
Octrooiraad



12 A Terinzagelegging 11 8801826

Nederland

19 NL

- 54 **Werkwijze voor het detecteren van mutaties in markergenen.**
- 51 Int.Cl⁵: C12N 15/00.
- 71 Aanvrager: Nederlandse Organisatie voor Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek TNO te 's-Gravenhage.
- 74 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

21 Aanvraag Nr. 8801826.

22 Ingediend 19 juli 1988.

32 - -

33 - -

31 - -

62 - -

43 Ter inzage gelegd 16 februari 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het detecteren van mutaties in markergenen.

- De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van mutaties in een of meer markergenen, die met behulp van een vector in een zoogdiergenoom zijn geïntroduceerd, door uit cellen van het transgene zoogdier resp. uit de zoogdiercellen DNA te isoleren, uit dit DNA de vector terug te winnen, de vector in een geschikte bacteriële gastheer, die ten aanzien van ten minste één van de markergenen deficiënt is, te vermehren en markergen-expressie te onderzoeken.
- 10 Een dergelijke werkwijze is bekend uit Lohman et al. 1987; en Vijg en Uitterlinden, 1987, waarin een dier-experimenteel model, onder andere voor het inschatten van de risico's van potentieel carcinogene stoffen, wordt beschreven. Meer in het bijzonder wordt daarin
- 15 een muizemodel voor in vivo mutatieanalyse voorgesteld, waarbij gebruik wordt gemaakt van transgene muizen waarvan alle cellen, inclusief de geslachtscellen, een in het genoom geïntegreerde bacteriofaag lambda vector bevatten die van een selecteerbare marker is voorzien. Het testen
- 20 van stoffen op carcinogeniciteit is van groot belang in een maatschappij waarin steeds meer nieuw gesynthetiseerde stoffen hun intrede doen. Veel van deze stoffen, alsmede een aantal reeds bestaande chemische verbindingen, worden verdacht van carcinogeniciteit. Volgens de huidige inzichten
- 25 zou kanker berusten op veranderingen in de DNA basevolgorde van bepaalde genen. Mutagene stoffen (d.w.z. stoffen die de basevolgorde van het DNA veranderen) zijn vrijwel altijd carcinogeen en kunnen ook blijvende schade aan het erfelijk materiaal veroorzaken (en dus tot erfelijke
- 30 ziektes leiden). Het vermogen van een stof mutaties in genen te introduceren wordt daarom wel beschouwd als het criterium bij uitstek om de risico's van de desbetreffende stof te schatten voor wat betreft nadelige gezondheidseffecten zoals kanker en afwijkingen in de

erfelijke informatie.

De bekendste test voor potentieel mutagene stoffen is de Ames test waarbij gekeken wordt naar mutaties in bacterien (Ames et al., 1973). Waarschijnlijk omdat
5 bacterien nogal ver van de mens afstaan is deze test niet 100% betrouwbaar (Zeiger et al., 1987). Om deze reden geeft men vaak de voorkeur aan een combinatie van testen, waaronder testen met muizecellen. Zoals voor alle zoogdiercellen geldt, is het genoom van muizecellen
10 te gecompliceerd voor mutatiestudies analoog aan de Ames test. Een groot voordeel van bacterien is tevens dat ze zeer korte generatietijden hebben, hetgeen selectie voor bepaalde mutaties, alsmede hun karakterisering mogelijk maakt.

15 Een belangrijk probleem met gekweekte zoogdiercellen als model in mutageniciteitstesten is het kunstmatige van de in vitro situatie en de onmogelijkheid uitspraken te doen omtrent verschillen tussen organen en weefsels voor wat betreft aard en frequentie van geïnduceerde
20 mutaties. Het kan bijvoorbeeld van groot belang zijn te weten of een bepaalde stof bij voorkeur mutaties induceert in de geslachtscellen, of juist niet. Anderszins is informatie nodig omtrent de mogelijkheid uitspraken te doen over mutaties in bepaalde organen op basis van
25 metingen aan het bloed. Dit is bijvoorbeeld van belang bij het screenen van mensen die mogelijk zijn blootgesteld aan gevaarlijk hoge doses van een carcinogene stof.

Op dit moment zijn er maar weinig mogelijkheden mutaties te onderzoeken in vivo in cellen van hogere
30 dieren. Een voorbeeld is de zg. HPRT test, waarbij mutaties in het HPRT gen geselecteerd worden op basis van de 6-thioguanine resistentie van de geïsoleerde en gekweekte cellen (Albertini et al., 1982). Deze methode is arbeidsintensief en laat alleen metingen toe aan cellen die
35 nog kunnen delen en gemakkelijk te kweken zijn.

De benadering die gesuggereerd wordt in de reeds

. 8801826

genoemde artikelen van Lohman et al, 1987 en Vijg en Uitterlinden, 1987, gaat ervan uit dat een in het muize DNA geïntegreerde bacteriofaag lambda vector, die één of meer selecteerbare bacteriële genen bevat, vanuit
5 totaal chromosomaal DNA kan worden teruggewonnen door menging van dit DNA met een enzymcocktail welke de vector op de flankerende "cos sites" uit het muize DNA knipt en vervolgens inpakt in capsules. Hierna worden de ingepakte fagen samen met een overmaat bacteriën uitgeplaat op
10 een voedingsbodem, voorzien van een indicator, hetgeen na één nacht resulteert in een aantal zg. plaques, d.w.z. cirkelvormige ophelderingen in het bacteriedek. Elke plaque correspondeert met één teruggewonnen vector. Indien het markergen in de faag intact is zal dit tot expressie
15 komen. De afwezigheid van expressie is dus een indicatie voor een mutatie in het markergen.

Ten overvloed dient hier te worden vermeld dat bovengenoemde benadering niet kan worden gevolg met natuurlijk aanwezige genen. Deze kunnen simpelweg niet
20 met grote efficiëntie uit het DNA van een orgaan worden geïsoleerd. De ingebrachte vector kan dat wel dankzij diens bijzondere eigenschappen, w.o. de aanwezigheid van twee halve cos sites aan weerszijden van de vector. Indien de vector kop aan staart in het muize DNA is
25 geïntegreerd, kunnen de middelste vectoren op de hele cos sites uit het muize DNA worden geknipt. Het is dus, althans bij dit type door halve cos sites geflankeerde vectoren, essentieel dat ten minste 3 vectoren kop aan staart integreren. In het geval van vectoren, die door
30 hele cos sites worden geflankeerd, is dit niet noodzakelijk.

Een voorbeeld van een markergen is het bacteriële gen lacZ. Hiermee (en met andere overeenkomstige markergenen) kunnen op eenvoudige wijze frequentie en aard van mutaties in verschillende organen en weefsels van de transgene
35 dieren worden bepaald d.m.v. het bovenbeschreven terugwinnen van de vector en het overbrengen daarvan naar bacteriën. Het lacZ gen codeert voor β -galactosidase dat X-gal (het substraat) omzet in een blauwe stof. X-gal kan

worden toegevoegd aan de voedingsbodem waarop de bacteriofagen worden uitgeplaat met overmaat bacteriën. Elke faag zal aanleiding geven tot een blauwe plaque indien het lacZ gen nog intact is. Mutaties in dit gen verraden
5 zich door het ongekleurd laten van de plaques als gevolg van de inactivatie van het lacZ gen. Elke ongekleurde plaque is een klein reservoir van gemuteerde genen, welke op eenvoudige wijze verder kunnen worden geanalyseerd indien men dit nodig acht. Er bestaan een aantal verschil-
10 lende mutatiedoelwitgenen (lacZ, lacI, lacZ α , supF, cI, galK, LacO, gpt, etc.), waarvan er een aantal tegelijkertijd of afzonderlijk in een vector kunnen worden ingebouwd.

