

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 091 B

(21) A bejelentés száma: 5665/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 11. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
115 950 1987. 11. 02. US
(83) Letétbe helyezés: NRRL B-18249; NRRL B-18250

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/31

C 12 N 15/52

C 12 N 15/70

(40) A közzététel napja: 1990. 02. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991. 11. 28. SZKV 91/ 1

(72) Feltalálók:

Ingolia, Thomas Dominick, Indianapolis, Indiana (US)
Weigel, Barbara Jean, Indianapolis, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(54) **Eljárás Streptomyces lipmanii izopenicillin N szintetázt kódoló DNS
kifejező vektorok előállítására és a fehérje kifejezésére E. coliban**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás Streptomyces lipmanii IPNS aktivitás kifejezésére rekombináns E. coli gazdasejtekben, melynek során

(1) E. coli gazdasejtet, egy E. coli gazdasejtben működőképes promotort és translációs aktiváló szekvenciát és a promotor után egy Streptomyces lipmanii izopenicillin N szintetázt kódoló

DNS szekvenciát tartalmazó rekombináns DNS kifejező vektorral transzformálnak, és

(2) az (1) lépésben transzformált gazdasejtet tenyésztik.

A találmány tárgya még az IPNS-t kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó kifejező vektorok előállítása is.

HU 204 091 B

A jelen találmány olyan DNS szekvenciával foglalkozik, amely a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz aktivitású anyagot kódolja. Az izopenicillin N szintetáz azt a reakciót katalizálja, amelyben izopenicillin N keletkezik δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valinból. Ez a reakció kritikus lépés az olyan fontos antibiotikumok szintézisében, mint a penicillinek *Streptomyces lipmanii*-ből, *Aspergillus nidulans*-ből, *Penicillium chrysogenum*-ből, *Cephalosporium acremonium*-ból és *S. clavuligerus*-ből; a cephalosporinok *C. acremonium*-ból; valamint a 7 α -metoxi-cefalosporinok *S. clavuligerus*-ból és *S. lipmanii*-ből.

Az új DNS szekvenciát, amely az izopenicillin N szintetáz aktivitású anyagot kódolja, *Streptomyces lipmanii*-ből izoláljuk, és az alkalmas olyan rekombináns DNS kifejező vektorok megalkotásához, amelyek előrevizik az aktivitás kifejeződését. A jelen találmány olyan vektorokat foglal magában, amelyek az izopenicillin N szintetáz aktivitású anyag magas szintű kifejezését vizik végbe igen sokféle gazdasejtben pl. *Streptomyces*-ben, *E. coli*-ban, *Cephalosporium*-ban, *Aspergillus*-ban és *Penicillium*-ban.

Az *E. coli* által termelt izopenicillin N szintetáz aktivitású anyag azt a reakciót katalizálja, amely izopenicillin N-t képez δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valinból. A jelen találmány szerinti *E. coli* vektorokból transzformált *E. coli* gazdasejtekből nyert nyers sejtkivonatok izopenicillin N szintetáz aktivitást mutatnak. A jelen találmány szerinti *E. coli* vektorok tehát hatékony eszközt nyújtanak nagymennyiségű aktív izopenicillin N szintetáz kinyerésére. Az izopenicillin N szintetáz nem csupán az izopenicillin N termelésére használható, hanem a δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valin-től eltérő tripeptidok kondenzációjára is, hogy új antibiotikumokat lehessen képezni. Az izopenicillin N szintetáz kódoló DNS anyagok könnyen módosíthatók, hogy olyan kifejező vektorokat alkossunk meg, amelyek növelik az antibiotikum fermentációk hatékonyságát és kitermelését, beleértve olyan törzsek fermentálását, mint az *Aspergillus nidulans*, *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium chrysogenum*, *Streptomyces clavuligerus* és *S. lipmanii*. Bár a jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz kódoló DNS-t *S. lipmanii*-ből izoláljuk, a jelen DNS anyagokat alkalmazhatjuk olyan vektorok megalkotására, amelyek előrevizik az izopenicillin N szintetáz aktivitás kifejezését gazdasejtek széles választékában, amint ezt a jelen találmány szerinti *E. coli* vektorok illusztrálják. Minden olyan organizmusnál, amely penicillineket és cefalosporinokat termel, úgy véljük, hogy a közös δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valin prekursor és izopenicillináz N-t alkalmaz. Ennek megfelelően a jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz kódoló DNS anyagokat lehet alkalmazni olyan vektorok kialakítására, amelyek alkalmasak a fermentációk hatékonyságának és kitermelésének javítására, bármilyen nemzetségbe tartozó penicillin- és cefalosporin antibiotikum-termelő organizmusokról legyen szó.

A jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz-

kódoló DNS anyag *Streptomyces lipmanii* genomális DNS-ből származik, és együtt izoláljuk azzal a transzkripció és transláció aktiváló szekvenciával, amely szabályozza az izopenicillin N szintetáz kódoló genomális DNS kifejeződését. A jelen találmány magában foglalja ezt az új transzkripció és transláció aktiváló szekvenciát, amelyet arra használhatunk, hogy elősegítse gének kifejeződését *Streptomyces*-ben, elsősorban *S. lipmanii*-ban, és rokon organizmusokban.

A jelen találmány magában foglalja az izopenicillin N szintetáz gén szabályozó szignáljait is, amelyek a gén kódoló területe kódoló szálának 3' végén helyezkednek el. Ezek a 3' szabályozó szekvenciák kódolják a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz gén transzkripció-terminációs mRNS poliadenilező és feldolgozó szignáljait. Ezeknek a szignáloknak a jelenléte megfelelő helyen (a kifejezendő gén kódoló területe kódoló szálának 3' végénél) egy kifejező vektorban növeli a vektor által kódolt termék kifejezését.

Az alábbi fejezetek a jelen találmány részletesebb leírását nyújtják. Abból a célból, hogy a leírás világosabb legyen és segítsünk a találmány részletes leírásának megértésében, ahogyan itt leírjuk és igénypontokban foglaljuk, az alábbi fogalmakat kell meghatározunk.

2cis — két cisztron translációs aktiváló szekvencia

Antibiotikum — olyan, mikroorganizmusok által termelt anyag, amely vagy természetes állapotában, vagy korlátozott kémiai módosítás után gátolja más mikroorganizmusok vagy eukarióta sejtek növekedését, vagy elpusztítja ezeket.

Antibiotikum bioszintetizáló gén — DNS szegmens, amely olyan aktivitást kódol, amely primer metabolitok antibiotikumokká való átalakításának eljárásában szükséges.

Antibiotikum — termelő organizmus — bármilyen organizmus, beleértve (de nemcsak ezekre korlátozva) az *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Monospora*, *Cephalosporium*, *Penicillium* és *Nocardia* nemzetség tagjait, amely vagy valamilyen antibiotikumot termel, vagy olyan gént tartalmaz, amely, ha kifejeződik, antibiotikumot termelhet.

Antibiotikum rezisztencia átvad gén — DNS szegmens, amely olyan aktiválást kódol, amely rezisztenciát ad át valamely antibiotikummal szemben.

ApR — az ampicillin rezisztencia átvad gén c1857 — a lambda bakteriológ cI represszor génjének hőmérséklet-érzékeny mutáns allélje.

Klónozás — egy DNS szegmens beépítésének folyamata egy rekombináns DNS vektorba.

Genom könyvtár — olyan rekombináns DNS klónozó vektorok készlete, amelybe DNS szegmensek — amelyek lényegében az adott organizmus teljes genomját képviselik — vannak klónozva.

HmR — a higromicin B rezisztencia átvad gén.

Hibridizálás — két homológ egyszálú DNS molekula összeforrasztásának folyamata abból a célból, hogy kétszálú DNS molekulát képezzenek, amely lehet teljesen bázispárokba rendezett, de lehet hogy nem az.

IPS vagy IPNS — izopenicillin N szintetáz; a szövegszefüggéstől függően utalhat a fehérjére vagy a fehérjét kódoló DNS-re.

Izopenicillin N szintetáz — enzim, amely cikláz-ként is ismert, és amely az izopenicillin N képződését katalizálja δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valinból.

MCS — többszörös klónozó hely.

mRNS — hírvivő (messenger) ribonukleinsav.

pL vagy λ pL — a lambda bakteriofág baloldali promotora.

Rekombináns DNS klónozó vektor — bármilyen autonóm módon replikálódó vagy integrálódó objektum, beleértve, de nemcsak ezekre korlátozva, a plazmidokat, amely olyan DNS molekulát tartalmaz, amelyhez egy vagy több további DNS molekula van hozzáadva vagy lehet hozzáadni.

Rekombináns DNS kifejező vektor — bármilyen autonóm módon replikálódó vagy integrálódó objektum, beleértve, de nemcsak ezekre korlátozva, a plazmidokat, amely egy transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciát tartalmaz úgy elhelyezve, hogy elősegítse egy olyan DNS szegmens kifejeződését, amely kutatási vagy kereskedelmi szempontból érdekes polipeptidet vagy RNS-t kódol.

Rekombináns DNS vektor — bármilyen rekombinán sDNS klónozó vagy kifejező vektor.

Restrikciós fragmentum — bármilyen leneáris DNS molekula, amely egy vagy több restrikciós enzim tevékenységével alakult ki.

Érzékeny gazdasejt — gazdasejt, amely nem képes nőni egy adott antibiotikum jelenlétében egy olyan DNS szegmens nélkül, amely rezisztenciát visz át az adott antibiotikum ellen.

sIPNS — *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz-kódoló DNS-e.

S. lip DNS — *Streptomyces lipmanii*-ből származó DNS.

TcR — a tetraciklin rezisztencia átvadó gén.

Transzkripció aktiváló szekvencia — DNS szekvencia, pl. promotor, amely elősegíti a DNS átírását.

Transzformáns — befogadó gazdasejt, amely transzformáláson ment keresztül.

Transzformálás — DNS bevezetése valamely befogadó gazdasejtbe, amely megváltoztatja a genotípust és változást eredményez a befogadó sejtben.

Transzlációs aktiváló szekvencia — DNS szekven-

cia, pl. riboszóma-kötő helyet kódoló szekvencia — DNS szekvencia, pl. riboszóma-kötő helyet kódoló szekvencia, amely mRNS-sé átíródva elősegíti az mRNS transzlációját fehérjévé.

A mellékelt ábrák közül az 1–4. ábrákban bemutatott restrikciós hely- és működési térképek az itt tárgyalt rekombináns DNS vektorok hozzávetőleges ábrázolásai. A restrikciós helyek térközei a térképen arányosak a vektoron levő restrikciós helyek tényleges térközeivel, de a megfigyelt restrikciós hely távolságok valamelyest eltérhetnek a számított térkép-távolságoktól. A restrikciós hely információ nem teljesen kimerítő; ennek megfelelően egy vektoron több adott típusú restrikciós hely is lehet, mint amennyit ténylegesen bemutatunk a térképen.

1. ábra: A OGO0239 plazmid restrikciós hely- és működési térképe

2. ábra: A pOGO0246 plazmid restrikciós hely- és működési térképe

20 3. ábra: a pCZR111 plazmid restrikciós hely- és működési térképe

4. ábra: A pOGO249 plazmid restrikciós hely- és működési térképe

25 A jelen találmány olyan DNS vegyületeket és rekombináns DNS klónozó és kifejező vektorokat foglal magában, amelyek kódolják a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz aktivitását. A *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz-kódoló DNS-t az alábbiakban ábrázoljuk a DNS-nek egy olyan részével együtt, amely szegélyezi a kódoló terület 3' és 5' végeit a *S. lipmanii* genomában. Az ábrázolásban a kettős szálú DNS molekulának csak az „értelmetlen” (nonsense) vagy kódoló szálát mutatjuk be.

30 A nukleotid szekvenciát számozzuk; a számok a DNS szekvencia fölött vannak feltüntetve. Közvetlenül a DNS szekvencia minden egyes vonala alatt a DNS által kódolt izopenicillin N szintetáz aminosav-gyök szekvenciája fel van sorolva balról jobbra az aminosav-terminális $\rightarrow$ karboxi-terminális irányban. Az egyes aminosav-gyökök az alatt a DNS alatt vannak feltüntetve, amely kódolja ezeket. Az aminosav-gyök szekvenciát számozzuk; a számok az aminosav-gyök szekvencia alatt vannak feltüntetve. A transzlációs iniciációs kodon első DNS gyökét 1. számmal látjuk el; a negatív számok a távolságra utalnak bp-ben (bázispár) a transzlációs iniciációs helytől fölfelé (zérót nem használunk).

