



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21), (22) Заявка: 2008105793/13, 19.02.2008

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2009 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1, ЗАО
"НИИ Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ),
В.М. Белкову

(71) Заявитель(и):

Закрытое акционерное общество
"Научно-исследовательский институт
Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ) (RU)

(72) Автор(ы):

Гулевич Андрей Юрьевич (RU),
Скороходова Александра Юрьевна (RU),
Ермишев Владимир Юрьевич (RU),
Минаева Наталья Игоревна (RU),
Зименков Данила Вадимович (RU),
Крылов Александр Александрович (RU),
Бирюкова Ирина Владимировна (RU),
Машко Сергей Владимирович (RU)

(54) СПОСОБ КОНСТРУИРОВАНИЯ ОПЕРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТРАНСЛЯЦИОННО
СОПРЯЖЕННЫЕ ГЕНЫ, БАКТЕРИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ТАКОЙ ОПЕРОН, СПОСОБ
ПРОДУКЦИИ ПОЛЕЗНОГО МЕТАБОЛИТА И СПОСОБ МОНИТОРИНГА ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА

(57) Формула изобретения

1. Способ конструирования оперона, содержащего трансляционно сопряженные гены, включающий:

конструирование фрагмента ДНК, содержащего вырезаемый ген, кодирующий селективируемый маркер, фланкированный межцистронными областями трансляционно сопряженных генов прокариот, в котором:

первая межцистронная область локализована перед геном селективируемого маркерного гена, и указанная область содержит терминирующий кодон проксимального гена оперона, SD-последовательность и иницирующий кодон ORF, образующейся после вырезания гена, кодирующего селективируемый маркер, при этом SD-последовательность расположена перед иницирующим кодоном, а терминирующий кодон расположен перед SD-последовательностью или частично перекрывается с ней;

а вторая межцистронная область расположена после гена селективируемого маркера, и указанная область содержит терминирующий кодон ORF, образующейся после вырезания гена, кодирующего селективируемый маркер, SD-последовательность для дистального гена оперона и иницирующий кодон для дистального гена оперона, при этом SD-последовательность расположена перед иницирующим кодоном, а терминирующий кодон расположен перед иницирующим кодоном или частично перекрывается с ним;

интеграцию указанного фрагмента ДНК между соседними генами с использованием гомологичной рекомбинации; и

вырезание гена, кодирующего селективируемый маркер с использованием сайт-специфической рекомбинации, при этом в результате указанного вырезания между соседними генами образуется ORF, кодирующая пептид.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная первая межцистронная область выбрана из группы, состоящей из межцистронной области между генами *rplC-rplD*, генами *trpC-trpB*, генами *rplW-rplB*, генами *rplB-rpsS*, генами *rpsS-rplV* и генами *lgt-thyA*, а указанная вторая межцистронная область выбрана из группы, состоящей из межцистронной области между генами *trpE-trpD*, генами *trpB-trpA*, генами *trpD-trpC*, генами *trpC-trpB*, генами *thrA-thrB*, генами *thrB-thrC*, генами *galT-galK*, генами *hisG-hisD*, генами *hisB-hisH*, генами *hisH-hisA*, генами *lgt-thyA*, генами *rplC-rplD*, генами *rplW-rplB*, генами *rplB-rpsS*, генами *rpsS-rplV*, генами *hisD-hisC*, генами *hisC-hisB* и генами *rplD-rplW*, а также в случае, когда первым нуклеотидом второго кодона дистального гена является аденозин, вторая межцистронная область выбрана из группы, состоящей из межцистронной области между генами *hisD-hisC*, генами *hisC-hisB* или генами *rplD-rplW*.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная первая межцистронная область является межцистронной областью между генами *rplC-rplD*, а указанная вторая межцистронная область является межцистронной областью между генами *trpE-trpD*.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная стадия интеграции включает использование системы Red-зависимой интеграции.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная стадия вырезания включает использование *int-xis* системы.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный оперон присутствует на плазмиде или на бактериальной хромосоме.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный оперон является бицистронным.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанный оперон включает гены *agoG4* и *serA5*.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный оперон дополнительно содержит эффективный сайт связывания рибосомы перед проксимальным геном.

10. Бактерия, содержащая оперон с трансляционно сопряженными генами, сконструированный способом по п.1, отличающаяся тем, что указанный оперон присутствует на бактериальной хромосоме или на плазмиде.

11. Бактерия по п.10, отличающаяся тем, что указанная бактерия принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae*.

12. Бактерия по п.11, отличающаяся тем, что указанная бактерия принадлежит к роду *Escherichia*.

13. Бактерия по п.11, отличающаяся тем, что указанная бактерия принадлежит к роду *Rantoea*.

14. Бактерия по п.10, отличающаяся тем, что указанная бактерия обладает способностью к продукции полезных метаболитов.

15. Бактерия по п.14, отличающаяся тем, что указанный полезный метаболит выбран из группы, состоящей из нативных или гетерологичных белков, ферментов, L-аминокислот, нуклеозидов, нуклеотидов и витаминов.

16. Способ продукции полезного метаболита, включающий:

культивирование бактерии по любому из пп.14 и 15 в питательной среде; и выделение указанного полезного метаболита из культуральной жидкости.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанный полезный метаболит выбран

из группы, состоящей из нативных или гетерологичных белков, ферментов, L-аминокислот, нуклеозидов, нуклеотидов и витаминов.

18. Способ мониторинга экспрессии гена, включающий:
конструирование в соответствии со способом по п.1 системы экспрессии, в которой указанный ген трансляционно сопряжен с маркерным геном;
экспрессию оперона, содержащего указанные трансляционно сопряженные гены; и
определение активности белка, кодируемого маркерным геном.

RU 2008105793 A

RU 2008105793 A