Bovenbeschreven systeem kan alleen werken als de
15 vector met een voldoende hoge efficiëntie kan worden teruggewonnen. Theoretisch zou men uit elke cel van een bepaald orgaan een vector willen "redden" teneinde vast te stellen of daarin een mutatie is opgetreden. In de praktijk kan men genoeg nemen met ca. 100.000
20 vectoren uit een bepaald orgaan. Op basis van bovenbeschreven HPRT tests (in witte bloedcellen) vermoedt men nl. dat de spontane mutatiefrequentie ca. 1 op 100.000 is (Albertini et al., 1985), d.w.z. van de 100.000 cellen zal er bij normale volwassen individuen voor elk gen steeds één
25 geïnactiveerd zijn door een mutatie op een bepaalde plaats. Dit geldt voor eiwitcoderende, natuurlijk aanwezige genen.

Tot nog toe zijn er geen aanwijzingen dat bacteriofaag lambda vectoren (of andere geïntegreerde vectoren) met
30 meer dan enkele tientallen per μ g genomisch DNA kunnen worden teruggewonnen (Lindenmaier et al., 1982; Glazer et al., 1985). Voor het redden van de geïntegreerde vectoren uit meer dan enkele microgrammen genomisch DNA is zeer veel faagverpakkingsextract (de enzymcocktail)
35 noodzakelijk. Gezien de hoge prijs van de huidige commercieel verkrijgbare faagverpakkingsextracten is een simpele

opschaling van de procedure teneinde meer vectoren terug te winnen niet praktisch. De lage faagverpakkingsefficiëntie is mogelijk de reden dat tot nog toe bovenbeschreven systeem niet wordt toegepast als mutatiemodel, noch
5 in de vorm van cellijnen noch in de vorm van transgene muizen. Weliswaar wordt uitgebreid gebruik gemaakt van vectoren met mutatiedoelwitgenen erop, maar altijd zonder ze te laten integreren (voor een overzicht, zie Lehmann, 1985 en Dubridge en Calos, 1988). Een uitzondering betreft
10 het werk van Glazer et al. (1985), waarbij d.m.v. transfectie een bacteriofaag lambda vector voorzien van een bacterieel mutatiedoelwitgen in een cellijn werd gebracht. Het geïntegreerde gen werd vervolgens teruggewonnen en geanalyseerd op mutaties. De efficiëntie van het terugwinnen
15 was echter laag.

Recentelijk zijn de huidige uitvinder en collegae erin geslaagd transgene muizen te maken met in elke cel één of meer copieën van een bacteriofaag lambda vector voorzien van een lacZ mutatiedoelwitgen. Bij
20 de dieren met ten minste 3 of meerdere tandem geïntegreerde vectoren is in principe in vitro verpakking in faaghulzen ("in vitro packaging") vanuit totaal genomisch muize DNA mogelijk. In eerste instantie bleek echter opnieuw dat de vector niet met een redelijke efficiëntie kon
25 worden teruggewonnen.

De uitvinding verschaft nu een oplossing voor dit probleem en verschaft daarmee een methode voor het efficiënt terugwinnen van de vector uit totaal chromosomaal DNA van verschillende organen en weefsels van een transgeen
30 zoogdier resp. uit totaal chromosomaal DNA van een gekweekte zoogdiercellijn (hiermee wordt in het bijzonder een door transfectie met de vector verkregen cellijn bedoeld, of meer in het algemeen elke zoogdiercellijn die de vector bevat, ongeacht hoe de cellijn is verkregen).

35 De uitvinding is gebaseerd op het bij nader onderzoek ontstane inzicht dat de geïntegreerde vectoren bij alle onderzochte muizen volledig gemethyleerd waren. Met andere woorden, in de organen en weefsels van de onderzochte transgene muizestammen bleken alle onderzochte cytosine

residuen in de vector voorzien van een covalent gebonden 5-methylgroep. Het is bekend dat bepaalde vormen van methylering, bacteriën in staat stellen tot zg. gastheer-restrictie (Raleigh et al., 1986). Dat wil zeggen binnenkomend DNA (zoals bijv. de bacteriofaag lambda vectoren) worden bij wijze van verdediging in stukken geknipt voor ze de kans krijgen hun gastheer te gaan beheersen en uiteindelijk te doden (hetgeen aanleiding geeft tot lytische plaques). Bedacht werd dat dit fenomeen wel eens de oorzaak zou kunnen zijn voor het lage aantal plaques dat in de praktijk werd verkregen. Omdat de gebruikte, in de handel verkrijgbare faagverpakkingsextracten gemaakt worden van bacteriën en er tevens bacteriën nodig zijn om de fagen mee uit te platen (als gastheer) werd besloten om voor beide doeleinden uitsluitend te werken met bacteriestammen welke niet in staat zijn tot gastheerrestrictie. Daartoe konden de faagverpakkingsextracten worden betrokken van Stratagene (Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, LaJolla, CA 92037 USA), dat in tegenstelling tot andere firma's faagverpakkingsextracten levert afkomstig van E.coli c, een stam die niet in staat is tot gastheerrestrictie. De desbetreffende firma levert bij de extracten t.b.v. het uitplaten echter niet de betreffende E.coli c stam, doch andere stammen die wel gastheerrestrictie kennen. De E.coli c stam is op zichzelf bekend en bijvoorbeeld verkrijgbaar bij de Phabagen collectie (Universiteit van Utrecht, department of Molecular Cell Biology, Padualaan 8, P.O. Box 80.056, 3508 TB Utrecht). Door middel van bestraling met ultraviolet licht werden vervolgens varianten verkregen met een geïnactiveerd lacZ gen. Dit laatste is nodig omdat anders selectie op inactivatie van lacZ in de te verpakken vectoren niet mogelijk is.

Bij gebruikmaking van de verkregen E.coli c lacZ⁻ stam, werden uit ca. 1 µg totaal genomisch DNA van één transgene muizestam ca. 10.000 vectoren teruggewonnen.

. 8801826

De blauwe kleur van de plaques suggereerde dat in al deze gevallen het lacZ gen niet was gemuteerd.

Deze faagverpakkingsefficiëntie is veruit het hoogste dat ooit is bereikt vanuit totaal chromosomaal DNA en
5 in principe voldoende voor onderzoek naar geïnduceerde mutaties.

Terwijl de essentie van de uitvinding is gelegen in het gebruik van bacteriestammen die niet tot gastheer-restrictie in staat zijn, zoals bij voorkeur E.coli
10 c stammen, is verder voor een hoge faagverpakkingsefficiëntie bevorderlijk gebleken dat een groot aantal kopieën van de vector kop-aan-staart in het zoogdiergenoom is geïntegreerd. Bij de transgene muizestam (20.2) die het bovengenoemde resultaat mogelijk maakte, bleek dit kopie-aantal ca.
15 70 te bedragen. Dit betekent dat de betreffende muizen een additionele 3,5 miljoen baseparen DNA tot hun genoom mogen rekenen. Ook bij andere stammen bleek de vector in een groot aantal kopieën geïntegreerd. Bijv. stam 40.6 heeft de vector in ca. 30 kopieën. Het stabiel
20 overerven van zoveel additioneel DNA is ook nog niet eerder gerapporteerd.