A *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz kódoló DNS
szekvencia és a megfelelő aminosav szekvencia

	-40		-20	
5'-GCAAGACACCGCACGCCATGTCCAGCGCCACGCCTGGCGCACACTCCACGGAGGATGCC				
1	20	40	60	
ATGCCTGTCTGATGGCGTCGGCCGACGTGCCGACGATCGACATCTCCCCCTGTTCTGGG				
MetProValLeuMetProSerAlaAspValProThrIleAspIleSerProLeuPheGly				
1	10	20		
	80	100	120	
ACCGACCCGGACGCCAAGGCGCACGTCGCGCGGCAGATCAACGAGGCCTGCCGCGGTTCTG				

A *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz kódozó DNS
szekvencia és a megfelelő aminosav szekvencia

ThrAspProAspAlaLysAlaHisValAlaArgGlnIleAsnGluAlaCysArgGlySer		
30	40	
140	160	180
GGCTTCTTCTACGCCTCCACACGGCATCGACGTGCGGCGGCTGCAGGACGTGGTCAAC		
GlyPhePHeTyrAlaSerHisHisGlyIleAspValArgArgLeuGlnAspValValAsn		
50	60	
200	220	240
GAGTTCCACCGGACCATGACCGACCAGGAGAAGCACGACCTGGCGATCCACGCGTACAAC		
GluPheHisArgThrMetThrAspGlnGluLysHisAspLeuAlaIleHisAlaTyrAsn		
70	80	
260	280	300
GAGAACAACTCGCATGTGCGCAACGGTTATTACATGGCCCCCGGCCGGAAGACCGTC		
GluAsnAsnSerHisValArgAsnGlyTyrTyrMetAlaArgProGlyArgLysThrVal		
90	100	
320	340	360
GAGTCCTGGTGCTACCTGAACCCGTCGTTCCGGCGAGGACCAACCGATGATCAAGGCCGGG		
GluSerTrpCysTyrLeuAsnProSerPheGlyGluAspHisProMetIleLysAlaGly		
110	120	
380	400	420
ACGCCGATGCACGAGGTGAACGTCTGGCCGGACGAGGAACGCCATCCGGACTTCCGGTCC		
ThrProMetHisGluValAsnValTrpProAspGluGluArgHisProAspPheArgSer		
130	140	
440	460	480
TTCGGCGAGCAGTACTACCGCGAGGTGTTCCGGCTCTCGAAGGTGCTGCTGCTGCGGGC		
PheGlyGluGlnTyrTyrArgGluValPheArgLeuSerLysValLeuLeuLeuArgGly		
150	160	
500	520	540
TTCGCGCTGGCGCTCGGCAAGCCGGAGGAGTTCTTCGAGAACGAGGTCACCGAGGAGGAC		
PheAlaLeuAlaLeuGlyLysProGluGluPhePheGluAsnGluValThrGluGluAsp		
170	180	
560	580	600
ACCCTCTCCTGCCGATCTCTGATGATCCGGTACCCGTACCTGGATCCGTACCCGGAAGCG		
ThrLeuSerCysArgSerLeuMetIleArgTyrProTyrLeuAspProTyrProGluAla		
190	200	
620	640	660
GCGATCAAGACGGGCCCCGGACGGCACCAGGCTCAGCTTCGAGGACCACCTCGACGTGTGC		
AlaIleLysThrGlyProAspGlyThrArgLeuSerPheGluAspHisLeuAspValSer		
210	220	
680	700	720
ATGATCACCGTCTGTTCAGACCGAGGTGCAGAACCTCCAGGTCGAGACGGTGGACGGG		
MetIleThrValLeuPheGlnThrGluValGlnAsnLeuGlnValGluThrValAspGly		
230	240	
740	760	780
TGGCAGAGCCTGCCGACGTCCGGGGAGAACTTCCTGATCAACTGCGGCACCTACCTCGGG		
TrpGlnSerLeuProThrSerGlyGluAsnPheLeuLeuAsnCysGlyThrTyrLeuGly		
250	260	
800	820	840
TACCTACGAACGACTACTTCCCGGCCCCCAACCACCGGGTCAAGTACGTCAACGCGGAA		
TyrLeuThrAsnAspTyrPheProAlaProAsnHisArgValLysTyrValAsnAlaGlu		
270	280	
860	880	900
CGCCTGTCCCTGCCGTTCTTCTCCACGCCGGGCAGAACAGCGTGATGAAGCCGTTCCAC		
ArgLeuSerLeuProPhePheLeuHisAlaGlyGlnAsnSerValMetLysProPheHis		
290	300	
920	940	960
CCGGAGGACACCGGCGACCGGAAGCTCAACCCGGCCGTACGTACGGGGAGTACCTGCAA		

A *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz kódozó DNS
szekvencia és a megfelelő aminosav szekvencia

ProGluAspThrGlyAspArgLysLeuAsnProAlaValThrTyrGlyGluTyrLeuGln	
310	320
980	1000
GAGGGCTTCCACGCGCTGATCGCGAAGAACGTCCAGACCTGAGCAATCGTCAAACCTGTGA	1020
GluGlyPheHisAlaLeuIleAlaLysAsnValGlnThr	
330	
1040	1060
GCTGGTGAAGGAGCTTGCCGGGCACAGCGTGGTGCCCGGCGG-3'	

ahol A jelentése dezoxi-adenil, C jelentése dezoxi-citidil, G jelentése dezoxi-guanin, T jelentése timidil csoport, míg ALA jelentése alanin gyök, ARG jelentése arginin gyök, ASN jelentése aszparagin gyök, ASP jelentése aszparaginsav gyök, CYS jelentése cisztein gyök, GLN jelentése glutamin gyök, GLU jelentése glutaminsav gyök, GLY jelentése glicin gyök, HIS jelentése hisztidin gyök, ILE jelentése izoleucin gyök, LEU jelentése leucin gyök, LYS jelentése lizin gyök, MET jelentése metionin gyök, PHE jelentése fenilalanin gyök, PRO jelentése prolin gyök, SER jelentése szerin gyök, THR jelentése treonin gyök, TRP jelentése triptofán gyök, TYR jelentése tirozin gyök, és VAL jelentése valin gyök.

Azok, akik a szakterületen jártasak, felismerik, hogy a fentebb ábrázolt DNS szekvencia fontos része a jelen találmánynak. A genetikai kód degenerált természetűe következtében, amely annak eredménye, hogy a legtöbb aminosavhoz és a stop szignálhoz egy-nél több kodon tartozik, az izopenicillin N szintetáz fentebb ábrázolt aminosavgyök szekvenciáját különböző DNS szekvenciák sokasága kódolhatja. Mivel ezek a változó DNS szekvenciák ugyanazt az aminosavgyök szekvenciát kódolhatják, mint a jelen találmány szerinti szekvencia, a jelen találmány magában foglalja ezeket a változó szekvenciákat is.

Ezek az IPNS kódozó szekvenciák hagyományos módon szintetizálhatók a módon szintetizálhatók a módosított foszfortriészter módszerrel, teljesen védett dezoxiribonukleotid építőblokkokat alkalmazva. Az ilyen szintetikus módszerek jól ismertek a szakirodalomban és lényegében összhangban vannak Itakura és munkatársai eljárásával [Science, 198, 1056 (1977)], valamint Crea és munkatársai eljárásával [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)]. A DNS szintetizálásának egy különösen előnyös módszerét ismertetik Hsiung és munkatársai [Nucleic Acid Research, 11, 3227 (1983)], valamint Narang és munkatársai [Methods in Enzymology, 68, 90 (1980)]. A fentebb idézett manuális módszereken kívül a DNS szekvenciát lehet szintetizálni automatizált DNS szintetizáló berendezést alkalmazva, pl. Systec 1450A vagy ABS 380A DNS szintetizáló berendezést.

A fentebb tárgyalt IPNS kódozó DNS szekvenciákon kívül a jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz kódozó DNS-nek lehetnek genetikai variánsai is. Ezek a genetikai variánsok lényeges DNS- és

aminosav gyök szekvencia homológiával bírhatnak a jelen találmány szerinti vegyületekkel és hasonló, ha nem éppen azonos, aktivitással rendelkezhetnek, bár nukleotid szekvenciájukban valamelyest különböznek a jelen leírásban megadott, bemutatás célját szolgáló vegyületektől. Ezek a genetikai variánsok ekvivalensek a jelen találmány szerinti vegyületekkel, és a jelen találmány IPNS kódok DNS szekvenciáival való homológia alapján kaphatók meg.

A jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz aktivitást kódozó DNS vegyületeket a *Streptomyces lipmanii* egyik törzséből izoláljuk. A *S. lipmanii* teljes genomális DNS-ének genom könyvtárát alkotjuk meg és vizsgáljuk át olyan szekvenciák jelenlétére, amelyek homológok egy dezoxiribonukleotid vizsgáló mintával. Ezt a vizsgáló mintát azzal az információval összhangban alkotjuk meg, amelyet a *S. lipmanii* aminosav terminális aminosav szekvenciájáról kaptunk, figyelembe véve a genetikai kóddal kapcsolatos ismereteket, és azokat az ismereteket, amelyek a *Streptomyces*ben előnyösen felhasználható kodonokra vonatkoznak. A genom könyvtár vektoraiából sokról azonosítjuk, hogy közel homológok ehhez a dezoxiribonukleotidhoz. A DNS szekvenciaelemzés feltárja, hogy ezek közül mely vektorok kódolják a *S. lipmanii* izopenicillin N szintetázát.

A *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz gént azután egy másik vektorba klónozzuk, hogy létrehozzuk a pOGO239 plazmidot, amelyet *E. coli* K12 JM109 gazdasejbe transzformálunk. Az *E. coli* K12 JM109/pOGO239 transzformáns deponáltuk, ez részét képezi a Northern Regional Research Laboratories (NRRL) törzsgyűjteményének (Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604) NRRL B-18250 deponálási számon (a deponálás napja: 1987. augusztus 11.). A pOGO239 plazmid restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül az 1. ábra mutatja be.

A pOGO239 plazmidot az *E. coli* K12 JM109/pOGO239-ből az 1. példában leírt eljárással izolálhatjuk. A pOGO239 plazmid szolgál hasznos kiindulási anyagnak a jelen találmány vektoraihoz. A pOGO239 plazmid tartalmazza az ép *Streptomyces lipmanii* IPNS gént, amelyet a plazmidból egy ~ 2,8 kb SalI restrikciós fragmetumban izolálhatunk. A pOGO239 alkalmazható kiindulási anyagnak egy olyan, pOGO249-nek nevezett plazmid megalkotásában, amely

izopenicillin N szintetáz magas szintű kifejeződését segíti elő *E. coli*-ban. Abból a célból, hogy megkönnyítsük az *S. lipmanii* IPNS kódoló szekvencia manipulációját, valamint a natív *Streptomyces* promotor szekvencia bármiféle manipulációját, egy *NdeI* restrikciós enzim felismerő szekvenciát alkotunk meg a *S. lipmanii* IPNS DNS kódoló szekvencia -3+3 helyénél.

Az *NdeI* hely megalkotását M13 helyre irányuló mutagenézis technikákkal hajtjuk végre, ez magában foglalja a DNS bázisok kicserélését -1—3 között GCC-ről CAT-re. Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy a DNS mutagenézis technikát általában akkor használják, ha DNS szekvenciákban restrikciós enzim felismerő helyeket akarnak bevezetni, és hogy ebben az esetben a kódolt aminosavszekvencia nem változik meg. A mutagenézist és a köztes konstrukciókat nagyobb részletességgel írjuk le a 2-4. példákban. Az így létrejövő plazmid, amelyet pOGO246-nak nevezünk és nagyobb részletességgel a 4. példában írunk le, a pOGO239 plazmidthól csupán a *NdeI* restrikciós enzim hely jelenlétében különbözik. A pOGO246 plazmid restrikciós hely- és működési térképet a mellékelt ábrák közül a 2. ábra mutatja be. A p-OGO246 köztes plazmidot alkalmazzuk azután a pOGO249 kifejező vektor megalkotására. A pOGO249 plazmidot az 5. példában írjuk le részletesebben. A pOGO249 plazmid restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 4. ábra mutatja be.

