
 15 WLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFMPIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYGGGNQI
 GLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFS
 NSTAQDPMPFLKSAGYKAGGSVTPPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFTPNTDIILRTTGP
 FRSMPSQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGYTGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGLV
 WGTIK (SEQ ID NO. 2)

Níže je uvedena kódující sekvence SEQ ID NO. 1 s kódovanými aminokyselinami (SEQ ID NO. 2). Podtrženy jsou kodóny a aminokyseliny odpovídající mutacím N39P a T178L:

```

atg cag atc ttc gtt aaa acc ctg acc ggt aaa acc atc acc ctg gaa gtt gaa ccg tct
M Q I F V K T L T G K T I T L E V E P S
gac acc atc gaa aac gtt aaa gcg aaa atc cag gac aaa gaa ggt atc ccg ccg gac cag
D T I E N V K A K I Q D K E G I P P D Q
cag gaa ctg atc ttc gcg ggt aaa cag ctg gaa gac ggt cgt acc ctg tct gac tac aac
Q E L I F A G K Q L E D G R T L S D Y N
atc cag aaa gaa tct acc ctg cac ctg gtt ctg cag ctc gag ggt ggt cac cac cac cac
I Q K E S T L H L V L Q L E G G H H H H
tct ggt cac cac cac acc ggt cac cac cac cac tct ggt tct cac cac cac tct ggt ggt
S G H H H T G H H H H S G S H H H S G G
gaa aac ctg tac ttc cag tct ggt ggt ggt acc atg gcg CAC GAA CAC AGC GCG CAG TGG
E N L Y F Q S G G G T M A H E H S A Q W
CTG AAC AAC TAC AAG AAA GGT TAT GGC TAT GGT CCG TAT CCG CTG GGT ATC AAT GGT GGT
L N N Y K K G Y G Y G P Y P L G I N G G
ATG CAC TAC GGC GTG GAC TTC TTT ATG CCG ATC GGT ACC CCG GTG AAG GCG ATC AGC AGC
M H Y G V D F F M P I G T P V K A I S S
GGC AAA ATT GTT GAG GCG GGT TGG AGC AAC TAT GGT GGC GGT AAC CAG ATC GGC CTG ATT
G K I V E A G W S N Y G G G N Q I G L I
GAA AAC GAC GGT GTG CAC CGT CAA TGG TAC ATG CAC CTG AGC AAG TAT AAC GTG AAA GTT
E N D G V H R Q W Y M H L S K Y N V K V
GGC GAT TAC GTT AAG GCG GGT CAG ATC ATT GGC TGG AGC GGT AGC ACC GGT TAT AGC ACC
G D Y V K A G Q I I G W S G S T G Y S T
GCG CCG CAC CTG CAC TTC CAG CGT ATG GTG AAC AGC TTT AGC AAC AGC ACC GCG CAA GAC
A P H L H F Q R M V N S F S N S T A Q D
CCG ATG CCG TTC CTG AAG AGC GCG GGT TAT GGT AAA GCG GGC GGA TCC GTT ACC CCG ACC
P M P F L K S A G Y G K A G G S V T P T
CCG AAC ACC GGC TGG AAG ACC AAC AAA TAC GGC ACC CTG TAT AAA AGC GAG AGC GCG AGC
P N T G W K T N K Y G T L Y K S E S A S
TTC ACC CCG AAC ACC GAC ATC ATT CTG CGT ACC ACC GGC CCG TTT CGT AGC ATG CCG CAG
F T P N T D I I L R T T G P F R S M P Q
AGC GGC GTG CTG AAG GCG GGT CAA ACC ATC CAC TAT GAC GAA GTT ATG AAA CAG GAT GGT

S G V L K A G Q T I H Y D E V M K Q D G
CAC GTG TGG GTT GGT TAC ACC GGC AAC AGC GGT CAA CGT ATT TAT CTG CCG GTT CGC ACC
H V W V G Y T G N S G Q R I Y L P V R T
TGG AAT AAA AGC ACC AAT ACC CTG GGC GTT CTG TGG GGC ACC ATC AAG TAA AGA TCT CTC
W N K S T N T L G V L W G T I K - R S L