Echter, voor het verkrijgen van een betrouwbaar beeld van de mutatiefrequentie in verschillende organen en weefsels bij lage doses van de verdachte stof is
25 het noodzakelijk veel meer dan 10.000 plaques te onderzoeken. Zoals boven vermeld is opschaling van de faagverpakking-reaktie door het gebruiken van meer genomisch DNA een kostbare zaak. Stel bijv. dat een verdachte stof de mutatiefrequentie verhoogt van 1 op 100.000 (spontane
30 frequentie) naar 1 op 50.000. Theoretisch zou men dan op basis van de behaalde efficiëntie een faagverpakkingsexperiment moeten doen met 5 µg totaal genomisch muize DNA. Daaruit zou men dan één mutant halen (één ongekleurde plaque). Het zal duidelijk zijn dat dit in de praktijk
35 niet voldoende is; voor een accurate bepaling van zo'n lage mutatiefrequentie zullen ten minste 500.000 tot

1 miljoen plaques bekeken dienen te worden.

Dit probleem werd volgens een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding opgelost door een voorzuivering uit te voeren die gebaseerd is op de idee dat, indien de
5 vectoren op enigerlei wijze gescheiden zouden kunnen worden van de rest van het chromosomale DNA, de ratio van de vector t.o.v. de rest van het genoom veel gunstiger wordt. Dit betekent dat met dezelfde hoeveelheid faagverpakkingsextract veel meer vectoren kunnen worden terugge-
10 wonnen. De vraag was echter hoe de geïntegreerde vectoren van de rest van het chromosomaal DNA zouden kunnen worden gescheiden.

Bedacht werd dat indien de vector, die ca. 50.000 baseparen lang is, voor een bepaald restrictieenzym,
15 dat frequent knipt in totaal genomisch zoogdier DNA, geen herkenningsplaatsen heeft, dit na tandem integratie in bijv. 30 kopieën een fragment oplevert van ca. 1,5 miljoen baseparen. Aangezien een in zoogdier DNA frequent knippend restrictieenzym fragmenten genereert
20 met een gemiddelde grootte van ca. 5000 baseparen, is zo'n groot fragment d.m.v. een eenvoudige scheidingsmethode snel op te zuiveren.

De door de uitvinder en collegae gebruikte vector bevatte geen herkenningsplaatsen voor het enzym XbaI.
25 Gebleken is dat bij een aantal van de bereide transgene muizen de vector tandem was geïntegreerd in 30-70 kopieën. Inderdaad bleek na knippen met XbaI een fragment van meer dan 1 miljoen baseparen gemakkelijk te scheiden van de rest van het (gefragmenteerde) genomisch DNA.
30 Bedacht werd dat een zelfde principe ook andersom gebruikt zou kunnen worden. In het genoom geïntegreerde plasmiden (die niet groter zijn dan bv. ca. 5000 baseparen) kunnen, mits geflankeerd door voor het plasmide unieke restrictie-
enzym herkenningsplaatsen, op simpele wijze gered worden
35 uit totaal genomisch DNA; indien links en rechts van de vector zeldzame restrictieenzymherkenningsplaatsen

worden aangebracht (bijv. Not I) is ook hier een voorzui-
vering mogelijk op basis van in dit geval juist de geringe
grootte van het plasmide-bevattende DNA fragment.

Uit faagverpakkingsexperimenten met voorgezuiverd
5 vector-bevattend genomisch DNA van zowel onbehandelde
als met ENU behandelde transgene muizen (stam 20.2) bleek
dat per DNA sample (ca. 50 ug totaal chromosomaal muize
DNA) ca. 500.000 plaques in één experiment konden worden
verkregen.

10 De uitvinding verschaft dus een werkwijze van de
in de aanhef vermelde soort die gekenmerkt wordt doordat
als bacteriële gastheer een bacteriestam wordt gebruikt
die niet in staat is tot gastheer-restrictie.

De te gebruiken bacteriestam is bij voorkeur een
15 Escherichia coli stam, zoals een E.coli c stam.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding
wordt gekenmerkt doordat het uit cellen van het transgene
zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt
voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp
20 van een restrictie-enzym dat geen knipplaats in de vector
heeft, de verkregen fragmenten op basis van een geschikt
criterium, zoals verschillen in grootte, te scheiden
en fragmenten die de vector omvatten te verzamelen,
waarna uit dit voorgezuiverde DNA de vector wordt terugge-
25 wonnen.

Meer in het bijzonder wordt een voorkeursuitvoeringsvorm
van de uitvinding gekenmerkt doordat als vector een
bacteriofaag vector, zoals een bacteriofaag lambda vector
of een cosmide vector wordt toegepast, waarbij deze
30 vector uit DNA wordt teruggewonnen door in vitro verpakking
in faaghulzen met behulp van een faagverpakkingsextract
dat verkregen is uit een bacteriestam die niet in staat
is tot gastheer-restrictie.

Daarbij heeft het verder de voorkeur dat een bacterio-
35 faagvector met een grootte van ten minste 30 kb wordt

toegepast, waarvan ten minste 10 kopieën kop-aan-staart in het zoogdiergenoom zijn geïntegreerd en het uit cellen van het transgene zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp van een restrictie-enzym, zoals Xba I, dat geen knipplaats in de vector heeft maar een zodanig groot aantal knipplaatsen in het zoogdiergenoom heeft dat het in staat is om fragmenten met een gemiddelde grootte beneden 10 kb te genereren, de verkregen fragmenten op basis van hun verschillende grootte te scheiden en de grotere fragmenten, die de vector omvatten, te verzamelen.

Een andere uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt gekenmerkt doordat als vector een plasmide vector, geflankeerd door voor het plasmide unieke restrictie-enzym knipplaatsen, wordt toegepast, waarbij deze vector uit DNA wordt teruggewonnen door fragmentering van het uit cellen van het transgene zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA met behulp van dit restrictie-enzym en ringsluiting.

Daarbij heeft het dan de voorkeur dat een plasmide vector met een grootte van ten hoogste 10 kb wordt toegepast, en het uit cellen van het transgene zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp van een restrictie-enzym, zoals Not I, waarvan knipplaatsen de plasmide vector flankeren maar geen knipplaats in de vector vóórkomt en een zodanig gering aantal knipplaatsen in het zoogdiergenoom vóórkomt dat het in staat is om fragmenten met een gemiddelde grootte boven 20 kb te genereren, de verkregen fragmenten op basis van hun verschillende grootte te scheiden en de kleinere fragmenten, die de vector omvatten, te verzamelen.

De uitvinding kan direkt worden toegepast bij het testen van verdachte stoffen op carcinogeniciteit. Het effect van de verdachte stof, in termen van mutatiefrequentie, kan kort na behandeling (bv. na enkele uren of na enkele dagen) direct worden

bestudeerd in DNA uit verschillende organen en weefsels van de behandelde transgene dieren, zoals muizen. Hiertoe is hoogge-kwalificeerd personeel geen vereiste. Ook de aard van de mutaties kan op betrekkelijk simpele wijze worden vastgesteld.