A pOGO249 plazmidot úgy alkotjuk meg, hogy a *Streptomyces lipmanii* IPNS kódoló szekvenciát beiktatjuk a pCZR 111 plazmidba, ez olyan kifejező vektor, amely tartalmazza a lambda pL transzkripció és transláció aktiváló szekvenciát, a c1857 hőmérséklet-érzékeny represszor gént, egy tetraciklin rezisztencia átadó gént, és olyan DNS szekvenciákat, amelyek vektor replikációs funkciókat kódolnak. A pCZR111 plazmidban jelen levő hőmérséklet-indukálható kifejező rendszer típusának alkalmazását a 0217529 sorozatszámú európai szabadalmi közzételti irat írja le, amelyet 1987. április 8-án publikáltak. Ennek lényege az, hogy alacsony hőmérsékleten, vagyis mintegy 30 °C hőmérsékleten a c1857 gén-termék elfojtja a pL promotor által elősegített transzkripciót; amikor azonban a hőmérsékletet ~42 °C-re emeljük, a c1857 géntermék inaktíválódik és a pL promotor aktívvá válik. A pCZR111 plazmid az NRRL-nél NRRL B-18249 számon rendelkezésre áll (a deponálás dátuma 1987. augusztus 11). A pCZR111 plazmid restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 3. ábra mutatja be.

A pOGO249 plazmid tartalmazza a lambda pL promotert, és tartalmaz egy 2-cisztron transláció aktiváló szekvenciát úgy elhelyezve, hogy elősegítse a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz gén fehérje-kódoló szekvenciájának kifejeződését. 2-cisztron konstrukciókat írnak le általában Schoner és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 5403-5407 (1984), valamint Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8506-8510 (1986)]. Az IPNS kódoló szekvencia, amelyet a pOGO249 plazmid tartalmaz, a pOGO246 plazmid

~1,2 kb-s *NdeI*-*BamHI* restrikciós fragmentumából ered.

Mintegy 42 °C hőmérsékleten az *E. coli* K12 JM109/pOGO249 sejtek magas szinten fejnek ki izopenicillin N szintetázt, ez megközelíti a teljes sejtféherje 25%-át. Az ezekből az *E. coli* K12 JM109/pOGO249 transzformánsokból nyert nyers sejtkivonatok képesek katalizálni a δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valin átalakulását izopenicillin N-né, míg a nem transzformált *E. coli* K12 JM109 sejtek nem képesek katalizálni ezt az átalakulást. Az átalakítási reakció meghatározására szolgáló módszert a 6. példában írjuk le.

A pOGO249 plazmid hatékony eszközt nyújt nagymennyiségű izopenicillin N szintetáz termelésére *E. coli*-ban. Mivel a pOGO249 plazmidot tartalmazó *E. coli* transzformánsok olyan szinten fejnek ki izopenicillin N szintetázt, amely a teljes sejtféherje 25%-át közelíti meg, és mivel az *E. coli* tenyésztése kevésbé komplex, mint azoknak az organizmusoknak a tenyésztése, amelyek természetes módon termelnek izopenicillin N szintetázt, az *E. coli*/pOGO249 transzformánsokat hatékonyabban és gazdaságosabban lehet alkalmazni rekombináns izopenicillin N szintetáz termelésére, mint a nem-rekombináns vagy „természetes” izopenicillin N szintetáz termelő törzseket. A jelen találmány szerinti *E. coli* K12/pOGO249 transzformánsok az ilyen magas szintű izopenicillin N szintetáz termelésük révén lehetővé teszik a *Streptomyces lipmanii* genomban kódolt izopenicillin N szintetáz izolálását lényegében tiszta formában. Az IPNS-re tisztítási munkamenet található az alábbi irodalmi helyen: Pang és munkatársai: Biochem. J. 222, 789-795 (1984).

Az izopenicillin N szintetázt izopenicillin N előállítására lehet alkalmazni δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valinból sejtmentes rendszerben, amint ezt a 6. példában leírjuk. Az izopenicillin N nemcsak hasznos antibiotikum, hanem az olyan fontos antibiotikumok előállításának kiindulási terméke, mint a penicillin N, a cefalexin és más cefalosporinok, amint azt a 4.307.192 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban leírják. Az izopenicillin N szintetáznak egy másik fontos alkalmazása δ -(L- α -amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valintól eltérő tripeptid-kondenzálása új β -laktám származékokból.

A penicillin-termelő organizmusok sejtmentes kivonatait lehet alkalmazni nem természetes (a természetben elő nem forduló) β -laktámok szintézisére. A jelen találmány szerinti *E. coli* kifejező vektorok nem drága és hatékony módszert nyújtanak izopenicillin N szintetáz nyerésére, mind nyers sejtkivonat formájában, mind lényegében tiszta formában, amelyet in vitro lehet alkalmazni olyan tripeptid-kondenzálására, amelyek a természetben nem fordulnak elő, ilyen formában képezve új antibiotikumokat vagy antibiotikum vázszerkezeteket.

A pOGO249 plazmid különösen előnyös IPNS kifejeződésének elősegítésére, nem csupán az elért nagy kifejeződési szint miatt, amelyet akkor érünk el, ami-

kor ezt a plazmidot alkalmazzuk, hanem a plazmid jelen levő szelektálható marker miatt is. Sok rekombináns DNS vektor kódol valamely β -laktamázt, úgy, hogy az ilyen vektorokkal transzformált sejtek képesek nőni bizonyos β -laktám antibiotikumok, pl. ampicillin jelenlétében. Ha azonban valaki IPNS-t tartalmazó megalkotása céljából, nem kívánhatja, hogy a kivonat β -laktamáz aktivitást tartalmazzon. Így a pOGO249 plazmid nem kódol β -laktamázt szelektálható markerként, hanem e helyett tetraciklin rezisztencia átadó gént kódol, amelynek gén-terméke nem reagál β -laktámokkal.

A jelen találmány IPNS kifejező vektorai nem korlátozódnak egy adott szelektálható markerra. Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy sok szelektálható marker alkalmas IPNS kifejező vektorokhoz való alkalmazásra. Az ilyen szelektálható markerek között találjuk azokat a géneket, amelyek kanamicin rezisztenciát adnak át, pl. a tn903-ban levő szelektálható marker, és azokat a géneket, amelyek klóramfenikol rezisztenciát adnak át, pl. a pACYC184 és pBR325 plazmidokban levő szelektálható marker.

A jelen találmány vektorai magukban foglalják azokat a vektorokat, amelyek IPNS kifejezését segítik elő β -laktám termelő organizmusokban. Nyilvánvaló okokból a β -laktamáz gént nem előnyös szelektálható markerként alkalmazni β -laktám-termelő mikroorganizmusokban. A β -laktamáz gén viszont jelen lehet a jelen találmány vektoraiban, amelyeket β -laktám-termelő organizmusokban, pl. *Penicillium*-ban vagy *Cephalosporium*-ban való alkalmazásra szánnak, egyszerűen *E. coli*-ban szelektálható markerként való használhatósága miatt. Sok, β -laktám-termelő organizmusokhoz tervezett vektort alkotunk meg úgy, hogy replikálódjanak *E. coli*-ban a plazmid-előállítás megkönnyítésére. Bizonyos β -laktám termelő organizmusok, pl. *C. acremonium*, eukarióta sejtek, de a pBR322-ből származó prokarióta β -laktamáz gén, úgy tűnik, működik bizonyos eukarióta gazdasejtekben [lásd Marczynski és Jaehning: *Nuc. Acids. Res.* 13(23) 8487-8506 (1985); és Breunig és munkatársai; *Gene*, 20, 1-10 (1982)]. Abból a célból, hogy elkerüljük egy β -laktamáz gén bevezetésének lehetőségét, amely gén vélhetően képes kifejeződni egy transzformált organizmusban, hogy nagyobb β -laktám-termelő képességéhez jussunk, a jelen találmány tartalmaz olyan vektorokat is, amelyek a β -laktám-laktamáz géntől eltérő szelektálható markert hasznosítanak, pl. klóramfenikol acetyl-transzferáz kódoló gént.

Amint fentebb leszögeztük, a β -laktamáz géntől eltérő szelektálható markert hasznosítanak, pl. klóramfenikol acetyl-transzferáz kódoló gént.

Amint fentebb leszögeztük, a β -laktamáz gén általában nem alkalmas szelektálható markerként való felhasználásra penicillin- vagy cefalosporin antibiotikum-termelő organizmusokban, pl. *Cephalosporium acremonium*, *Penicillium chrysogenum*, *Streptomyces clavuligerus* vagy *Aspergillus nidulans* organizmusokban, és ezek az organizmusok endogén β -laktamázt

sem kódolnak. Több *E. coli* törzs azonban, még azok is, amelyek érzékenyek β -laktámokra, kódolnak és kifejeznek — alacsony szinten — egy exogén β -laktamázt, azaz az *E. coli* ampC génterméket lásd Juarin és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 4897-4901 (1981), valamint Grundström és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 79, 1111-1115 (1982). Az ampC géntermék jelenléte IPNS-t tartalmazó rekombináns *E. coli* sejtek nyers sejt kivonataiban az ezzel az extraktummal készített β -laktámok elbomlásához vezethet. Hogy ezt a bomlást elkerüljük, *E. coli* K12 RV308-ot mutagenézisnek vetünk alá, hogy az *E. coli* K12 A85892-nek nevezett törzset kapjuk meg, amely nem fejez ki β -laktamáz aktivitást (hacsak az aktivitás nem kódolódik egy, a sejtben jelen levő rekombináns vektorban). Az *E. coli* K12 A85892 a Northern Regional Research Center-től szerezhető be, ahol ez az NRRL B-18096 letéti számon található (a deponálás dátuma; 1986. augusztus 8.).

A kutatás olyan nem természetes tripeptidek irányában, amelyek szubsztrátumként szolgálnak az izopenicillin N szintetázhoz, kiegészülhet a kutatással olyan mutáns izopenicillin N szintetázok irányában, amelyek elfogadnak nem természetes tripeptideket szubsztrátumként. A jelen találmány szolgáltat ilyen kiindulási anyagot a kutatáshoz mutáns izopenicillin N szintetázhoz. Az *E. coli* a legjobb gazdaszervezet a mutációs klónozó kísérletekhez, és a jelen találmány szerinti *E. coli* kifejező vektorok könnyen mutálhatók olyan eljárásokkal, amelyek jól ismertek a szakterületen; ilyenek pl. a besugárzásos kezelés (Röntgen vagy UV) vagy kezelés kémiai mutagénnel (pl. etil-metánszulfonát, nitrozo-guanidin vagy metil-metánszulfonát), vagy hely-specifikus mutagenézis; az eljárások célja olyan mutáns enzimek létrehozása, amelyek nem természetes tripeptideket ismernek fel szubsztrátumként és katalizálják ezeknek a nem természetes tripeptideknek a kondenzálását nem természetes β -laktámokká.

A jelen találmány nem korlátozódik az itt példaként felhozott adott vektorokra. A jelen találmány DNS vegyületei a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz aktiválását kódolják és alkalmazhatók homológ DNS vegyületek izolálására más *Streptomyces* törzsekből, amely DNS vegyületek a jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz genetikai változatait kódolják. Következésképpen a jelen találmány olyan DNS vegyületeket is magában foglal, amelyek homológok a pOGO239, pOGO246 és pOGO249 plazmidokban található, izopenicillin N szintetáz kódoló DNS-sel és maguk is kódolnak izopenicillin N szintetáz aktivitást.

Ezenkívül a jelen találmány DNS vegyületei alkalmazhatók olyan kifejező vektorok megalkotására, amelyek izopenicillin N szintetáz kifejeződését segítik elő bármiféle gazdasejtben. Ezeket a vektorokat úgy alkothatjuk meg bármiféle gazdasejthez, hogy olyan elemeket választunk ki, amelyek működőképesek a kiválasztott gazdasejtben. Az ilyen elemek kódolhatnak vektor replikációs aktiváló szekvenciát, hogy elősegít-

sék az izopenicillin N szintetáz aktivitást.

A jelen találmány E. coli kifejező vektorai nem korlátozódnak az itt példaként felhozott, adott vektorokra. A jelen találmány magában foglal minden olyan E. coli kifejező plazmidot vagy vektort, amely elősegíti az izopenicillin N szintetáz kifejeződését E. coliban. Így a jelen találmány magában foglal olyan kifejező vektorokat, amelyek elősegítik az izopenicillin N szintetáz kifejeződését és egy E. coliban működőképes replikont hasznosít, pl. egy „szabaduló” (runaway) replikont, vagy egy replikont a pBR322, pACYC184, F, ColV-K94, R1, R6-5 vagy R100 plazmidokvalamelyikéből. A jelen találmány nem csupán plazmid vektorokra korlátozódik, hanem a jelen találmány tartalmaz olyan kifejező vektorokat is, amelyek izopenicillin N szintetáz aktivitást fejeznek ki, és integrációs vagy virális replikációt hasznosítanak, hogy replikációt és fenntartást biztosítsanak a gazdasejtben.