```

- 5 Tento genový konstrukt lze exprimovat pomocí expresního systému zahrnujícího rekombinantní plasmid pro expresi termostabilní varianty β -lytické endopeptidázy, obsahující indukovatelný promotor a selekční gen, a dále obsahující sekvenci označenou výše jako SEQ ID NO. 1 kódující sekvenci ubikvitinu Ub2 a ve směru čtení od sekvence ubikvitinu Ub2 sekvenci kódující 14 His-Tag, přičemž sekvence kódující His-Tag je následována sekvencí kódující štěpné místo pro TEV proteázu, viz. SEQ ID NO. 2, a sekvence kódující štěpné místo pro TEV proteázu je následována nukleotidovou sekvencí pro β -lytickou endopeptidázu.
- 10

Indukovatelným promotorem může být promotor T7, selekčním genem gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycin. Vhodným plasmidem je například expresní vektor pUbEx15 (Kobzová Š, Diplomová práce, Masarykova univerzita 2017) obsahující gen pro Ub2, do něhož je vložen genový konstrukt obsahující sekvenci termostabilní varianty β -lytické endopeptidázy N39P_T178L (aM23-SH3b).

Podle původní sekvence ze *Staphylococcus simulans* bv. *staphylolyticus* byl připraven genový konstrukt obsahující gen pro termostabilní variantu β -lytické endopeptidázy. Tento gen obsahuje katalytickou doménou a vazebnou doménou, která interaguje s peptidoglykanem buněčných stěn. Termostabilní varianta β -lytické endopeptidázy N39P_T178L byla navržena s využitím energetického a evolučního výpočetního přístupu stabilizace proteinů. Bylo navrženo 14 potenciálně stabilizujících jednobodových mutací β -lytické endopeptidázy. Po verifikaci jednobodových mutací bylo navrženo a experimentálně ověřeno pět dvoubodových mutací, z nichž varianta β -lytické endopeptidázy N39P_T178L vykazuje zlepšení teplotní stability enzymu o 3 °C. Sekvence obsahuje dvě bodové mutace N38P (prolin za asparagin) v katalytické doméně a T178L (leucin za threonin) ve vazebné doméně.

Universální tag Ubikvitin (Ub) je protein vytvářející s většinou proteinů interakci s afinitou $K_D > 0,3$ mM, který zakrývá hydrofobní části fúzaného proteinu s přímým vlivem na expresi a rozpustnost proteinu. Ubikvitin Ub2 při práci s vektorem slouží jako fúzní tag, který usnadňuje práci s rekombinantními proteiny. Původně je ubikvitin eukaryotický protein o velikosti 8,5 kDa s mnoha funkcemi. Jeho sekvence je vysoce konzervovaná od jednobuněčných organismů až po člověka. Jeho přítomnost v sekvenci usnadňuje produkci, izolaci a identifikaci proteinu z hostitelského produkčního systému. Produkovanému proteinu zvyšuje rozpustnost. Sekvence 76 aminokyselin modifikovaného Ub2 je téměř totožná s lidským ubikvitinem a liší se jen ve třech aminokyselinách R42E, R72Q a R74E. Díky těmto změnám došlo ke snížení pI ubikvitinu z 7,0 na 6,2. Tato změna vedla ke zvýšení termodynamické stability fúzního endolysinu.

Dále je výhodné použít fúzní tag 14 His-Tag zajišťující vysokou výtěžnost čistého proteinu během purifikace. Díky delší a flexibilnější sekvenci nedochází u tohoto afinitního tagu ke skrytí do struktury fúzního proteinu. Tento fúzní 14 His-Tag je umístěn za Ub2 a následován štěpným místem pro TEV proteázu. Přítomnost TEV štěpného místa (podtržená sekvence NLYFQ v SEQ ID NO. 1) kódující štěpné místo pro TEV proteázu usnadňuje oddělení obou fúzních tagů pro pozdější strukturní a funkční studie.

Objasnění výkresů

Obr. 1 Bod tání původní β -lytické endopeptidázy měřený pomocí diferenční skenovací fluorimetrie, v pufru NaK fosfát pH6 + 400 mM NaCl.

Obr. 2 Bod tání mutantní β -lytické endopeptidázy měřený pomocí diferenční skenovací fluorimetrie, v pufru NaK fosfát pH6 + 400 mM NaCl.

Obr. 3 Bod tání původní β -lytické endopeptidázy měřený pomocí diferenční skenovací fluorimetrie, v pufru NaK fosfát pH5 + 400 mM NaCl.

Obr. 4 Bod tání mutantní β -lytické endopeptidázy měřený pomocí diferenční skenovací fluorimetrie, v pufru NaK fosfát pH5 + 400 mM NaCl.