- 5 Dit laatste komt omdat het gemuteerde lacZ gen in dit systeem reeds gekloneerd is. Bij de bestudering van endogene genen, zoals HPRT, is het altijd noodzakelijk eerst het gemuteerde gen zuiver in handen te krijgen. In het onderhavige geval is iedere plaque een klein
10 reservoir van lacZ genen, die gemakkelijk kunnen worden doorgekweekt. De nucleotidevolgorde van het lacZ gen kan nu rechtstreeks worden bepaald met behulp van klassieke methoden.

- Naast de Ames test en de chemische structuur van
15 de verdachte stof zou het hier beschreven transgene muizemodel heel goed een zo gewenste derde (in vivo) test kunnen zijn (voor een discussie van deze problematiek, zie Ashby en Tennant, 1988 en Hay, 1988). De invoering van de huidige uitvinding als derde test is kostenbesparend,
20 omdat men dan minder vaak genoodzaakt zal zijn gebruik te maken van langdurige dierproeven, alsmede van dure veterinaire pathologen. Tevens brengt invoering ervan minder ongemakken met zich mee voor de gebruikte dieren, terwijl het aantal dieren sterk beperkt kan worden. Al
25 deze factoren maken de huidige uitvinding tot een geschikte kandidaat voor een derde korte termijn test voor van carcinogeniciteit verdachte chemicaliën.

- Een belangrijk tweede toepassingsgebied, gerelateerd aan het eerste, is het gebruik van bovenbeschreven transgene
30 muizemodel voor het testen van de potentieel beschermende werking van bepaalde stoffen. Hoewel het vermijden vanodeloze blootstelling aan potentieel carcinogene stoffen natuurlijk altijd de voorkeur geniet boven beschermende maatregelen, zijn er toch omstandigheden denkbaar die
35 blootstelling onvermijdelijk maken. Een simpel voorbeeld is de bewuste blootstelling van reparatieploegen aan

veel te hoge doses carcinogene stoffen bij fabrieksongevallen (of straling bij bijv. ongelukken met kerncentrales). De beschikbaarheid van farmaca met een beschermende werking tegen beschadiging van het erfelijk materiaal zou hier
5 uitkomst kunnen bieden. Echter, ook buiten dit soort extreme omstandigheden is beschadiging van het erfelijk materiaal niet altijd te vermijden. Er zijn bijv. aanwijzingen dat in veel woningen de hoeveelheid achtergrondstraling extreem hoog is, hetgeen bescherming gewenst maakt.
10 Anderszins is op sommige breedtegraden de hoeveelheid ultraviolet licht dusdanig hoog dat het risico op huidkanker aanzienlijk stijgt. In meer algemene zin kan gesteld worden dat blootstelling aan (te) hoge doses DNA-beschadigende factoren meer en meer een niet te vermijden realiteit
15 van het dagelijks leven zal worden. In dit verband is het relevant om te streven naar bescherming, bijv. door toevoeging van beschermendestoffen aan het dieet. Hoewel gesuggereerd is dat inderdaad bepaalde dieetfactoren, zoals vitamine c, SOD (super oxyde dismutase), caroteen
20 etc. zouden beschermen tegen DNA-beschadigende stoffen en wellicht daardoor tegen kanker, is dit tot nog toe nooit overtuigend aangetoond. Met behulp van de onderhavige uitvinding kunnen bepaalde farmaca worden getest op hun vermogen het individu te beschermen tegen beschadiging
25 van diens erfelijk materiaal. Een en ander kan in de praktijk gebeuren door bovenbeschreven transgene muizen te behandelen met DNA-beschadigende stoffen in de aan- en afwezigheid van de te testen stof. Een mogelijk heilzame werking daarvan in de vorm van een verlaging van de
30 mutatiefrequentie kan vervolgens snel worden vastgesteld door een groot aantal vectoren terug te winnen uit verschillende organen en weefsels van de desbetreffende dieren.

Figuurbeschrijving

Figuur 1 toont schematisch de in het experimentele gedeelte beschreven bacteriofaag lambda vector gt 10 lacZ.

5 Figuur 2 toont de kop-aan-staart organisatie van vector-kopieën in het genoom van de transgene muizen.

Figuur 3 toont een autoradiogram na Southern blotting van met BamHI of EcoRI geknipt vector-DNA uit verschillende transgene muizen.

10 Figuur 4 toont een autoradiogram na Southern blotting van DNA uit de lever van transgene muis 35.5, geknipt met Hind III(H), Hind III/XhoI (H/X), HpaII (Ha) of MspI (M); als probe is lambda-gt10 lacZ met ³²P-label gebruikt.

15 Figuur 5 toont de resultaten van preparatieve FIGE aan DNA van transgene muizen, welk DNA met XbaI is geknipt.

Beschrijving van experimenten

In fig. 1 is de gebruikte bacteriofaag lambda vector getoond. Deze vector, lambda gt10lacZ, werd verkregen
20 door het klonen van het lacZ gen in de EcoRI site van de commercieel verkrijgbare bacteriofaag lambda vector gt10 (Promega B.V., Postbus 391, 2300 AJ Leiden). In het kaartje zijn alleen de EcoRI sites, de BamHI sites en de XhoI site aangegeven. De vector had géén herkennings-
25 plaatsen voor het enzym XbaI. Dit laatste is opvallend omdat dit enzym in totaal genomisch zoogdier DNA gemiddeld om de 5000 baseparen een herkenningsplaats heeft. Op deze eigenschap wordt later nog teruggekomen.

Bovengenoemde vector is d.m.v. microinjectie overge-
30 bracht naar de geslachtslijn van muizestam CD2, de F1 van BALB/C x DBA/2. Deze twee stammen maken deel uit van de kolonie knaagdieren van het Instituut voor Experimentele Gerontologie TNO. Ca. 150 kopieën van de vector werden geïnjecteerd in één van de twee pronuclei van
35 een bevruchte eicel van een CD2 muis. Het daartoe gevolgde protocol staat tot in detail beschreven in Hogan et

al. (1986).

In fig. 2 is de verwachte kop-staart organisatie
getoond van de vectoren na integratie in het muizegenoom.
Uit de literatuur is bekend dat na microinjectie van
5 DNA fragmenten in de kern van een bevruchte muizeëicel
deze in het algemeen kop aan staart integreren op willekeu-
rige plaatsen (Brinster et al., 1987). Zoals fig. 2
laat zien zullen na kop-staart integratie steeds twee
halve cos sites één hele cos site vormen. Dit laatste
10 is essentieel, aangezien voor het terugwinnen van één
vector steeds twee hele cos sites aan weerszijden van
de vector herkend en opengeknippt dienen te worden door
het terminase enzym in het packagingextract. Het faag
DNA tussen twee cos sites wordt vervolgens ingepakt
15 in faaghulzen. Teneinde één vector terug te winnen vanuit
totaal genomisch DNA zijn dus ten minste drie vectoren,
kop-aan-staart geïntegreerd, noodzakelijk. Fig.2 laat
zien dat er, bij kop-staart integratie in twee of meer
kopieën, na knippen van totaal genomisch muize DNA een
20 BamHI fragment dient te ontstaan van 12,6 kb dat één
intacte cos site bevat. Daarnaast ontstaan nog 5 andere
BamHI fragmenten. Knippen met EcoRI levert drie fragmenten
op, waarvan één het lacZ vertegenwoordigt.