A jelen találmány nem korlátozódik egy adott transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciára, amely elősegíti az izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS kifejeződését. A jelen találmány magában foglalja bármiféle transzkripció és transzláció aktiváló szekvencia alkalmazását az izopenicillin N szintetáz kifejezéséhez E. coliban. Több E. coliban működőképes transzkripció és transzláció aktiváló szekvencia is ismeretes és alkalmas izopenicillin N

szintetáz aktivitás kifejezésének elősegítésére E. coliban. Az ilyen transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciák között találjuk (de nemcsak ezekre korlátozódnak) az lpp, lac, trp, tac, λP_L és λP_R transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciákat.

A különböző, itt példaként felhozott E. coli replikációs origókon és transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciákon kívül más organizmusokból származó replikonokat és transzkripció és transzláció aktiváló szekvenciákat is lehet ligálni a jelen izopenicillin N szintetáz kódoló DNS vegyületekhez, hogy kifejező vektorokat képezzünk, amelyek elősegítik az izopenicillin N szintetáz aktivitás kifejezését olyan gazdasejtekben, amelyekben a replikon és az aktiváló szekvencia működik. Bár az E. coli a legjobb gazdaszervezet, amely az izopenicillin N szintetáz termeléshez és az ezt követő tisztításhoz illeszkedik in vitro alkalmazásnál, azok a vektorok, amelyek az izopenicillin N szintetáz aktivitás kifejezését E. colitól eltérő gazdasejtben segítik elő, szintén használhatók, elsősorban egy adott organizmus β -laktám antibiotikum-termelő képességének és hatékonyságának növelése céljából.

Nagyon sokféle organizmus termel β -laktám antibiotikumokat. Az alábbi táblázat bemutatja a β -laktám antibiotikum termelő organizmusok nem teljes listáját.

I. táblázat
 β -laktám antibiotikum termelő organizmusok

Organizmus	Antibiotikum
Agrobacterium	különböző β -laktámok
Aspergillus nidulans	különböző β -laktámok
Cephalosporium acremonium	penicillinek és cefalosporinok
Chromobacterium	különböző β -laktámok
Gluconobacter	különböző β -laktámok
Nocardia lactamdurans	cefamicin C
Nocardia uniformis	nokardicin
Penicillin chrysogenum	különböző penicillinek és más β -laktámok
Serratia	különböző β -laktámok
Streptomyces antibioticus	klavulánsav
Streptomyces argenteolus	aszparenomicin A, MM 4550 és MM 13902
Streptomyces cattleya	tienamicin
Streptomyces chartreusis	SF 1623 és cefamicin A és B
Streptomyces clavuligerus	PA-32413-I, cefamicin C, A16886A, penicillinek, cefalosporinok, klavulánsav és más klavámok
Streptomyces fimbriatus	cefamicin A és B
Streptomyces flavovirens	MM 4550 és MM 13902
Streptomyces flavus	MM 4550 és MM 13902
Streptomyces fulvoviridis	MM 4550 és MM 13902
Streptomyces griseus	cefamicin A és B, és karpetimicin A és B
Streptomyces halstedii	cefamicin A és B
Streptomyces heteromorphus	C2081X és cefamicin A és B
Streptomyces hygroscopicus	dezacetoxi-cefalosporin C
Streptomyces lipmanii	cefamicin, penicillin N, 7-metoxi-cefalosporin C, A16884, MM 4550, MM 1390
Streptomyces olivaceus	epitienamicin F, MM 4550, és MM 13902
Streptomyces panayensis	C2081X és cefamicin A és B

I. táblázat
β-laktám antibiotikum termelő organizmusok

Organizmus	Antibiotikum
<i>Streptomyces pluracidomyceticus</i>	pluracidomicin A
<i>Streptomyces rochei</i>	cefamicin A és B
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	MM 4550 és MM 13902
<i>Streptomyces OA-6129 sp.</i>	OA-6129 A
<i>Streptomyces KC-6643 sp.</i>	karpetimidin A
<i>Streptomyces tokunomensis</i>	aszparenomicin A
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	cefamicin A és B
<i>Streptomyces wadayamensis</i>	WS-3442-D

A fentebb leírt β-laktám antibiotikum termelő organizmusok közül sokat alkalmaznak a gyógyszeriparban antibiotikum termelés céljából.

Ezeknek az organizmusoknak az antibiotikum-termelő képességét lehet növelni és hatékonyabbá tenni a sebességet korlátozó antibiotikum-bioszintetikus enzimek intracelluláris koncentrációjának növelésével a fermentáció során. A jelen találmány szerinti, izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS vegyületek alkalmazhatók kifejező vektorok megalkotására. Amikor ezeket az IPNS kifejező vektorokat valamely olyan gazdasejtbe transzformáljuk, amely β-laktám antibiotikumot termel egy izopenicillin N szintetáz aktivitást foglalkoztató intermedier reakció révén, az izopenicillin N szintetáz aktivitás intracelluláris koncentrációja növekszik. Feltéve, hogy az IPNS aktivitás a β-laktám bioszintézis sebesség-korlátozó tényezője a nem transzformált gazdasejtben, az ezeket az IPNS kifejező vektorokat tartalmazó gazdasejtek több β-laktám antibiotikumot termelnek, mint nem transzformált társaik.

Egy olyan vektorhoz, amely növeli egy adott gazdasejt izopenicillin N szintetáz aktivitásának intracelluláris koncentrációját, amely gazdasejtbe a vektort transzformáljuk, a következő elemek szükségesek: 1. izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS vegyület, 2. transzkripció és transzláció aktiváló szekvencia, amely nem csupán működik a transzformálandó gazdasejtben, hanem a korrekt orientációban és pozícióban helyezkedik el, hogy elősegítse az izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS kifejeződését; és 3. replikációs és integrációs elemek, amelyek lehetővé teszik a vektor fenntartását a gazdasejtben.

Egy DNS vektor integrációjának gyakorisága gyakran erősen függ a gazdasejt által kódolt aktivitásoktól; gyakran meg lehet figyelni azonban, hogy bizonyos DNS szekvenciák (azaz vírusokból és fágokból származó szekvenciák, amelyek megkönnyítik az integrációt, és szekvenciák, amelyek homológok a gazdaszervezet genom DNS-ével), amikor egy rekombináns vektorban vannak jelen, megkönnyítik az integrációt.

Egy IPNS kifejező vektor természetesen tartalmazhat antibiotikum rezisztencia átadó gént is, vagy további olyan elemeket, amelyek eszközül szolgálhatnak a vektort tartalmazó gazdasejtek szelektálásához, de az ilyen szelektálható elemek sem nem szükségesek,

sem nem kívánatosak, amikor a vektor a gazdasejt kromoszomális DNS-ébe integrálódik.

A jelen találmány plazmidjainak sokasága alkalmas az izopenicillin N szintetáz aktivitás intracelluláris koncentrációjának növelésére a β-laktám antibiotikum-termelő sejtben. A pOGO239 plazmid tartalmazza a *Streptomyces lipmanii* ép izopenicillin N szintetáz génjét, így a *S. lipmanii* transzformálása pOGO239 plazmiddal az izopenicillin N szintetáz gén megnövekedett kópiaszámához és így az enzim megnövekedett intracelluláris koncentrációjához vezet.

A jelen találmány szerinti ép *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz gén használható az olyan gazdasejtekben is, mint az *Aspergillus*, *Cephalosporium* és *Penicillium*. Következésképpen ezeknek a gazdasejteknek a transzformálása egy jelen találmány szerinti plazmiddal, pl. a pOGO239 plazmiddal, az izopenicillin N szintetáz gén megnövekedett kópiaszámához és az enzim megnövekedett intracelluláris koncentrációjához vezet.

Mivel a jelen találmány IPNS génjét egy *Streptomyces* gazdasejtből izoláljuk, az IPNS gén különösen jól illik olyan kifejeződő vektorokban való alkalmazásra, amelyeket IPNS *Streptomyces*ben való magasszintű kifejeződésének elősegítésére tervezünk. Az irodalom tele van olyan technikákkal, amelyek *Streptomyces* kifejező vektorok megalkotásával és *Streptomyces* gazdasejtek transzformálásával foglalkoznak. Lásd pl. Garcia-Dominguez és munkatársai: *Applied and Environmental Microbiology* 53(6), 1375-1381 (1987). A jelen találmány IPNS génje könnyen beépíthető egy olyan kifejező vektorba, amely egy *Streptomyces* replikont tartalmaz; ismert *Streptomyces* replikonok széles választéka áll rendelkezésre ilyen alkalmazási célra.

A II. táblázat olyan *Streptomyces* plazmidok listája, amelyekből *Streptomyces* replikációs origókat lehet kapni, a lista bemutatás célját szolgálja, és nem törekszik teljességre. Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy mindaddig, amíg a replikon funkció nem szakad meg, a táblázatban felsorolt plazmidok részét vagy egészét fel lehet használni olyan vektorok megalkotására, amelyek a jelen találmány szerinti IPNS gént tartalmazzák. A plazmidot tartalmazó gazdaszervezetek és a deponálási számok szintén fel vannak sorolva a II. táblázatban.

II. táblázat
Streptomyces plazmidok

Plazmid	Gazdaszervezet	Deponálási szám
SCP2	Streptomyces coelicolor A3(2)	NRRL 15042
SCP2*	Streptomyces coelicolor M110	NRRL 15041
pEL7	Streptomyces ambofaciens/pEL7	NRRL 12523
pUC6	Streptomyces spinosus	NRRL 11439
pUC3	Streptomyces 3022A	NRRL 11441
SLP1	Streptomyces lividans	NCIB* 11417
pNM100	Streptomyces virginiae	NRRL 15156
pEL10+	Streptomyces granuloruber A399 12.13/pEL103	NRRL 12549
pIJ702	Streptomyces lividans	ATCC** 39155

*National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torrey Research Station, Post Office Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98DB, Skócia, Egyesült Királyság.

**American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, 20852.

A jelen találmány szerinti Streptomyces lipmanii IPNS kódoló szekvenciát szintén lehet Penicilliumból, Cephalosporiumból, vagy bármilyen más gazdasejtől származó transzkripció és transláció aktiváló szekvenciák szabályozása alá helyezni, hogy olyan rekombináns gént alkossunk meg, amely főleg az adott organizmushoz való felhasználáshoz alkalmas. A 0200425. számú európai szabadalmi közzétételi irat, amely 1986. december 10-én került nyilvánosságra, és amely ebben a bejelentésben referenciaként van beépítve, ismerteti a C. acremonium IPNS gén transzkripció és transláció aktiváló szekvenciáját, amelyet fúzionálni lehet a jelen találmány S. lipmanii IPNS kódoló szekvenciájával, hogy olyan rekombináns IPNS gént alkossunk meg, amely elősegíti a S. lipmanii IPNS kódoló szekvencia kifejeződését Cephalosporiumban (amikor beépül a gén egy kifejező vektorba és a vektor bevezetődik Cephalosporiumba). Hasonlóképpen a 0225128 számú európai szabadalmi közzétételi irat, amelyet 1987. június 10-én hoztak nyilvánosságra és amelyet ebbe a bejelentésbe referenciaként építünk be, ismerteti a P. chrysogenum IPNS gén transzkripció és transláció aktiváló szekvenciáit, amelyeket a fentiekben leírtak szerint lehet alkalmazni olyan Penicillium vektorok megalkotására, amelyek elősegítik a S. lipmanii IPNS kódoló szekvencia kifejeződését.

A jelen találmány egy ép, működésképes Streptomyces lipmanii DNS szekvencia klónozásának eredménye, ez nemcsak az izopenicillin N szintetáz aminosav szekvencióját kódolja, hanem azt a transzkripció és transláció aktiváló szekvenciát is, amely az izopenicillin N szintetáz kifejeződésének elősegítéséhez szükséges S. lipmanii-ben. Hasonlóképpen a jelen találmány szerinti izopenicillin N szintetáz gén tartalmazza a kódoló területtől lefelé elhelyezve azokat a szekvenciákat, amelyek felelősek a transzkripció befejezéséért és az mRNS poliadenilező és feldolgozó szignálokat szolgáltatják. Ezek az 5' és 3' szabályozó elemek fontos szempontjait jelentik a jelen találmánynak.