Příklady uskutečnění technického řešení

Klonování

- 5 Pro klonování rekombinantního proteinu byl použit expresní vektor pUbEx15. Tento vektor obsahuje silný promotor T7 a gen pro rezistenci k antibiotiku kanamycin, který uděluje buňkám selekční výhodu a usnadňuje expresi genů (Kobzová Š, Diplomová práce, Masarykova univerzita 2017).
- 10 Všechna subklonování a veškerá genetická manipulace byla prováděna v kmeni *E. coli DH10β* (Invitrogen, Carlsbad, US). Gen pro lysostafin s bodovými mutacemi byl syntetizován firmou GenScript na zakázku podle zadání původců, jednalo se o sekvenci popsanou výše jako SEQ ID NO. 1. Navržená sekvence obsahovala místa pro restriční štěpení. Celý gen (aM23-SH3b) byl štěpen enzymy NcoI a XhoI a vložen do vektoru pUbEx15 (NcoI, Sall)

15

Transformace

- Za expresní systém byl zvolen bakteriální systém *E. coli* buňky BL21(DE3), což jsou geneticky modifikované kmeny *E. coli* s upraveným genomem pro cílenou manipulaci a načasování exprese rekombinantního proteinu. Klíčovou roli zde hraje gen *lacI*, který kóduje lac represor, a gen DE3, který nese informaci pro syntézu T7 RNA polymerázy, která je zodpovědná za transkripci inzertu. Lac represor nasedá na lac promotor (promotor genu DE3), blokuje tím syntézu T7 RNA polymerázy a transkripce neprobíhá. Pokud je v buňce přítomen IPTG, váže na sebe lac represor, který se uvolní z vazby na lac promotor a umožní tím syntézu T7 RNA polymerázy a transkripci.
- 25 Transformace plasmidové DNA byla provedena metodou teplotního šoku do chemokompetentních buněk *E. coli*. Pro další manipulaci a analýzy byly z kolonií připraveny bakteriální konzervy, které byly zamrazeny v hluboko mrazicím boxu při -80 °C, kde je možno bakterie uchovat až několik let.
- 30 Jako buňky schopné přijmout rekombinantní DNA byly tedy použity kompetentní buňky *E. coli* kmen BL21(DE3). Do mikrozkumavky, společně s kompetentními buňkami (100 μl), bylo vloženo 5 μl plasmidové DNA. Takto vzniklá směs byla promíchána na vortexu a ponechána na ledu. Po 30 minutách byla směs krátce zahřáta na 42 °C ve vodní lázni po dobu 1 minuty. Ke směsi bylo přidáno 500 μl SOC media, vzorek byl inkubován ve 37 °C 1 hodinu za stálého míchání (200 ot/min). Nakonec byl vzorek stočen ve stolní centrifuze (3 000 ot/min, 1 min, RT), určitý objem média byl odlit a ve zbylém objemu (asi 100 μl) byl buněčný pelet rozpuštěn a nanesen na agarové misky, jež obsahovaly antibiotikum kanamycin.

35

- Jednotlivé kolonie byly kultivovány odděleně v 5 ml LB (Luria-Bertoni) média s přídavkem příslušného antibiotika, a to opět přes noc při teplotě 37 °C za stálého třepání. Následující den byla z jednotlivých kolonií izolovaná DNA pomocí NucleoSpin® PlasmidQuickPureKit (Macherey-Nagel). Kontrola sekvence plazmidu byla provedena pomocí restričního štěpení enzymy BamHI a NcoI.

40

- 45 Příprava bakteriálních konzerv

- Z agarové plotny obsahující narostlé kolonie expresních buněk bylo odpícháno 20 až 30 kolonií a ty byly zaočkovány do 100 ml TB média s přídavkem 1% glukózy a 50 μg/ml kanamycinu. Bakteriální suspenze rostla přes noc při 37 °C. Následovala centrifugace (10 minut, 5 000 ot/min). Pelet byl rozpuštěn ve 4 ml 10% sterilního glycerolu, rozdělen pomocí mikropipety do mikrozkumavek po objemu 1 ml, a pro další použití zamrazen v tekutém dusíku a skladován na -80 °C.

50

Expres v bohatém médiu

5 Pro kultivaci expresních buněk nesoucích rekombinantní plasmidovou DNA bylo zvoleno LB médium s obsahem 1% glukózy. Buňky byly indukovány 0,4 mM IPTG po dosažení optické
 6 denzity 0,6 při 22 °C.