Fig. 3 toont aan dat, geheel volgens verwachting,
25 de vector kop aan staart is geïntegreerd in meerdere
kopieën; slechts in twee van de 7 gevallen bleek één
kopie aanwezig. Eén en ander kon worden aangetoond door
van de jonggeboren transgene muizen DNA te isoleren
uit de staart, en dit vervolgens te analyseren m.b.v.
30 de methode van Southern. Het DNA werd steeds geknipt
met BamHI en (apart) met EcoRI. Het in fig. 3 getoonde
autoradiogram laat zien dat bij de muizen 33.4, 34.1,
35.2, 35.3 en 35.5 de zesde BamHI band duidelijk aanwezig
is. De intensiteitsverschillen tonen aan dat het kopieaantal
35 waarin de vector (kop-staart) is geïntegreerd sterk
varieert. Bij transgene muis 35.5 zijn dit er volgens

schatting 25.

Theoretisch zou het mogelijk moeten zijn ca. 17000 vectoren uit 1 μ g totaal genomisch DNA te redden, uitgaande van een packaging efficiëntie van 10^9 per μ g zuivere vector de lengte van de vector (ca. 5×10^4) gedeeld door de lengte van het totale zoogdiergenoom (ca. 3×10^9) maal de packaging efficiëntie (ca. 10^9 per μ g zuivere vector bij gebruikmaking van de huidige commercieel verkrijgbare packaging extracten)7. Bij deze berekening is tevens uitgegaan van 3 geïntegreerde vectoren per celgenoom (daar kan er dus maar één van gered worden).

Echter, in tegenstelling tot datgene wat theoretisch kan worden verwacht kan uit de resultaten van anderen met lambda vectoren, geïntegreerd in het genomisch DNA van cellijnen, worden afgeleid dat de packaging efficiëntie niet veel hoger is dan enkele plaques per μ g totaal genomisch DNA. De reden hiervan was onbekend. Reddings-efficiënties van geïntegreerde plasmidevectoren liggen in dezelfde orde van grootte.

Pogingen om de door ons in het muizegenoom geïntegreerde vectoren rechtstreeks vanuit chromosomaal DNA van verschillende organen en weefsels terug te winnen, resulteerden in eerste instantie in slechts enkele plaques per μ g DNA. Onze bevindingen waren dus niet afwijkend van bovengenoemde resultaten van anderen. Voor de isolatie van totaal chromosomaal DNA uit verschillende organen en weefsels werden deze eerst gehomogeniseerd in een Dounce homogenisator en vervolgens overnacht geïncubeerd in 5 volumes 100 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1% SDS, 200 μ g/ml proteinase K bij 65°C. Vervolgens werd de oplossing gemengd met 1/5 volume 8 M Kalium acetaat en gedurende 30 min op ijs bewaard. Na 1 X chloroform extractie werd het DNA geprecipiteerd met 1 volume ijskoude ethanol. Het DNA werd gespoeld met 70% ethanol en vervolgens opgelost in TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA). Bij alle hieronder beschreven experimenten is

. 8801826

steeds deze isolatieprocedure gevolgd.

Met betrekking tot packaging in vitro is gebruik gemaakt van een procedure welke standaard is op vele laboratoria (zie Maniatis et al., 1982). De procedure
5 berust erop dat de lambda vectoren (in ons geval het totaal genomisch muize DNA met daarin de lambda vectoren) worden gemengd met het packagingextract dat zorgt voor het inpakken van iedere vector in een faaghuls. Na mengen met een sterke overmaat bacteriën (de gastheer) worden
10 deze gegroeid op een voedingsbodem. De bacteriën, die dus eerst de tijd krijgen om te groeien, worden langzaam maar zeker allen geïnfecteerd door de fagen. Dit wordt zichtbaar door een groot aantal ophelderingen in het gesloten bacteriedek. Elke opheldering (die in het begin
15 heel klein zijn, maar steeds groter worden totdat het gehele bacteriedek is opgehelderd), correspondeert met één lambda vector. Omdat onze vector het bacteriële gen lacZ bevat dienen de ophelderingen blauw te zijn.

Echter, slechts zelden wordt m.b.v. dit protocol
20 getracht om in het genoom geïntegreerde lambda vectoren te packagen. In vrijwel alle gevallen wordt packagen toegepast bij het klonen van genomische DNA fragmenten in zuivere vectoren. Deze zijn commercieel verkrijgbaar en worden door de fabrikant gegroeid op bacteriën en
25 daaruit m.b.v. betrekkelijk simpele methoden in zuivere vorm geïsoleerd. In ons geval zijn de vectoren geïntegreerd op één of meerdere plaatsen in het muizegenoom en kunnen daaruit niet op eenvoudige wijze worden geïsoleerd.

Nadere analyse van de in het muizegenoom geïntegreerde
30 lambda vectoren met behulp van zg. isoschizomere restrictie-enzymen (twee verschillende restrictieenzymen die allebei dezelfde site herkennen, behalve wanneer die gemethyleerd is) leerde dat in elke onderzochte muis de lambda vectoren volledig gemethyleerd waren. Het audioradiogram (fig.
35 4) liet zien dat DNA van transgene muis 35.5 wel door MspI, maar niet door HpaII wordt geknipt. Net als MspI

. 880 1826

herkent ook HpaII CCGG sites. Echter, indien de middelste C een methylgroep draagt is HpaII niet maar MspI wel in staat tot knippen. De conclusie is dus dat de in het muizegenoom geïntegreerde lambda vectoren sterk
5 (misschien zelfs volledig) gemethyleerd zijn. Deze conclusie werd bevestigd door resultaten, verkregen met het methyle-ringsgevoelige restrictie-enzym XhoI. Zoals fig. 4 laat zien, is dit enzym niet in staat om de band van ca. 10kb, gegenereerd door HindIII, volledig op te knippen.
10 In fig. 4 duidt M op MspI, Hp op HpaII, H op HindIII en X op XhoI.

Uit de literatuur is bekend dat de meeste bacteriestammen in staat zijn binnenkomend "vreemd" DNA onschadelijk te maken door het in stukken te knippen. De betrokken
15 enzymen laten zich daarbij leiden door bepaalde methyle-ringspatronen. Ons vermoeden dat deze zg. gastheerrestrictie wel eens de reden zou kunnen zijn voor de zeer lage packagingefficiëntie van de in het muize DNA geïntegreerde (en volledig gemethyleerde) lambda vectoren werd getest
20 door een experiment met verschillende E.coli gastheren waarvan er één helemaal niet in staat was tot gastheerrestrictie (de E.coli c stam) en anderen slechts gedeeltelijk (E.coli K12 Y1090 (MCR-A⁻, MCR-B⁺) en E.coli K12 KA802 (MCR-A⁻, MCR-B⁻). De E.coli c stam wordt normaal niet
25 gebruikt bij packaging experimenten. Er zijn bij ons weten ook geen lacZ⁻varianten van bekend. Voor onze doeleinden dient de stam lacZ⁻ te zijn teneinde mutanten als ongekleurde plaques te kunnen herkennen. Immers, als de gastheerbacteriën zelf lacZ⁺ zijn, zijn alle
30 plaques gekleurd, ook de mutanten.

De volgende procedure werd gevolgd om een E.coli c variant in handen te krijgen die lacZ⁻ is. Een voedingsbodem waarop E.coli c bacteriën waren uitgeplaat, werd gedurende 30 sec bestraald met ultravioletood licht, waarvan
35 bekend is dat het mutageen is. De voedingsbodem bevatte X-gal. De normale bacteriën (de "wild types") zullen

blauwe kolonies geven omdat bacteriën normaal gesproken een actief lacZ gen hebben. Eventuele lacZ mutanten zullen echter kleurloos zijn. Op basis van dit criterium werden met UV bestraalde bacteriën twee kleurloze kolonies
5 gevonden, die na gebruik als gastheer voor lacZ-bevattende lambda vectoren blauwe plaques gaven. Uitplaten met lambda vectoren die lacZ niet bevatten gaf slechts kleurloze plaques, hetgeen de mutante status van de nieuw gegenereerde bacteriestam bevestigde.