Mivel a pOGO239 és pOGO246 plazmidok tartalmazzák a genomális DNS ~1,0 kb-át, amely az izope-

nicillin N szintetáz kódoló DNS-től felfelé helyezkedik el a S. lipmanii genomban, a pOGO239 és pOGO246 plazmidok szükségszerűen tartalmazzák a S. lipmanii izopenicillin N szintetáz gén transzkripció és transláció aktiváló szekvenciáját. A legtöbb transzkripció és transláció aktiváló szekvencia az aktiválandó DNS-től felfelé kódolódik, bár néhány riboszomális RNS-t kódoló DNS szekvencia a transzkripció aktiváló szekvenciák révén úgy aktiválódik, hogy nem a kódoló területtől felfelé helyezkedik el. A „felfelé” kifejezés a jelen szövegösszefüggésben olyan DNS-re vonatkozik, amely 5' irányban van az izopenicillin N szintetáz kódoló DNS 5' végétől.

A pOGO239 plazmidban kódolt Streptomyces lipmanii transzkripció és transláció aktiváló szekvencia korrekt módon helyezkedik el ahhoz, hogy elősegítse az izopenicillin szintetáz aktivitást kódoló DNS kifejeződését. A pOGO plazmid megalkotásában nincsenek bevezetve olyan kiiktatások és beiktatások az izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS kódoló szálának 5' végét szegélyező DNS-ben, amelyek hatnának a transzkripció és transláció aktiváló szekvenciára. Mivel a pOGO239 plazmidon elhelyezett S. lipmanii transzkripció és transláció aktiváló szekvenciát alkalmazhatjuk DNS szekvenciák széles választéka kifejezésének elősegítésére, az aktiváló szekvencia fontos részét képezi a jelen találmánynak. A S. lipmanii izopenicillin N szintetáz gént a ~1,2 kb-s SalI-PstI restriktions fragmentumban izolálhatjuk, amely a pOGO239 plazmidban közvetlenül felfelé és szomszédosan helyezkedik el az izopenicillin N szintetáz aktivitást kódoló DNS-hez képest. A PstI hely az izopenicillin N szintetáz fehérje 55. és 56. aminosavgyökeit kódolja úgy, hogy az izopenicillin N szintetáz aminosav terminális kódoló területe is benne van ebben a SalI-PstI fragmentumban. Bármilyen restriktions fragmentum, amely tartalmazza a fentebb említett ~1,2 kb-s SalI-PstI restriktions fragmentumot, szükségszerűen tartalmazza jelen találmány szerinti S. lipmanii transzkripció és transláció aktiváló szekvenciát is.

A Streptomyces lipmanii transzkripció és transz-

lációs aktiváló szekvenciát alkalmazhatjuk bármilyen DNS szekvencia kifejeződésének elősegítésére *S. lipmanii*-ben és más *Streptomyces* fajokban. A *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz génből való transzkripció és translációs aktiváló szekvenciát fuzionálhatjuk fehérje kódoló területekhez számos használható úton. Így pl. az aktiváló szekvenciát izolálhatjuk egy pOGO246 plazmidból származó ~1 kb-s SalI-NdeI restrikciós fragmentumban. Ahogy a pOGO246 plazmid a pOGO239 plazmidból származik helyre irányuló mutagenesis révén, hogy NdeI restrikciós hely jöjjön létre a translációs iniciációs helynél, ugyanúgy lehet bármilyen adott fehérje-kódoló szekvenciát adaptálni, hogy összeférhető végeket tartalmazzon a kényelmes ligálás érdekében a *S. lipmanii* aktiváló szekvenciához. Az ilyen stratégiák természetesek és nyilvánvalóak azok számára, akik a szakterületen jártasak, és különbözhetnek egymástól a különböző fehérje-kódoló szekvenciáknál. Példával alátámasztott stratégiát írunk le az 5. példában, amely leírja a munkamenetet a *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz fehérje kódoló szekvencia fúziójánál az *E. coli* transzkripció és translációs aktiváló szekvenciához pCZR111 plazmidban.

Hasonló stratégiák teszik lehetővé, hogy a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz fehérje kódoló szekvencia összekapcsolható legyen bármilyen adott mikroorganizmusból származó transzkripció és translációs aktiváló szekvenciákhoz. Így pl. a szóban forgó organizmusból származó aktiváló szekvenciát újra megalkothatjuk olyan módon, hogy az 5'-ATG transzkripció iniciációs helyet beillesztjük egy NdeI restrikciós helybe, az 5'-CATATG-3'-be. A pOGO246 plazmid *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz fehérje-kódoló szekvenciáját azután egyszerűen összekapcsoljuk a promotorról, hogy olyan hibrid gént készítsünk, amely elősegíti a *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz kifejeződését bármilyen organizmusban, amelyben az aktiváló szekvencia működik. A hibrid gén szegélyező végeit hasonlóképpen adaptálhatjuk, ha szükséges, hogy lehetővé tegyünk a hibrid gén beiktatását egy olyan vektorba, amely a szóban forgó organizmushoz megfelelő.

A pOGO239 plazmid szintén tartalmazza a *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz gén 3' szabályozó szekvenciáit. Általában a transzkripció befejezéséért, az mRNS poliadenilezéséért és az mRNS feldolgozásáért felelős szekvenciák egy gén kódoló területe stop kodonjától ~500 bp-re lefelé terjedő területen belül kódolódnak. Ennek megfelelően a ~0,94 kb-s KpnI-SalI restrikciós fragmentum, amely tartalmazza az izopenicillin N szintetáz karboxi terminálisát kódoló DNS-t és tartalmaz lefelé levő szekvenciákat, tartalmazza a *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz gén átírási terminációs, mRNS poliadenilező és feldolgozó szignáljait is.

A pOGO239-benlevő transzkripció (átírási) terminációs szekvenciát hozzá lehet fűzni más rekombináns gén-konstrukciókhoz, hogy megkönnyítsük a transzkripció befejeződését ezekben a konstrukciók-

ban. Így pl. egy KpnI restrikciós hely (amely a *S. lipmanii* izopenicillin N szintetáz aminosav gyök-szekvencia mintegy 260-261. aminosav-gyökeihez tartozó kodonoknál helyezkedik el) kényelmes a transzkripció terminációs szekvenciák izolálásához, mivel a KpnI hasítási hely közel van a translációs terminációs helyhez (a transláció a 333. aminosav-gyök után fejeződik be). Egy SalI restrikciós enzim felismerő hely, amely ~800 bp-vel a translációs terminációs helytől lefelé helyezkedik el, kényelmes disztális vagy lefelé levő véget biztosít, lehetővé téve, hogy a transzkripció terminátor izolálható legyen ~940 bp-s KpnI-SalI restrikciós fragmentumban a pOGO239 plazmidból.

Egy adott DNS szekvencia kifejeződését egy rekombináns DNS kifejező vektorban úgy lehet fokozni, hogy egy transzkripció terminációs és mRNS poliadenilező és feldolgozó szignált helyezünk el a kifejezendő kódoló terület kódoló szálának 3' végénél. A jelen találmány olyan transzkripció terminációs és mRNS poliadenilező és feldolgozó szignált nyújt, amelyet lehet használni bármilyen rekombináns DNS vektorból származó géntermék kifejeződése növelésének céljából *Streptomyces* és rokon gazdasejtekben.

Az ezután következő példák tovább illusztrálják és példákkal támasztják alá a találmányt, de semmiképpen sem az a céljuk, hogy korlátozzák a találmány oltalmi körét.

1. példa

30 a) *E. coli* K12 JM109/pOGO239 tenyésztése

Az *E. coli* K12 JM109/pOGO239 liofilizátumait a Northern Regional Research Laboratories-től (NRRL; Peoria, Illinois 61604) kapjuk, ahol ez NRRL B-18250 deponálási számon található (a deponálás dátuma: 1987. augusztus 11.) A liofilizátumot közvetlenül alkalmazhatjuk tenyészetként az alább leírt munkamenetben.

1 liter L-tápközeget (10 g tripton, 10 g NaCl és 5 g élesztő kivonat literenként), amely 100 µg/ml ampicillint is tartalmaz, inokulálunk *E. coli* K12 JM109/pOGO239 tenyészetével és levegőztetés mellett inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán át (15-18 óra).

B. pOGO239 plazmid izolálása

Az 1. A példában készített tenyészetet Beckman JS-5.2 rotorban centrifugáljuk (Beckman Instruments, Inc., Spinco Division, Palo Alto, Kalifornia 94304) 5200 fordulat/percnél 25 percen át 4 °C hőmérsékleten. Az így kialakult felülúszót elöntjük. A sejtüledéket újra szuszpendáljuk 28 ml oldatban, amely 25% szacharózt és 50 mmól/l EDTA-t tartalmaz. Mintegy 1 ml olyan oldatot, amely 20 m ; ml lizonimot és 0,25 mól/l trisz.HCl-t tartalmaz 50%-os glicerinben (pH=8,0), és mintegy 1,5 ml 0,5 mól/l EDTA-t (pH=8,0) adunk hozzá a sejtszuspenzióhoz, és összekeverjük. Az így létrejött keveréket jégen inkubáljuk 15 percen át. 3 ml lizáló oldatot [amely úgy készül, hogy 3 ml 10%-os Triton-X100-at, 75 ml 0,25 mól/l EDTA-t (pH=8,0), és 7 ml vizet összekeverünk] adunk a lizozimmal kezelt sejtekhez gyengén keverés mellett. Az így létrejött oldatot jégen inkubáljuk további 15 per-

cenát.

A sejttöledéket az oldatból centrifugálással eltávolítjuk 17.000 fordulat/percnél Beckman JA-17 rotorban, a centrifugálást 45 percen át 4 °C hőmérsékleten végezve. Mintegy 28,6 g CSCI-t és ~1 ml 5 µg/ml-es etidium-bromid oldatot adunk a ~30 ml felülőszóhoz. Ezután a térfogatot vízzel 40 ml-re állítjuk be és az oldatot dekantáljuk VTi50 ultracentrifuga csőbe (Beckman). A csövet leforrasztjuk és az oldatot VTi50 rotorban centrifugáljuk 49.500 fordulat/percnél ~18 órá át. Az így létrejött plazidcsíkot, amelyet ultraibolya fénnel teszünk láthatóvá, izoláljuk, sóval telített izopropanollal extraháljuk, hogy etidium-bromidot eltávolítsuk, és dializáljuk háromszor cserélt, ~20 térfogat TE pufferral szemben [10 mmól/l trisz-HCl (pH=7,5) és 1 mmól/l EDTA]. A dializátumot összegyűjtjük, majd két térfogat etanolt és 0,05 térfogat 3 mól/literes nátrium-acetát oldatot adunk hozzá. Az etanolos keveréket -20 °C hőmérsékletre lehűtjük, és a plazmid DNS-t centrifugálással üledékbe visszük, a centrifugálást JA-17 rotorban (Beckman) végezve 10.000 fordulat/percnél 30 percen át -10 °C hőmérsékleten. Az így létrejött üledéket újra szuszpendáljuk ~1 ml TE pufferban, majd extraháljuk azonos térfogat fenolkloroform keverékkel (1:1, térfogat/térfogat). A vizes fázisban levő DNS-t 0,1 térfogat 3 mól/literes NaOAc nátrium-acetát és 2 térfogat etanol hozzáadásával nyerjük ki, amelyet -20 °C hőmérsékleten ~30 perc inkubálás és 15.000 fordulat/percnél 20 perces centrifugálás követ. Az így létrejött DNS üledéket először 70%-os etanollal, majd 100%-os etanollal öblítjük, majd szárítjuk.

A ~1,5 mg pOGO239 plazmid DNS-t, amelyet ezzel a munkamenettel kaptunk, 1,5 ml 0,1-szeres TE pufferban szuszpendáljuk és -20 °C hőmérsékleten tároljuk. A pOGO239 plazmid restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül az 1. ábra mutatja be.

2. példa

mOGO244 fág megalkotása

Azok, akik a szakterületen jártasak, tudják, hogy azonos plazmid-konstrukciókhoz lehet jutni különböző módszereket és a gén-szekvenciák különböző forrásait alkalmazva. Az mOGO244 fágot egy lambda EMBL3 klón SalI restrikciós emésztményének shotgun klónozásával alkotjuk meg egy SalI-gyel emésztett M13 vektorba. A lambda EMBL3 klón egy Streptomyces lipmanii genom EMBLE3 könyvtárból ered, és tartolt hibridizálással azonosítjuk tisztított S. lipmanii IPNS amino-terminális aminosavgyök-szekvenciájának és a speciesre jellemző kodon-alkalmazási torzulásoknak alapján tervezett „becsült” (guessmer) DNS vizsgáló mintát alkalmazva. A kívánt M13 fág klónt „guessmer” vizsgáló mintát alkalmazva azonosítjuk, tartolt hibridizációs eljárást alkalmazva. A jelen találmány miatt azonban az mOGO244 megalkotása nagymértékben egyszerűsödik, elsősorban azért, mert a S. lipmanii IPNS gén forrásaként pOGO239 plazmidot alkalmazhatunk. Az M13-eredetű mOGO044 fág

hasznos köztes termék a hely-specifikus mutagenézisben, amelyet azért végzünk, hogy NdeI restrikciós enzim felismerő helyet képezzünk ki a S. lipmanii IPNS kódoló szekvenciában.