- Složení bohatého média (1 litr):

10 20 g LB média, 1 ml kanamycinu (pro výslednou koncentraci 50 µg/ml), 1% glukóza

10 Do jednoho litru média (bohatého či minimálního) byl přidán 1 ml bakteriální konzervy a kultivace probíhala při 37 °C po dobu 2 hodin (200 ot/min). Po této době dosáhla optická
 11 hustota (měřená při 600 nm) hodnoty 0,6 = log fáze, což je růstová fáze vhodná pro indukci
 12 pomocí IPTG o výsledné koncentraci 0,4 mM. Kultivace probíhala při 22 °C po dobu 16 hodin.

15

Purifikace

16 Pro uvolnění proteinů z bakteriálních buněk byla zvolena metoda ultrasonikace, kdy jsou
 17 buněčné stěny dezintegrovány pomocí ultrazvuku. Proteiny byly přečištěny a purifikovány
 20 pomocí afinitní metalochromatografie, využívající kompetice látek histidin – imidazol pro vazbu
 21 k niklu, který je imobilizován na matrici kolony. Purifikace byla díky histidinové kotvičce velmi
 22 efektivní a pro získání čistého proteinu stačila její jedнокroková varianta. Z jednoho litru kultury je
 23 možno získat okolo 200 mg čistého proteinu.

25 Kultura byla stočena (30 minut, 4 °C, 8 000 ot/min) a pelet byl rozpuštěn v 20 ml sonikačního
 26 pufru (100mM Tris pH 8; 500mM NaCl, 10mM imidazol; 0.1% TritonX-100). Buňky byly
 27 následně lyzovány ultrazvukovými pulzy po dobu 30 minut (doba jednoho pulsu byla 1 s, pauza
 28 mezi jednotlivými pulsy 4 s). Lyzát byl stočen (30 minut, 4 °C, 14 000 ot/min). Supernatant byl
 30 před nanesením na chromatografickou matrici zbaven zbytků buněčných stěn přečištěním přes
 31 mikrofiltr s póry o velikosti 0,22 µm. Pro purifikaci byl použit automatický purifikační systém
 32 FPLC AZURA Bio purification system s automatickým sběračem frakcí FOXY R1 a kolona
 33 naplněná matricí (Ni Sepharose High Performance) a s imobilizovaným iontem niklu (HisTrap
 34 HP, 5ml, GE Healthcare). Kolona byla promyta třemi objemy ekvilibračního pufru, který vytvořil
 35 podmínky pro vazbu histidinové kotvičky proteinu k iontům niklu. Celý objem supernatantu byl
 36 na kolonu nanesen rychlostí 1 ml/min. Následně byla kolona promyta ekvilibračním pufrem, aby
 37 se vymyly nenavázané proteiny, obvykle 5 až 7 objemů kolony při rychlosti 2,5 ml/min. Pro
 38 uvolnění a vymytí cílového proteinu (SEQ ID NO.2) byl použit eluční pufr s 300mM
 39 imidazolem.

40 Určení stability Lysostafinu

41 Pro experiment byla použita metoda Thermal Shift Assay (TSA), známá v literatuře také jako
 42 diferenční skenovací fluorimetrie (DSF), která umožňuje stanovit optimální podmínky pro
 43 stabilizaci proteinů bez nutnosti použít specializovaný přístroj. TSA sleduje tepelné rozbavení
 44 (denuraci) proteinu v přítomnosti fluorescenční barvy (SYPRO oranž). Barva je v nepolárním
 45 prostředí vysoce fluorescenční. Nepolární prostředí zajišťují hydrofobní místa denaturujícího se
 46 proteinu, které se při postupném zvyšování teploty odкрývají na povrch. Měřená teplota tání (T_m)
 47 proteinu tak vyjadřuje jeho stabilitu.

50 Do 96jamkové destičky byla aplikována směs v pořadí – pufr, voda, protein, a nakonec
 51 fluorescenční barvivo (SYPRO oranž), které je citlivé na světlo a je nutno s ním manipulovat
 52 rychle, aby nedošlo k předčasné reakci. Přes destičku byla nalepena ochranná fólie a krátce
 53 stočena (max. 5 000 ot/min). Na thermocycleru byl nastaven program gradient 25 °C → 95 °C,
 54 který zvyšuje teplotu o 0,2 °C na cyklus. Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru
 55 LightCycler® 480 Software, verze 1.5.