10 Na packagen van de in het muis DNA geïntegreerde lambda vectoren werd slechts met de E.coli c stam een groot aantal (blauwe) plaques gevonden. De hoogste efficiëntie, nl. ca. 10.000 plaques per µg totaal genomisch muis DNA, werd verkregen met transgene muizestam 20.2,
15 waarbij de vector in ca. 70 kopieën was ingebouwd. Dit is nog altijd minder dan de theoretisch haalbare packaging-efficiëntie. Echter, daarbij moet worden bedacht dat de kwaliteit van totaal genomisch DNA, geïsoleerd uit weefsels, altijd vele malen minder is dan gezuiverd
20 DNA waarop alle berekeningen zijn gebaseerd. Desalniettemin, de conclusie die uit deze serie experimenten kan worden getrokken is dat efficiënt packagen van lambda vectoren geïntegreerd in totaal genomisch DNA wel degelijk mogelijk is, echter alleen dan indien als gastheer gebruik wordt
25 gemaakt van E.coli stammen die niet tot gastheerrestrictie in staat zijn. Omdat de packagingextracten zelf ook gemaakt worden uit bacteriën is het beslist noodzakelijk om uitsluitend die extracten te gebruiken die gemaakt zijn van E.coli c stammen.
30 Uitgaande van bovengenoemde lambda-bevattende transgene muizestammen en de met E.coli c extracten en stammen behaalde packagingefficiënties is vervolgens getracht het totale aantal terug te winnen vectoren zo hoog mogelijk te maken. De beperkende factor daarbij is niet de hoeveelheid
35 beschikbaar genomisch DNA (uit bijv. een gehele lever van een muis kan gemakkelijk 2 mg DNA worden geïsoleerd),

. 8801826

maar de hoeveelheid DNA die aan een bepaalde hoeveelheid packagingextract kan worden toegevoegd. Gezien de prijs van dit commercieel verkrijgbare extract is opschaling een uiterst kostbare aangelegenheid die toepassing van in vitro packaging bij mutatieanalyses door middel van ons muizemodel commercieel onaantrekkelijk maakt.

Teneinde bovenstaande problemen te omzeilen leek het ons noodzakelijk de geïntegreerde vector(en) als het ware voor te zuiveren, zodat de verhouding vector t.o.v. overtollig muize DNA veel gunstiger wordt. Dit is niet eenvoudig, aangezien vectoren in het algemeen geen bijzondere kenmerken bezitten waarop ze preparatief kunnen worden gescheiden van zoogdier DNA. Zoals vermeld is bij de door ons bereide transgene muizen de vector in een aantal kopieën kop aan staart geïntegreerd. Wij bedachten dat t.b.v. het verhogen van de terugwinningsefficiëntie van geïntegreerde vectoren van dit fenomeen gebruik kan worden gemaakt. Indien er voor wordt gezorgd dat de geïnjecteerde vector een herkenningsplaats voor een bepaald restrictieenzym mist, zal dit bij transgene muizen en/of cellijnen resulteren in een zeer lang DNA fragment zonder de betreffende restrictiesite. Indien bijv. 30 kopieën van de vector in tandem kop aan staart zijn geïntegreerd, zal dit fragment een lengte hebben van $50.000 \times 30 = 1.500.000$ baseparen. Indien het betreffende restrictieenzym met totaal genomisch zoogdier DNA fragmenten geeft met een gemiddelde grootte van ca. 5000 baseparen zal een fragment van 1,5 miljoen baseparen hiervan gemakkelijk te scheiden zijn.

Teneinde bovengenoemde voorzuiveringsstrategie te testen en vast te stellen of knippen van totaal chromosomaal muize DNA met XbaI inderdaad resulteerde in één heel groot fragment tesamen met veel fragmenten met een gemiddelde grootte van ca. 5000 baseparen werd gebruik gemaakt van Field Inversion Gel Elektroforese (FIGE). Met behulp van deze techniek is het mogelijk DNA fragmenten

. 8801826

met een lengte tot ca. 1 miljoen baseparen goed te scheiden.

- Aldus werd ca. 100 µg totaal chromosomaal DNA uit de hersenen (en later ook uit andere organen) geknipt met 400 units Xba I onder condities zoals beschreven
- 5 door de fabrikant (BRL). Het digest werd vervolgens onderworpen aan Field Inversion Gel Electroforese (de hiertoe benodigde apparatuur was van Hoefer Scientific Instruments, P.O. Box 77387, San Francisco, CA 94107-9985) gedurende 4 uur bij 250 Volt (forward: 0.6 sec; reverse:
- 10 0.2 sec; ramp: 0.0) bij 14°C in 1 X TBE buffer (TBE= 89 mM Tris-Cl, 89 mM Boorzuur, 2 mM EDTA). Na elektroforese werd de gel gekleurd in ethidium bromide, waarna de laagmolekulaire fractie zich manifesteerde als een smeer met een gemiddelde lengte van 5 kb (zie fig.
- 15 5, laan A. Hybridisatieanalyse van dit gelpatroon met de radioactief gelabelde vector zelf als probe toonde een selecte band met een fragmentlengte van meer dan 500.000 baseparen (fig. 5, laan B). Deze band vertegenwoordigt dus de bacteriofaag lambda vectoren.
- 20 De hoog-moleculaire vector-bevattende fragmenten werden uit de gel geïsoleerd met behulp van elektroelutie, geprecipiteerd met ethanol, opgelost in TE buffer, toegevoegd aan het E.coli c packagingextract en vervolgens uitgeplaat met E.coli c als gastheer. Was het eerst mogelijk om
- 25 met behulp van 10 µl packagingextract (waarde: ca. Fl.100,-) uit ca. 1 µg totaal chromosomaal DNA van transgene muis 20.2 ca. 10.000 plaques te winnen, nu bleek dat uit ca. 100 µg totaal chromosomaal DNA van dezelfde transgene muizestam ca. 1.400.000 plaques konden worden
- 30 verkregen m.b.v. dezelfde hoeveelheid packagingextract. Een enorme besparing dus.

- Tenslotte werd de bruikbaarheid van de bereide transgene muizestammen als mutatiemodel voor het testen van potentieel carcinogene stoffen beproefd. Muizen
- 35 van de stammen 20.2 en 40.6 werden behandeld met 250 mg/kg lichaamsgewicht ENU (ethyl nitroso ureum). Na

1 week werden de behandelde dieren afgemaakt. Vervolgens werd totaal chromosomaal DNA geïsoleerd uit de lever en uit de hersenen van de behandelde en onbehandelde (controle) dieren. Na voorzuivering en packaging volgens
5 het in de uitvinding beschreven protocol resulteerde dit in de in Tabel 1 en 2 gegeven mutatiefrequenties. Daaruit blijkt dat bij onbehandelde dieren slechts één op de 50.000 plaques, gepackaged vanuit lever DNA, kleurloos was. In hersen DNA van een muis 7 dagen na behandeling
10 met ENU bleek een tienvoudige verhoging van het aantal kleurloze plaques te zijn opgetreden, in tegenstelling tot de lever waar de toename veel minder was (tabel 2). De resultaten van dit experiment sluiten zeer goed aan bij de gegevens uit de literatuur omtrent de carcinogene
15 werking van ENU. Daaruit is bekend dat ENU vrijwel uitsluitend tumoren in het zenuwstelsel veroorzaakt. In dit verband is door anderen reeds eerder aangetoond dat door ENU geïnduceerde DNA beschadigingen in de hersenen vele malen langzamer verwijderd worden dan dezelfde
20 schades in de lever (Goth en Rajewsky, 1974; DenEngelse et al., 1987). Gesuggereerd is dat deze trage verwijdering tot een relatieve overmaat aan mutaties leidt en daarmee de kans op neoplastische transformatie van hersencellen sterk vergroot. Bovenbesproken experiment is voor zover
25 ons bekend de eerste maal dat zo'n overmaat aan mutaties in hersencellen ook daadwerkelijk is aangetoond.