5 A. SalI-gyel emésztett pOGO239 plazmid előállítás

Mintegy 25 µl 0,1-szeres TE pufferban levő mintegy 25 mg pOGO239 plazmid DNS-t, amelyet az 1.B. példa szerint állítottunk elő, hozzáadunk 40 µl 10x SalI pufferhoz [1,5 mól/l NaCl; 100 mmól/l trisz.HCl (pH=7,5); és 100 mmól/l MgCl₂], 335 µl üvegből desztillált vízhez és 5 µl (~50 egység) SalI restrikciós enzimhez, és mindezeket összekeverjük.

Hacsak másképpen nem jelezzük, a restrikciós enzimeket a New England Biolabs-tól szerezünk be (32 Tozer Road, Beverly, Massachusetts 01915). Az egység definíciója itt annak felel meg, amelyet az adott gyártó egységnek határoz meg. Az így kapott reakciókeveréket 37 °C hőmérsékleten 90 percen át inkubáljuk. A reakciókeveréket ezután azonos térfogatú CHCl₃-mal extraháljuk. A vizes fázisban levő DNS-t etanolos kicsapással koncentrálnak az alábbiak szerint. A DNS oldathoz 1/10 térfogat 3 mól/l-es nátrium-acetát (NaOAc) oldatot és 2,5 térfogat etanolt adunk, ezután ezeket összekeverjük és -20 °C hőmérsékleten ~1 órán át inkubáljuk. Ha szükséges, tRNS-t adhatunk az etanol-DNS oldathoz, hogy megkönnyítsük a DNS kicsapását. -20 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után az oldatot 20 percen át centrifugáljuk 15.000 fordulat/percnél. A DNS üledéket először 70%-os etanollal, majd 100%-os etanollal öblítjük, végül szárítjuk. Az üledéket újra szuszpendáljuk ~20 µl 0,1XTE pufferban, így alkotunk meg ~10 µg, SalI-gyel emésztett pOGO239 plazmid DNS-t. A SalI-gyel emésztett DNS-t -20 °C hőmérsékleten tároljuk.

35 B. SalI-gyel emésztett M13mp19 vektor előállítása

Mintegy 2,5 µg M13mp19 fág DNS-t (amely a New England Biolabs-nál (NEB) szerezhető be) emésztünk 100 µl Sal pufferban 1 µl (~20 egység) SalI restrikciós enzimmel, 90 percen át 37 °C hőmérsékleten. A reakciókeveréket fenol/kloroformmal extraháljuk, és a vizes fázisban levő DNS-t etanolos kicsapással koncentrálnak. A DNS üledéket újra szuszpendáljuk 20 µl 0,1XTE pufferban és így alakítunk ki ~2 ng kívánt, Sal-gyel emésztett M13mp19 vektort. A kapott vektor DNS-t -20 °C hőmérsékleten tároljuk.

45 C. mOGO244 fág megalkotása

k1 µl, SalI-gyel emésztett pOGO239 plazmid DNS-t és 1 µl, SalI-gyel emésztett M13mp19 vektort ligálunk 20 µl reakciókeverékben, amely tartalmazza a DNS fragmentumokat, 2 µl 10X ligáz puffert [0,5 mól/l trisz.HCl (pH=7,5), és 100 mmól/l MgCl₂], 2 µl 5 mmól/l ATP-t, 1 µl 6 µg/µl BSA-t, 12 µl üvegben desztillált vizet, és 1 µl (1 Weiss-egység) T4 DNS ligázt [Boehringer-Mannheim Biochemicals (BMB), P.O. Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250]. A reakciókeveréket ~18 órán át inkubáljuk 15 °C hőmérsékleten. A ligált DNS alkotja a kívánt mOGO244 fágot más ligálási termékekkel együtt.

D) *E. coli* K12 JM109 transzformálása mOGO244 fággal

Kompetens *E. coli* K12 JM109 törzset ("Epicurean Coli" márka-néven) vásárolunk a Stratagene-nél (3770 Tansy Street, San Diego, Kalifornia 92121) és transzformáljuk az mOGO244 fágot alkotó ligálási reakciókeverékkel (amelyet a 2.C. példában írtunk le), a gyártók útmutatását követve, azzal a kivétellel, hogy a DNS 20 µl térfogatú és a tápközegbe hígítás vagy kifejeződési idő nem szükséges. A transzformálás után a sejteket ~1, 10, 20, 40 és 50 µl-es alikvotokra osztjuk 13x100 mm steril üvegcsővekbe, amelyek 0,25 ml/cső logaritmikus növekedési fázisban levő *E. coli* K12 JM109-et tartalmaznak. Ezekhez a csövekhez 3 ml fedő-agart adunk (L-tápközeg 0,8% agarral, olvadt állapotban tartva 45 °C hőmérsékleten). A sejt-fedőagar keveréket ezután L-agar lemezekre szélesztjük, amelyek 40 µg/ml 5 bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktozidot (X-gal) és 0,1 mól/l izopropil-tio-β-galaktozidot (PTG) tartalmaznak és a lemezeket egy éjszakán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten. [Az M13-mal kapcsolatos eljárások részletesebb leírásai és magyarázatai megtalálhatók az alábbi kiadványban: M13 Cloning/Dideoxy Sequencing Instruction Manual, Bethesda Research Laboratories (BRL), Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland 20877]. Transzformánsokat azonosítunk részben azon az alapon, hogy a β-galaktozidáz aktivitás a beiktatásra inaktíválódik (színtelen tarfolt fenotípus), részben a replikatív formájú (RF) DNS restrikciós enzimes elemzésével. Az átvizsgálás céljából világos tarfoltokat szívunk át a lemez felületéről Pasteur pipettával tarfoltonként 3 ml korai logaritmikus fázisú *E. coli* K12 JM109 tenyészetbe. A tenyészeteket 6–18 órán át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, levegőztetés mellett.

Ezt az inkubálást követően az egyes tenyészetekből 1,5 ml-t üledékbe viszünk külön-külön 1,5 ml-es Eppendorf csövekben. A felülúszókat friss csövekbe dekantáljuk és 4 °C hőmérsékleten tároljuk, hogy fág inkulum forrásaként szolgáljon. Replikatív formájú DNS-t készítünk a sejttöledékekből lényegében Birnboim és Doly alkálikus plazmid-készítési eljárásában található kitanítás szerint [Nuc. Acid. Res. 7(6), 1513–1523 (1979)], az alábbi kivételekkel. Az eljárás léptékét növeljük úgy, hogy 1,5-szörös térfogat I, II és III oldatot alkalmazunk, és a feltisztult lizátumot egyszer azonos térfogatú CHCl₃-mal extraháljuk. A DNS-t ezután kicsapjuk 0,4 térfogat izopropanol hozzáadásával, és szobahőmérsékleten végzett 20 perces inkubálással.

A DNS-t centrifugálással összegyűjtjük, majd etanolal kicsapjuk 0,3 mól/l NaOAc-ból. Az RF DNS restrikciós mintáinak elemzését megkönnyíti egy aszimmetrikus XhoI restrikciós enzim elismerőhely jelenléte, amely nem csupán diagnosztikus jelentőségű a kívánt beiktatás jelenlétére, hanem lehet alkalmazni a beiktatott szekvencia orientálására is az M13 vektor többszörös klónozó helyéhez (MCS) viszonyítva.

3. példa

A) mOGO244 egyszálú fág DNS előállítás és helyspecifikus mutagenézis az mOGO245 fág megalkotására

E. coli K12 JM109 korai logaritmikus növekedési fázisából 10 ml tenyészetet inokulálunk ~200 µl fágkészlettel (amelyet a 2.d. példában állítottunk elő), és inkubáljuk ~18 órán át 37 °C hőmérsékleten, levegőztetés mellett. A tenyészetet centrifugáljuk, és az így létrejött felülúszót átvisszük egy új csőbe és újra centrifugáljuk. A felülúszót ismét friss csőbe dekantáljuk. 1 ml 25%-os polietilén-glikol oldatot (molekulatömeg = 3350/3 mól/l NaCl-ben adunk hozzá a felülúszóhoz, amelyet azután 15 percig inkubálunk szobahőmérsékleten. Az így létrejött keveréket 30 percen át centrifugáljuk 10.000 fordulat/percnel JA-14 rotorban (Beckman). A centrifugálással kapott üledék tartalmazza az egyszálú mOGO244 fágot, és ezt újra szuszpendáljuk 400 µl TE pufferban. Az oldatot extraháljuk először CHCl₃-mal, majd TE-vel telített fenollal. A fenolt hagyjuk állni a vizes fázissal kapcsolatban 15 percig. Az oldatot ezután kétszer extraháljuk TE-vel telített fenol:CHCl₃ keverékével (1:1, térfogat/térfogat), és kétszer extraháljuk csak CHCl₃-mal. A DNS-t azután 0,3 mól/l NaOAc-ból csapjuk ki. A DNS-t centrifugálással összegyűjtjük és az üledéket újra szuszpendáljuk 100 µl 0,1 X TE pufferban. Ez az oldat alkotja az egyszálú mOGO244 fág DNS-t, mintegy 5 µg mennyiségben.

B) Mutagenézis

A mutagenézisben (és az ezt követő hibridizálásban, a kívánt fágok észlelésére) alkalmazott egyszálú DNS fragmentumokat szintetizálunk automatizált DNS szintetizáló berendezésen, az M13 univerzális primer (egy 15-mer) kivételével, amelyet a BRL-től szerzünk be. A mutagenézis fragmentumait az alábbiak szerint jelöljük: (1) SIPS6, egyszálú, 36 nukleotid hosszúságú DNS, amely homológ az mOGO244 fágban levő IPNS kódoló szekvenciával három bázis kivételével, amelynek hibás illesztése (aláhúzva) egy NdeI felismerő szekvenciát képez IPNS kódoló szekvencia mintegy 1. helyénél az alábbi DNS szekvenciával:

NdeI

5'-CACACTCCACGGAGGAT

TATGCCTGTCTGATGC-3'; és

(2) SIPS7, egy 18 nukleotid hosszúságú egyszálú DNS, amely a SIPS6-nak csupán al-fragmentuma a következő DNS szekvenciával:

NdeI

5'-GAGGATCATATGCCTGTC-3'.

A mintegy 100 pmól SIPS6 5' végeit foszforilezzük (kinázzal kezeljük) olyan reakciókeverékben, amely egyszálú DNS-t tartalmaz 1 pmól/µl koncentrációban, tartalmaz továbbá 10 µl 0,1 mól/l DDT-t, 65 µl üvegből desztillált vizet és 1 µl 0,1 mól/l (10 Richardson egység) T4 polinukleotid kinázt (BMB). A reakciókeveréket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 30 percig, ekkor további 1 µl enzimet adunk hozzá. A reakciókeveréket ezután további 30 percen át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, majd a reakciót leállítjuk 68 °C hő-

mérsékleten 5 percig végzett inkubálással. Az M13 univerzális primer mintegy 40 pikomóljának 5' végeit kinázzal kezeljük 40 µl analóg reakciókeverékben, amely ugyanilyen mennyiségű enzimet tartalmaz.

Az egyszerű mOGO244 fág DNS-t mutagenizáljuk Adelman és munkatársai kitanításával összhangban [DNA 2(3), 183–193 (1983)], amint ezt később leírjuk. Az összeforrasztási reakciót úgy hajtjuk végre, hogy 1500 nanogramm (15 µl 0,1X TE pufferban) egyszerű mOGO244 fág DNS-t hozzáadunk 8 µl 10X összeforrasztó pufferhez [100 mmól/l trisz-HCl (pH 7,5); 1 mmól/l EDTA; és 500 mmól/l NaCl], 4 µl (4 pmól) kinázzal kezelt SIPS6-hoz, 4 µl (4 pmól) kinázzal kezelt M13 univerzális szekvenciáló primerhez, és 50 µl vízhez, a keveréket 80 °C hőmérsékleten 2 percig, majd 55 °C hőmérsékleten 5 percig, végül szobahőmérsékleten 5 percig inkubáljuk.