- Výstupem experimentu jsou křivky teploty tání pro každý testovaný pufr. Jejich vrcholem je bod tání, kdy právě polovina proteinu je v denaturovaném stavu, který určuje stabilitu proteinu. Ve fosfátovém pufru v pH 6 (NaK fosfát pH 6 + 400 mM NaCl) byl mutant stabilnější než původní β -lytická endopeptidáza o 5,2 °C (obr. 1 a 2). Ve fosfátovém pufru v pH 5 (NaK fosfát pH5 + 400 mM NaCl) dosáhl mutant β -lytické endopeptidázy vůbec nejvyšší stability 67,72 °C (obr. 4). Stejně tak v tomto pufru původní β -lytická endopeptidáza dosáhla nejvyšší stability 63,99 °C (obr. 3). Oproti mutantu měla ovšem endopeptidáza sníženou stabilitu o 3,71 °C.
- 10 Křivky jsou vypočítané automaticky, a to dvěma numerickými metodami – Boltzmannovou metodou a metodou první derivace. Největší teplotní stabilita obou enzymů byla naměřena u pufrů v rozmezí pH 5,0 až 7,0 (tabulka 1).

Pufr	T _m Mutant [°C]	Směrodatná odchylka
0,1 M Na-K fosfát pH 7,0	64,44 ±	1,16
0,2 M MES pH 6,2 + 400 mM NaCl	65,08 ±	1,19
0,1 M Na-K fosfát pH6	65,28 ±	1,62
0,2 M MES pH 5,8 + 400 mM NaCl	65,335 ±	1,48
0,1 M Na-K fosfát pH6 + 400 mM NaCl	66,70 ±	2,02
0,1 M Na-K fosfát pH 5,0 + 400 mM NaCl	67,30 ±	1,83

Pufr	T _m WT [°C]	Směrodatná odchylka
0,1 M Na-K fosfát pH6 + 400 mM NaCl	60,71 ±	1,23
0,1 M Na-K fosfát pH6 + 400 mM NaCl	61,48 ±	1,92
0,1 M Na-K fosfát pH 7,0	61,11 ±	1,09
0,2 M MES pH 6,2 + 400 mM NaCl	61,29 ±	0,31
0,1 M Na-K fosfát pH6	62,96 ±	0,99
0,1 M Na-K fosfát pH 5,0 + 400 mM NaCl	64,45 ±	1,02

SEQUENCE LISTING

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

<120> Genový konstrukt a fúzní termostabilní lysostafin

<130> UM

5 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1083

10 <212> DNA

<213> artificial

<220>

15 <223> genový konstrukt kódující mutantní beta-lytickou endopeptidázu

<400> 1

atgcagatct tcgttaaaac cctgaccggt aaaaccatca ccctggaagt tgaaccgtct 60

gacaccatcg aaaacgttaa agcgaaaatc caggacaaag aaggtatccc gccggaccag 120

caggaactga tcttcgcggg taaacagctg gaagacggtc gtaccctgtc tgactacaac 180

20 atccagaaag aatctaccct gcacctggtt ctgcagctcg agggtggtca ccaccaccac 240

tctggtcacc accacaccgg tcaccaccac cactctggtt ctcaccacca ctctggtggt 300

gaaaacctgt acttccagtc tgggtggtgt accatggcgc acgaacacag cgcgcagtgg 360

ctgaacaact acaagaaagg ttatggctat ggtccgtatc cgctgggtat caatggtggt 420

atgcactacg gcgtggactt ctttatgccg atcggtatccc cgggtgaaggc gatcagcagc 480

25 ggcaaaattg ttgaggcggg ttggagcaac tatggtggcg gtaaccagat cggcctgatt 540

gaaaacgacg gtgtgcaccg tcaatggtac atgcacctga gcaagtataa cgtgaaagtt 600

ggcgattacg ttaaggcggg tcagatcatt ggctggagcg gtagcaccgg ttatagcacc 660

gcgcgcgacc tgcacttcca gcgtatggtg aacagcttta gcaacagcac cgcgcaagac 720

ccgatgccgt tcctgaagag cgcgggttat ggtaaagcgg gcggtaccgt taccgacc 780

30 ccgaacaccg gctggaagac caacaaatac ggcaccctgt ataaaagcga gagcgcgagc 840

ttcaccgga acaccgacat cattctgcgt accaccggcc cgtttcgtag catgccgcag 900

agcggcgtgc tgaaggcggg tcaaaccatc cactatgacg aagttatgaa acaggatggt 960

cacgtgtggg ttggttacac cggcaacagc ggtcaacgta tttatctgcc ggttcgcacc 1020

tggaataaaa gcaccaatac cctgggcggt ctgtggggca ccatcaagta aagatctctc 1080

35 gag 1083

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> mutantní beta-lytická endopeptidáza