Uit bovenbesproken experimenten met ENU kan worden geconcludeerd dat de hier gepresenteerde uitvinding een bekend orgaanspecifiek carcinogeen feilloos identificeert
30 aan de hand van de orgaanspecifieke mutatiefrequenties zoals die reeds na 7 dagen kunnen worden vastgesteld. De betreffende hersentumoren zouden zich immers pas na één of meerdere jaren kunnen openbaren. Toepassing van de methode voor het testen van andere bekende en
35 onbekende potentiële carcinogene stoffen behoort nu tot de mogelijkheden.

. 880 1826

IV. Referentties

- Albertini, R.J. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 6617 (1982)
- Albertini, R.J. et al. Nature 316, 369 (1985)
- 5 Ames, B.N. et al. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70,2281 (1973)
- Ashby, J and Tennant, RW Mutation Res 204, 17-115 (1988)
- Den Engelse, L. et al. Carcinogenesis 8, 751 (1986)
- Dubridge, R.B. and Calos, M.P. Mutagenesis 3, 1-9 (1988)
- Glazer, P.M. et al. Proc.Natl.Acad.Sc. USA 83, 1041-1044
- 10 (1986)
- Goth, R. and Rajewsky, M.F. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 639 (1974)
- Hay A, Nature 332, 782-783 (1988)
- Hogan, B. et al. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory
- 15 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1986)
- Lehmann, A.R. Mutation Res. 150, 61-67 (1985)
- Lindenmaier, W. et al. Nucleic Acids Res. 10, 1243 (1982)
- Lohman, P.H.M. et al. Mutation Res. 181, 227-234 (1987)
- 20 Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- Palmiter, R.D. and Brinster R.L. Annu.Rev.Genet. 20, 465 (1987)
- 25 Raleigh, E.A. and Wilson, G.Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83, 9070 (1986)
- Vijg, J. and Uitterlinden, A.G. Mech.Ageing Dev. 41, 47-63 (1987)
- Zeiger E et al. Cancer Res.47, 1287 (1987)

Tabel 1. Redding van lambda-gt 10 lacZ uit totaal genomisch DNA door in vitro packaging.

transgene muis	A	B	achtergrond mutatie-frequentie
20.2	10.000	1.400.000	2×10^{-5}
34.1	250	*	*
35.5	400	100.000	*
40.6	2.000	500.000	1×10^{-5}

A: aantal plaques, verkregen na packaging van 1 µg totaal genomisch DNA uit de muizelever.

B: aantal plaques, verkregen na voorzuivering van de lambda-gt 10 lacZ vector uit 100 µg, met XbaI geknipt DNA uit de muizelever.

*: niet bepaald.

Tabel 2. Aantal mutanten, gered uit met ENU behandelde muizen (250 mg per kg lichaamsgewicht)

transgene muis	orgaan	totaal aantal geredde vectoren	aantal mutanten
20.2	lever	88.448	8
	hersenen	64.472	22
40.6	lever	119.808	1
	hersenen	13.712	8

. 8801826

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het detecteren van mutaties in een of meer markergenen, die met behulp van een vector in een zoogdiergenoom zijn geïntroduceerd, door uit cellen van het transgene zoogdier resp. uit de zoogdiercellen DNA te isoleren, uit dit DNA de vector terug te winnen, de vector in een geschikte bacteriële gastheer, die ten aanzien van ten minste één van de markergenen deficiënt is, te vermenigvuldigen, en markergen-expressie te onderzoeken, met het kenmerk, dat als bacteriële gastheer een bacteriestam wordt gebruikt die niet in staat is tot gastheer-restrictie.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat als bacteriële gastheer een Escherichia coli stam wordt gebruikt die niet in staat is tot gastheer-restrictie.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat als bacteriële gastheer een E.coli c stam wordt gebruikt.

4. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, met het kenmerk, dat het uit cellen van het transgene zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp van een restrictie-enzym dat geen knipplaats in de vector heeft, de verkregen fragmenten op basis van een geschikt criterium, zoals verschillen in grootte, te scheiden en fragmenten die de vector omvatten te verzamelen, waarna uit dit voorgezuiverde DNA de vector wordt teruggewonnen.

5. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, met het kenmerk, dat als vector een bacteriofaag vector, zoals een bacteriofaag lambda vector of een cosmide vector wordt toegepast, waarbij deze vector uit DNA wordt teruggewonnen door in vitro verpakking in faaghulzen met behulp van een faagverpakkingsextract dat verkregen is uit een bacteriestam die niet in staat is tot gastheer-restrictie.

. 8801826

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat een bacteriofaagvector met een grootte van ten minste 30 kb wordt toegepast, waarvan ten minste 10 kopieën kop-aan-staart in het zoogdiergenoom zijn geïntegreerd, en het uit cellen van het transgene zoogdier resp. de
5 zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp van een restrictie-enzym, zoals XbaI, dat geen knipplaats in de vector heeft maar een zodanig groot aantal knipplaatsen in het zoogdiergenoom
10 heeft, dat het in staat is om fragmenten met een gemiddelde grootte beneden 10 kb te genereren, de verkregen fragmenten op basis van hun verschillende grootte te scheiden en de grotere fragmenten, die de vector omvatten, te verzamelen.

7. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, met het kenmerk, dat als vector een plasmide vector, geflankeerd door voor het plasmide unieke restrictie-enzym knipplaatsen, wordt toegepast, waarbij deze vector uit DNA wordt teruggewonnen door fragmentering van het uit
cellen van het transgene zoogdier resp. de zoogdiercellen
20 geïsoleerde DNA met behulp van dit restrictie-enzym en ringsluiting.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat een plasmide vector met een grootte van ten hoogste 10 kb wordt toegepast, en het uit cellen van het transgene
25 zoogdier resp. de zoogdiercellen geïsoleerde DNA wordt voorgezuiverd door het DNA te fragmenteren met behulp van een restrictie-enzym, zoals NotI, waarvan knipplaatsen de plasmide vector flankeren maar geen knipplaats in de vector vóórkomt en een zodanig gering aantal knipplaatsen
30 in het zoogdiergenoom vóórkomt dat het in staat is om fragmenten met een gemiddelde grootte boven 20 kb te genereren, de verkregen fragmenten op basis van hun verschillende grootte te scheiden en de kleinere fragmenten, die de vector omvatten, te verzamelen.