A kiterjesztési reakciót úgy hajtjuk végre, hogy az alábbi keverék 120 µl-jét adjuk az összeforrasztott DNS oldatához; 20 µl 10X Klenow ligáz puffer 100 mmól/l trisz-HCl (pH 7,5), 1 mmól/l EDTA; és 500 mmól/l NaCl, 20 µl 0,1 mól/l-es DTT; 20 µl 6,25 mmól/literes oldat dGTP, dATP, dTTP és dCTP mindegyikéből; 20 µl 5 mmól/l-es ATP, 120 µl víz és 2,5 µl (12,5 egység) Klenow enzim (BMB). A kiterjesztési reakciókeveréket szobahőmérsékleten 1 órán át, majd 37 °C hőmérsékleten 4 órán át, végül 14 °C hőmérsékleten 18 órán át inkubáljuk.

A kiterjesztési reakciókeveréket egyszer CHCl₃-mal extraháljuk és a DNS-t etanollal és NaOAc-cal kicsapjuk, majd centrifugálással összegyűjtjük. A DNS üledéket újra szuszpendáljuk 400 µl 1X SI pufferban (0,3 mól/l NaCl és 3 mmól/l ZnOAc). A DNS oldat felét tartalékként őrizzük -20 °C hőmérsékleten; a felét alikvotokra mérjük ki öt 1,5 ml-es csőbe. Ezek közül a csövek közül négyhez 1 µl S1 nukleáz (BMB) adunk, amelyet előzőleg 200 egység/µl-re hígítottunk. A reakciókeveréket szobahőmérsékleten inkubáljuk 5; 10; 15 illetve 20 percig. A reakciókat először 5–10 µg tRNS-nek a reakciókeverékhez adásával állítjuk le, amely hordozóként szolgál, majd TE-vel telített fenol-CHCl₃ keverékkel extraháljuk (1:1, térfogat/térfogat). Azt a mintát, amelyet nem kezelünk S1-gyel (negatív kontroll), szintén extraháljuk. A vizes fázisban levő DNS-t etanolos kicsapással koncentrálnak és centrifugálással összegyűjtjük. A DNS üledékeket egyenként újra szuszpendáljuk 20 µl vízben.

10 µl-t használunk fel az egyes, így képződött S1-kezelt DNS oldatokból lényegében a 2.D. példában leírt eljárás szerint, azzal a kivétellel, hogy a lemezek nem tartalmaznak sem X-Gal-t, sem IPTG-t. A kívánt mutánsokat radioaktívan jelzett SIPS7 oligonukleotid hibridizációjával azonosítjuk nitrocellulóz szűrőkre rögzített fág DNS-sel, amint ezt az alábbiakban leírjuk.

Tarfolt képződés után a lemezeket 4 °C hőmérsékleten ~1 órán át inkubáljuk, hogy a fedőagar megkeményedjen. Nitrocellulóz szűrőket helyezünk két-két lemez mindegyike mezejének tetejére, amelyek ~50–200 tarfoltot tartalmaznak; ezek a lemezek a negatív

kontrollból, a 10 perces S1-kezelés sorozatból és a 20 perces S1-kezelés sorozatból származnak. Az érintkezést a szűrő és a mező felülete között ~1 percig tartjuk fenn, ekkor a nitrocellulóz szűrőt kezeljük, telített 3 MMCh szűrőpapírt (Whatman LabSales, Inc., P.O.Box 1359, Hillsboro, Oregon 97123–1359) alkalmazva, 0,1 n NaOH-1,5 mól/l NaCl-lel ~5 percig. A nitrocellulóz szűrőket ezután levegőn szárítjuk, majd vákuumban sütjük 80 °C hőmérsékleten 30 percig.

A nitrocellulóz szűrőket ~5 percig előhibridizáljuk olyan oldatban, amelynek összetétele: 6X SSC oldat (20X SSC összetétele: 3 mól/l NaCl és 0,3 mól/l Na-citrát); 10X Denhardt oldat [0,2 g poli(vinil-pirrolidon), 0,2 g szarvasmarha szérum balbumin, és 0,2 Ficoll 10 ml vízben]; 0,1% NaPPi (nátrium-difoszfát), 0,1% SDS, és 10 µg/ml denaturált E. coli kromoszomális DNS. A szűrőket ezután olyan oldatban hibridizáljuk, amelynek összetétele: 6X SSC, 10X Denhardt oldat, 0,1% NaPPi, és 1 pmól/5 ml ³²P-SIPS7. A ³²P-SIPS7-et úgy állítjuk elő, hogy 100 pmól SIPS7 5' végeit foszforilezzük lényegében a szerint az eljárás szerint, amelyet ebben a példában már korábban leírtunk, azzal a kivétellel, hogy ~70 pmól γ-³²P-ATP-t (New England Nuclear (NEN), 549 Albany Street, Boston, Massachusetts, 02118, katalógusszám: NEG-002A) alkalmazunk nem radioaktív ATP helyett. Hibridizálás után a szűrőket kétszer öblítjük 5–5 percig 6X SSC főlöslégében szobahőmérsékleten, majd kétszer 6X SSC főlöslégében 56 °C hőmérsékleten 20–20 percig. A szűrőket levegőn szárítjuk és autoradiográfiának vetjük alá 2 órán át -70 °C hőmérsékleten Quanta III erősítő szűrővel (DuPont). A kívánt mutánsok, amelyek az SIPS7 szekvenciával komplementer szekvenciákat tartalmaznak, exponálják a filmet a szűrőhöz kötött radioaktívan jelzett oligomer miatt, amelyet a fág DNS jelzett. Az egyik korrekt mutáns, amelyet mOGO245 fágunk nevezünk, azonosságát RF DNS-ének restrikciós elemzésével igazoljuk, amely RF DNS-t lényegében a 2.D példában leírt eljárás szerint állítjuk elő.

4. példa

pOGO246 plazmid megalkotása

Bár az mOGO245 fág RF-je tartalmazza az IPNS kódoló szekvenciát a (részleges) NdeI-BamHI restrikciós fragmensben, amelyet a pOGO249 E. coli kifejező plazmidban hasznosítunk. Néha nehéz az mOGO245 RF-jét összegyűjteni megfelelő mennyiségben a fragmentum izolálásához. Abból a célból, hogy megkönnyítsük a pOGO249 E. coli kifejező plazmid megalkotását, megalkotjuk a pOGO246 köztes plazmidot.

GV

A. mOGO245 fág NDS SalI restrikciós enzimes emésztése

mOGO245 fággal fertőzött E. coli K12 JM109-ből replikatív formájú DNS-t izolálunk lényegében a 2.D. példában leírt eljárás szerint. Az mOGO245 fág DNS RF-jének mintegy 2 µg-ját emésztjük SalI restrikciós enzimmel (~10 egység) olyan reakciókeverékben, amely a DNS-t 1X SalI pufferben tartalmazza.

~90 perces inkubálás után 37 °C hőmérsékleten a reakciókeveréket CHCl_3 -mal extraháljuk és a DNS-t etanollal és NaOAc-cal végzett kicsapással koncentráljuk. A DNS-t centrifugálással összegyűjtjük és az üledéket újra szuszpendáljuk 10 μl vízben.

B. *SalI*-gyel emésztett pUC19 plazmid készítése

SalI-gyel emésztett pUC19 plazmid DNS-t (amely a NEB-nél kapható) készítünk, lényegében a 2.B. példában leírt eljárással.

C. pOGO246 plazmid megalkotása

5 μl (~1 μg), *SalI*-gyel emésztett mOGO245 fág DNS-t és 1 μl (~100 ng) *SalI*-gyel emésztett pUC19 plazmid DNS-t ligálunk lényegében a 2.C. példában leírt eljárás szerint. A ligált DNS alkotja a kívánt pOGO246 plazmidot, más ligálási termékekkel együtt. A pOGO246 plazmid restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 2. ábra mutatja be.

D. *E. coli* K12 JM109/pOGO246 megalkotása

A kívánt pOGO246 plazmidot létrehozó ligálási reakciókeveréket kompetens *E. coli* K12 JM109-be (Stratagene) transzformáljuk, lényegében a gyártó által javasolt munkamenet szerint azzal a kivétellel, hogy hígításhoz 1 ml L-tápközeget alkalmazunk. A transzformációs elegy alikvotjait L-agar lemezekre szétosztjuk, amelyek ampicillint (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), X-gal-t (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) és IPTG-t (0,1 mM) is tartalmaznak. A lemezeket 37 °C hőmérsékleten ~18 órán át inkubáljuk. A kívánt transzformánsokat ampicillin-rezisztens fenotípusuk és fehér telepszínük alapján (amely szín a β -galaktoszidáz beiktatásból eredő inaktiválódásának tulajdonítható), valamint plazmid DNS-ük restrikciós enzimeselemzésével azonosítjuk. 3 ml tenyészetből plazmid DNS-t azonosítunk lényegében a 2.D. példában leírt eljárás szerint, ahol RF DNS-t állítottunk elő M13 fággal fertőzött *E. coli* K12 JM109 sejttöledékből. A további lépésekhez az egyik transzformánsból plazmid DNS-t állítunk elő lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint.

5. példa

pOGO249 plazmid megalkotása

A. *E. coli* K12 RV308/pCZR111 tenyésztése és pCZR111 plazmid izolálása

Az *E. coli* K12 RV308/pCZR111 liofilizátumait az NRRL-től szerezzük be, ahol ez az NRRL B-18249 deponálási számon található. A liofilizátumot L tápközegben állítjuk helyre; az így létrejött tenyészetet alkalmazzuk pCZR111 plazmid előállítására, lényegében az 1. példában leírt eljárás szerint. Mivel azonban a pCZR111 plazmidban levő szelektálható marker a tetraciklin rezisztencia átadó gén, a tenyészközeget tartalmaz 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciklint is, de nem tartalmaz ampicillint. Ezen kívül a tenyészetet 25–30 °C hőmérsékleten inkubáljuk 37 °C helyett, hogy megakadályozzuk az átrfódást a lambda pL promotorból. Mintegy 1 ng pCZR111 plazmid DNS-t kapunk ezzel az eljárással, és ezt feloldjuk ~1 ml 0,1X TE pufferben. A pCZR111 restrikciós hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 3. ábra mutatja be.

B. A pCZR111 plazmid ~5,8 kb-s *XbaI*-*BamHI*

restrikciós fragmentumának izolálása

Mintegy 25 μg (25 μl 0,1X TE pufferben) pCZR111 plazmid DNS-t, amelyet az 5.A. példában állítottunk elő, hozzáadunk 40 μl 10X *XbaI* pufferhez [500 mmol/l trisz-HCl (pH= 8,0); 500 mmol/l NaCl, és 100 mmol/l MgCl_2], 335 μl vízhez; 2 μl (50 egység) *BamHI* restrikciós enzimhez; és 3 μl (60 egység) *XbaI* restrikciós enzimhez, és mindezeket összekeverjük. Az így létrejövő reakciókeveréket 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk 90 percen át. A DNS-t etanollal és NaOAc-cal végzett kicsapással koncentráljuk, és centrifugálással összegyűjtjük. A DNS csapadékot újra szuszpendáljuk ~80 ml vízben és ~20 μl 5X terhelő puvverben (70% glicerin, 50 mmol/l EDTA és 1 mg/ml brómfenolkék), és elektroforézisnek vetjük alá ~1,0%-os agaróz gélen, amíg a kívánt ~5,8 kb-s *XbaI*-*BamHI* restrikciós fragmentum világosan elkülönül a másik emésztési terméktől, egy ~600 bp-s *XbaI*-*BamHI* restrikciós fragmentumtól. Az elektroforézisnek alávetett DNS láthatóvá tételét a gél festésével hajtjuk végre etidium-bromid híg oldatával (~1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), és a gél hosszuhullámú UV fénynek tesszük ki.

A kívánt fragmentumot behatároljuk, kimetsszük a gélből és a ~5,8 kb-s *XbaI*-*BamHI* restrikciós fragmentumot kinyerjük D-Gel DNS elektro-eluáló berendezést alkalmazva (Epigene, Box 4817, Baltimore, Maryland 21211) lényegében a gyártó útmutatásai szerint. Két térfogat etanolt adunk a DNS-hez, amelyet az eluáló berendezésből 500 μl 1 mol/literes NaCl-ben nyerünk ki. Az így létrejött oldatot ~20 °C hőmérsékleten inkubáljuk ~5 órán át, majd centrifugáljuk 15.000 fordulat/percnel 20 percen át. A DNS üledéket először 70%-os etanollal öblítjük, majd 100%-os etanollal szárítjuk és újra szuszpendáljuk 20 μl 0,1X TE pufferben. Ez az oldat képezi a kívánt ~5,8 kb-s *XbaI*-*BamHI* restrikciós fragmentumot, mintegy 2 μg mennyiségben, ezt ~20 °C hőmérsékleten tároljuk.