<400> 2

10

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

15

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

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Glu Leu Ile Phe Ala Gly Lys
 35 40 45

20

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
 50 55 60

25

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Gln Leu Glu Gly Gly His His His His
 65 70 75 80

Ser Gly His His His Thr Gly His His His His Ser Gly Ser His His
 85 90 95

30

His Ser Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Gly Gly Gly Thr Met
 100 105 110

Ala His Glu His Ser Ala Gln Trp Leu Asn Asn Tyr Lys Lys Gly Tyr
 115 120 125

35

Gly Tyr Gly Pro Tyr Pro Leu Gly Ile Asn Gly Gly Met His Tyr Gly
 130 135 140

40

Val Asp Phe Phe Met Pro Ile Gly Thr Pro Val Lys Ala Ile Ser Ser
 145 150 155 160

Gly Lys Ile Val Glu Ala Gly Trp Ser Asn Tyr Gly Gly Gly Asn Gln
 165 170 175

45

Ile Gly Leu Ile Glu Asn Asp Gly Val His Arg Gln Trp Tyr Met His
 180 185 190

Leu Ser Lys Tyr Asn Val Lys Val Gly Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gln
 195 200 205

50

Ile Ile Gly Trp Ser Gly Ser Thr Gly Tyr Ser Thr Ala Pro His Leu
 210 215 220

55

His Phe Gln Arg Met Val Asn Ser Phe Ser Asn Ser Thr Ala Gln Asp
 225 230 235 240

Pro Met Pro Phe Leu Lys Ser Ala Gly Tyr Gly Lys Ala Gly Gly Ser
 245 250 255

60

Val Thr Pro Thr Pro Asn Thr Gly Trp Lys Thr Asn Lys Tyr Gly Thr
 260 265 270

Leu Tyr Lys Ser Glu Ser Ala Ser Phe Thr Pro Asn Thr Asp Ile Ile
 275 280 285

5 Leu Arg Thr Thr Gly Pro Phe Arg Ser Met Pro Gln Ser Gly Val Leu
 290 295 300

Lys Ala Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp Glu Val Met Lys Gln Asp Gly
 305 310 315 320

10 His Val Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn Ser Gly Gln Arg Ile Tyr Leu
 325 330 335

Pro Val Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr Asn Thr Leu Gly Val Leu Trp
 340 345 350

15 Gly Thr Ile Lys
 355

20

NÁROKY NA OCHRANU

1. Genový konstrukt pro expresi termostabilního lysostafinu, **vyznačený tím**, že obsahuje
 25 kódující sekvenci ubikvitinu Ub2 a ve směru čtení od sekvence ubikvitinu Ub2 sekvenci kódující
 14 His-Tag, přičemž sekvence kódující 14 His-Tag je následována sekvencí kódující štěpné
 místo pro TEV proteázu a sekvence kódující štěpné místo pro TEV proteázu je následována
 nukleotidovou sekvencí kódující termostabilní variantu β -lytické endopeptidázy N39P_T178L
 s optimalizovanou frekvencí kodonů pro *E. coli*, přičemž uvedený genový konstrukt má
 30 následující sekvenci:

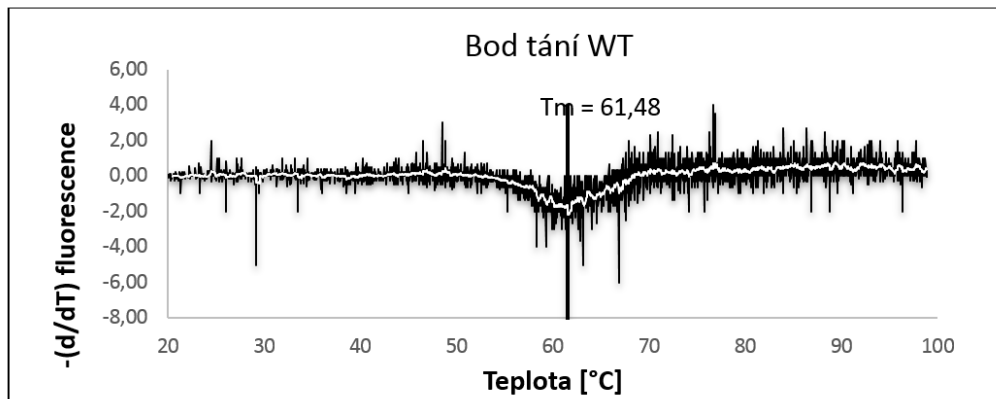
atgcagatcttcgtaaaccctgaccggtaaaaccatcacctggaagttgaaccgtctgacaccatcgaaaacgttaaagcgaaaatcca
 ggacaaagaaggtatccccggcggaccagcaggaactgatcttcgcgggtaaacagctggaagacggctgaccctgtctgactacaacat
 ccagaagaatctaccctgcacctggttctgcagctcgagggtggtcaccaccaccactctggtcaccaccacaccggtcaccaccaccac
 35 tctggttctcaccaccactctggtggtgaaaacctgtacttccagctctggtggtggtaccatggcgCACGAACACAGCGCGCA
 GTGGCTGAACAACACTACAAGAAAGGTTATGGCTATGGTCCGTATCCGCTGGGTATCAA
 TGGTGGTATGCACTACGGCGTGGACTTCTTTATGCCGATCGGTACCCCGGTGAAGGC
 GATCAGCAGCGGCAAAATTGTTGAGGCGGGTTGGAGCAACTATGGTGGCGGTAACC
 AGATCGGCCTGATTGAAAACGACGGTGTGCACCGTCAATGGTACATGCACCTGAGCA
 40 AGTATAACGTGAAAGTTGGCGATTACGTTAAGGCGGGTCAGATCATTGGCTGGAGCG
 GTAGCACCGGTTATAGCACCGCGCCGCACCTGCACTTCCAGCGTATGGTGAACAGCT
 TTAGCAACAGCACCGCGCAAGACCCGATGCCGTTCCCTGAAGAGCGCGGGTTATGGTA
 AAGCGGGCGGATCCGTTACCCCGACCCCGAACACCGGCTGGAAGACCAACAAATAC
 GGCACCCTGTATAAAAGCGAGAGCGGAGCTTCACCCCGAACACCGACATCATTCTG
 45 CGTACCACCGGCCCGTTTCGTAGCATGCCGCAGAGCGGGCGTGTGAAGGCGGGTCA
 AACCATCCACTATGACGAAGTTATGAAACAGGATGGTCACGTGTGGGTTGGTTACAC
 CGGCAACAGCGGTCAACGTATTTATCTGCCGTTTCGCACCTGGAATAAAAGCACCAA
 TACCCTGGGCGTTCTGTGGGGCACCATCAAGTAAAGATCTCTCGAG (SEQ ID NO. 1).

50 2. Fúzní termostabilní lysostafin kódovaný genovým konstruktem podle nároku 1, **vyznačený tím**, že obsahuje sekvence ubikvitinu 2, 14 His-Tagu a β -lytické termostabilní endopeptidázy N39P_T178L a má následující sekvenci:

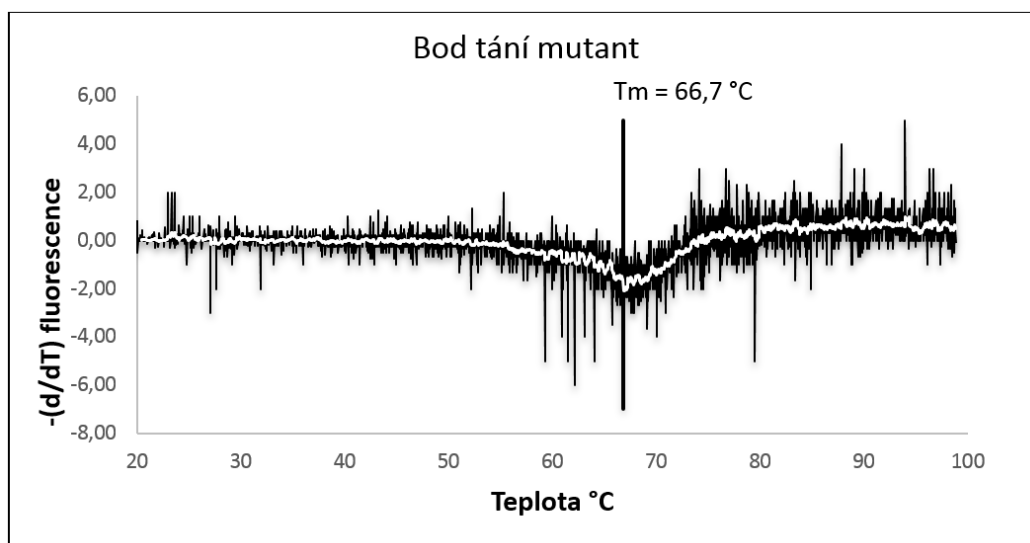
55 MQIFVKLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQ
 KESTLHLVLQLEGGHHHSHGHHHTGHHHSHGSHHSHGGENLYFQSGGGTMAHEHSAQ