. 8801826

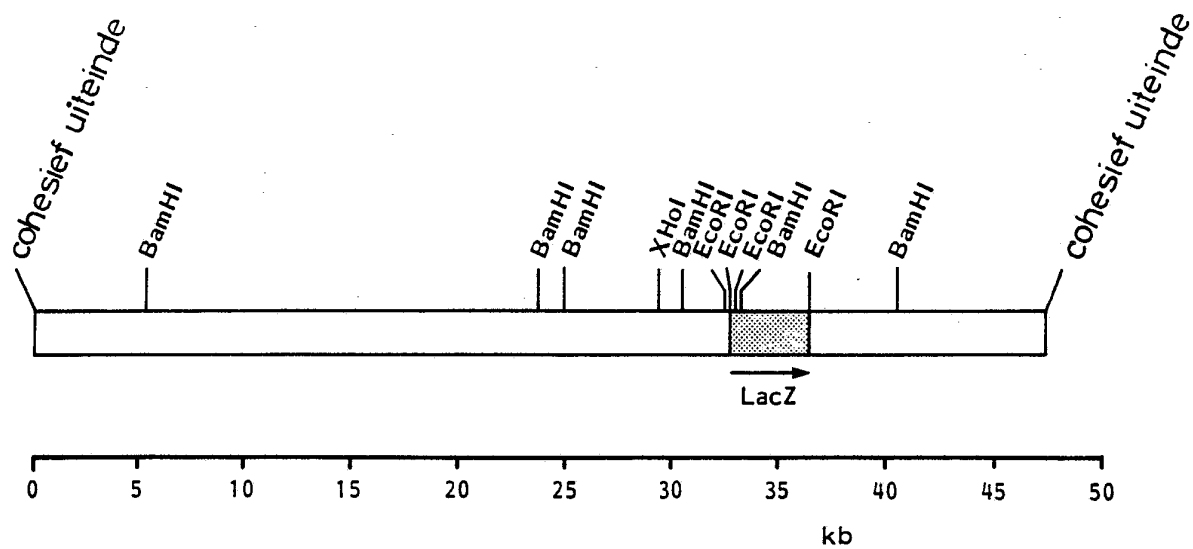
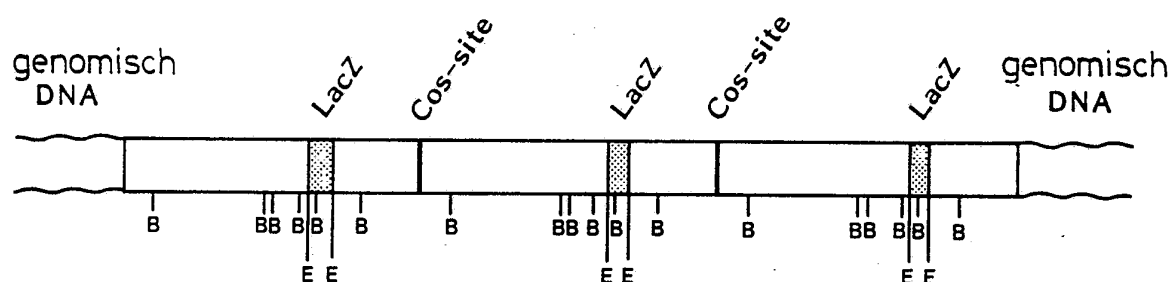


FIG.1



knippen met EcoRI of BamHI

FIG.2

. 8801826

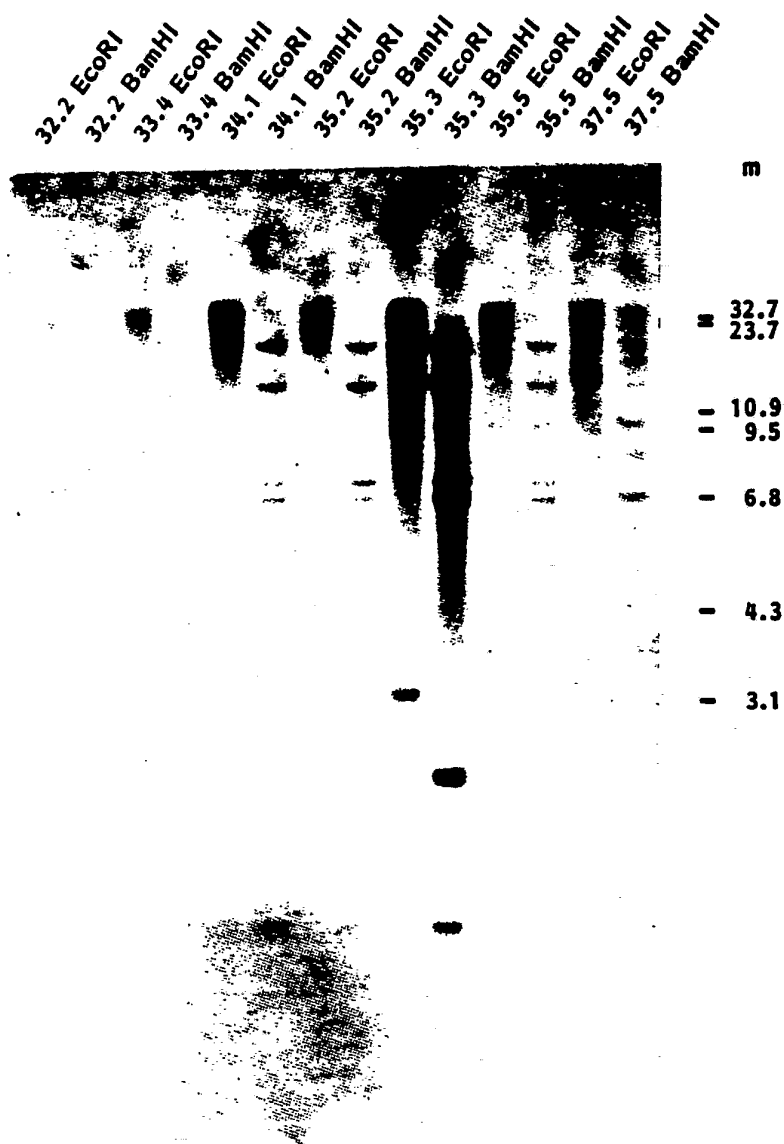


FIG.3

. 8801826

FIG.4

$\frac{x}{H}$ H $\frac{p}{H}$ $\approx$

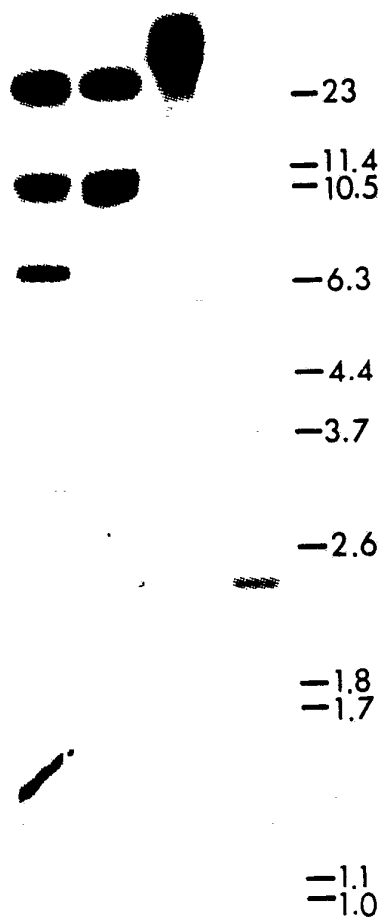


FIG.5



. 880 1826