5 WLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFMPVIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYGGGNQI
GLIENDGVHRQWYMHLKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFS
NSTAQDPMFLKSAGYGKAGGSVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFTPNTDILRTTGP
FRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGYTGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVL
WGTIK (SEQ ID NO. 2).

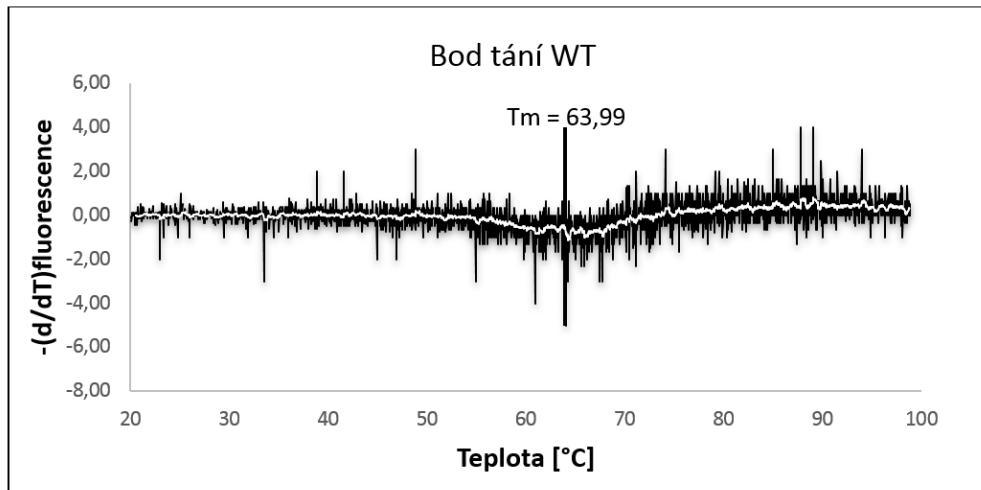
2 výkresy



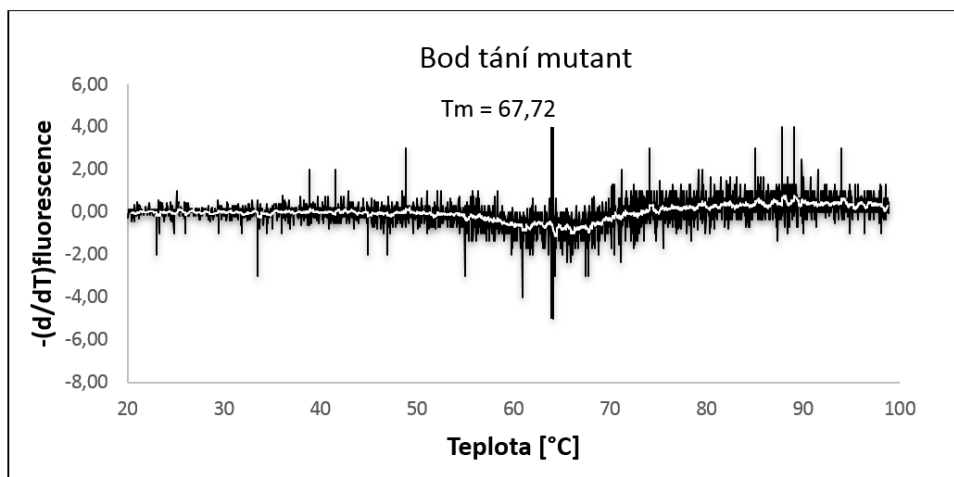
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4