C. A pOGO246 plazmid DNS 1,2 kb-s *NdeI*-*BamHI* restrikciós fragmentumának izolálása

Mintegy 20 μg pOGO246 plazmid DNS-t, amelyet a 4.D. példában állítottunk elő, teljességgel emésztünk *NdeI* restrikciós enzimmel olyan reakciókeverékben, amely 40 μl 10X *SalI* puffert, pOGO246 plazmid DNS-t 20 μl 0,1X TE pufferben, 340 μl vizet, és 10 μl (~80 egység) *NdeI* restrikciós enzimet tartalmaz. A reakciókeveréket 37 °C hőmérsékleten 90 percen át inkubáljuk, és az emésztést úgy vizsgáljuk teljességre, hogy megbizonyosodunk két restrikciós fragmentum megjelenéséről vagyis egy ~1,9 kb-s fragmentum és egy ~3,6 kb-s fragmentum megjelenéséről ~1%-os agaróz analitikai gélen. A reakciókeveréket CHCl_3 -mal extraháljuk, etanollal és NaOAc-cal végzett kicsapással koncentráljuk és centrifugálással összegyűjtjük.

A DNS üledéket újra szuszpendáljuk 400 μl *SalI* pufferben. Mintegy 2 μl (46 egység) *BamHI* restrikciós enzimet adunk a reakciókeverékhez, amelyet azután 37 °C hőmérsékleten inkubálunk 5 percen át. A restrikciót CHCl_3 -mal végzett extrahálással állítjuk

le, és a DNS-t etanollal és NaOAc-cel végzett kicsapással koncentrálnak. A reakció előrehaladását az emésztmény egy alikvotjának futtatásával értékeljük 1%-os analitikai agaróz gélen, és megkeressük a lehetséges restriktions fragmentumok teljes tartományát, amelyek keletkezhetnek a pOGO246 plazmid DNS-en jelen levő BamHI felismerő helyek egy, két vagy három hasításával véletlenszerűen. A DNS-t ezután elektroforézisnek vetjük alá 1%-os preparatív agaróz gélen, amíg a kívánt ~1,2 kb-s NdeI-BamHI restriktions fragmentum elkülönül a többi keletkezett restriktions fragmentumoktól, amelyek között találjuk a BamHI restriktions enzimmel végzett teljes emésztésnél a ~0,20, ~0,47, ~0,58, ~0,65 és ~3,5 kb-s restriktions fragmentumokat, míg a BamHI restriktions enzimmel végzett nem teljes emésztésnél a ~0,67, ~1,1, ~1,3, ~1,7 és ~1,9 kb-s restriktions fragmentumokat. A kívánt ~1,2 kb-s NdeI-BamHI restriktions fragmentumot az 5.B. példában leírtak szerint nyerjük ki. A DNS üledéket újra szuszpendáljuk 10 µl vízben és ez képezi a kívánt ~1,2 kb-s NdeI-BamHI restriktions fragmentum ~1 µg-ját.

D. XbaI-NdeI kapcsoló megalkotása

Két komplementer egyszálú DNS fragmentumot szintetizálhatunk egy automatizált DNS szintetizálóberendezésen, majd ezt követően összeforrasztjuk ezeket úgy, hogy egy kétszálú fragmetum képződjék. Több DNS szintetizáló berendezés ismert a szakterületen és alkalmas ezeknek a fragmentumoknak az előállítására. Az egyik ilyen berendezés az ABS 380A DNS Synthesizer (Applied Biosystems, Inc.). Ezen kívül a fragmentumot hagyományos módon is elő lehet állítani pl. Itakura és munkatársai eljárásával [Science, 198], 1056 (1977) és Crea és munkatársai eljárásával [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)].

Az alábbi kapcsolókat szintetizáljuk:

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTATCGCGA
TTTAAATAAGGAGGAATAACA-3'; és
5'-TATGTTATTCCTTATTTAAATCGCGA
TACATTATTAATACCCT-3'

Mintegy 100–100 pikomólt az egyes egyszálú DNS fragmentumokból kinázzal kezelünk külön-külön reakciókeverékekben, amelyek az egyszálú DNS fragmentumot, 5 µl 10X ligáz puffert, 5 µl 5 mmól/l ATP-t, annyi vizet, hogy a végső reakciótér fogat 50 µl-re álljon be, és 1 µl (~10 Richardson egység) T4 polinukleotid kinázt tartalmaznak. A reakciókeveréket 37 °C hőmérsékleten 30 percig inkubáljuk. A két reakciókeveréket azután 90 °C hőmérsékletre melegítjük, majd hagyjuk lassan lehűlni 4 °C hőmérsékletre, hogy a komplementer egyszálú fragmentumok összeforrasztását optimalizáljuk. Az így létrejött kettős szálú DNS fragmentum az alábbi:

XbaI

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTATCGCGA
TTTAAATAAGGAGGAATAACA-3'
3'-TCCCATAATTATTACATAGCGCTAA-
ATTTATTCCTCCTTATTGTAT-5'

NdeI

E. A pOGO249 plazmid és az E. coli K12

JM109/pOGO249 plazmid végső megalkotása

1 µl (0,1 µg) pCZR111 plazmid ~5,8 kb-s XbaI-BamHI restriktions fragmentumot, 1 µl pOGO246 plazmid ~1,2 kb-s NdeI-BamHI restriktions fragmentumot és 1 µl szintetikus XbaI-NdeI DNS fragmentumot ligálunk lényegében a 2.C. példában leírt eljárás szerint. A ligált DNS alkotja a kívánt pOGO249 plazmidot. A pOGO249 plazmid restriktions hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 4. ábra mutatja be. A ligálási reakciókeveréket kompetens E. coli K12 JM109 sejtekbe (Stratagene) transzformáljuk, lényegében a gyártó cég útmutatásai szerint. A transzformáló keveréket L-agar lemezekre szélesztjük, amely tetraciklint is tartalmaz (10 µg/ml), és a lemezeket 25 °C–30 °C hőmérsékleten inkubáljuk, hogy megakadályozzuk az átírást a lambda pL promotorból. A kívánt transzformánsokat tetraciklin-rezisztens fenotípusuk, valamint plazmid DNS-ük restriktions enzim elemzése alapján azonosítjuk, amely DNS-eket a 4.D. példában leírtak szerint állítunk elő.

6. példa

E. coli által termelt izopenicillin N szintetáz vizsgálata

25 A. E. coli K12 JM109/pOGO249 tenyésztése izopenicillin N szintetáz aktivitás kifejeződéséhez

E. coli K12 JM109 pOGO249 izolátumot inokulálunk ~5 ml L-tápközegbe, amely 10 µg/ml tetraciklint is tartalmaz, és a tenyészetet levegőn rázó inkubáló berendezésen inkubáljuk 30 °C hőmérsékleten ~18 órán át. 1,5 ml-t használunk ebből a tenyészetből 15 ml L-tápközeg inokulálására, amely 10 µl/ml tetraciklint is tartalmaz, és az így létrejött tenyészetet 42 °C hőmérsékleten 6 órán át inkubáljuk.

35 6 órás, 42 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után a tenyészetet centrifugáljuk és a sejttöledéket újra szuszpendáljuk ~1 ml IPNS extraháló pufferban [0,05 mmól/l trisz-HCl (pH= 8,0); 0,01 mól/l KCl; és 0,1% Triton X-100]. A sejteket ultrahangos kezelésnek vetjük alá hat, tíz másodperces lökéssel, amelyeket Sonifier Cell Disruptor, Model W-225 berendezéssel idézünk elő (Het Systems-Ultrasonics Inc., Plainview, Long Island, New York), mikro-csúcsot alkalmazva. Az időköz az ultrahangos kezelés lökései között 30 másodperc, és a keveréket ennek a munkamenetnek a során jégcetben tartjuk. Az ultrahangos kezelés után a sejtkeveréket centrifugáljuk, hogy eltávolítsuk a sejttöledéket, és ezután ezt a keveréket alkalmazzuk közvetlenül a vizsgálatban.

50 B. Vizsgálat izopenicillin N szintetáz aktivitásra

Az itt következő vizsgálati munkamenet Shen és munkatársai eljárásából származik [J. of Antibiotics 37,(9), 1044–1048 (1984)]. Az izopenicillin N szintetáz vizsgálati reakciót 500 µl össztérfogatban hajtjuk végre. Kiindulásként 1 ml oldatot, amely 1,4 mmól/l δ-(L-α-amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valint és 3,75 mmól/l DTT-t tartalmaz, hagyunk reagálni szobahőmérsékleten 30 percig, hogy minden dimer tripeptid monomer formájúvá redukálódjék. Eközben különböző mennyiségű sejtkivonatokat vízzel 350 µl-re hígít-

va 1,5 ml-es csövekbe osztunk el. Az egyes csövekbe 50 µl-es alikvotokat mérünk az alábbi oldatból: 500 mmól/l Trisz-HCl (pH= 7,4); 100 mmól/l KCl; 100 mmól/l MgSO₄; 2,0 mmól/l FeSO₄ és 6,7 mmól/l aszkorbinsav. Végül a tripeptid oldat 100 µl-es alikvotjait adjuk hozzá az egyes csövekhez; ez a hozzáadás indítja be a reakciót. Az egyes csöveket Vortex berendezésen felkeverjük a szubsztrátum hozzáadásakor és inkubáljuk enyhe keverés mellett szobahőmérsékleten 30–45 percig.

Inkubálás után 2 150 µl-es mintát veszünk ki és biológiai vizsgáló (bioassay) lemezek üregeibe visszük; a minta megmaradó részéhez 100 egység penicillináz A-t adunk. A penicillináz A-t a Riker's Laboratories, Inc.-től szerezjük be; ezt az enzimet 100 000 egységet tartalmazó ampullákban hozzák forgalomba, ezt 5 ml H₂O-val rehidráljuk. 5 ml (100 egység) rehidrált penicillináz A-t adunk az egyes reakciókeverékek megmaradó részéhez, 5 percig hagyjuk reagálni szobahőmérsékleten, majd 100 µl-t adunk a biológiai vizsgáló lemez üregeibe az egyes penicillináz A-val kezelt extraktumokból. Ezt a penicillináz A kezelést azért véghezvük, hogy ellenőrizzük azokat a zónákat a biológiai vizsgálólemezen, amelyek penicillin jelenlétének és a nem cefalosporin vagy más szennyezések jelenlétének tulajdoníthatók.

A biológiai vizsgáló lemez K131 tápagarból áll, amelyet úgy készítünk, hogy feloldunk 30,5 g BBL Antibiotic Medium 1-et (Bevton Dickinson & Company, Cockeysville, Maryland) 1 liter ionmentesített vízben, forralással oldatba visszük, 70 °C hőmérsékletre lehűtjük, majd 35 percen át autoklávozzuk 121 °C hőmérsékleten és ~10⁵ Pa többlet nyomáson. A lemezeket beoltjuk *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) friss, egy éjszakán át nőtt tenyészetével, 4 ml tenyészetet alkalmazva 700 ml agarra. A *M. luteus* K544 folyékony tápközegen növesztjük, amely az alábbiakból áll, 1 liter vízben: 5,0 g Difco pepton; 1,5 g élesztőkivonat; 3,5 g nátrium-klorid; 3,7 g dikálium-foszfát (vízmentes); 1,3 g monokálium-foszfát; 1,5 g Difco marhahús-kivonat; az oldatot felforraljuk, lehűtjük 25 °C hőmérsékletre, 1 n HCl-lel vagy 1 n NaOH-val pH-ját 7,0-ra állítjuk be, majd 20 percen át autoklávozzuk 121 °C hőmérsékleten és ~10⁵ Pa többletnyomáson felhasználás előtt. A beoltott agart 100x15 mm-es lemezekre terítjük el, lemezenként 15 ml beoltott agart használva fel. Az üregeket úgy alakítjuk ki, hogy szívást alkalmazunk, eldobható 5 ml-es pipettákat alkalmazva; minden üreg 10 mm átmérőjű.

Miután a lemezeket elkészítettük és a mintákat az üregekbe szétosztottuk, a lemezeket 37 °C hőmérsékletű inkubátorba helyezzük 18 órára. A vizsgálati eredményeket úgy határozzuk meg, hogy megmérjük a feltisztult területek átmérőjét az egyes minta-üregek körül; ezek a feltisztult területek annak eredményeképpen alakulnak ki, hogy a *Micrococcus luteus* nem képes növekedni, amikor penicillin van jelen.

A vizsgálati eredmények azt demonstrálják, hogy az *E. coli* K12 RV308/pOGO249 transzformánsok fejeznek ki izopenicillin N szintetáz aktivitást.

SZABADALMIIGÉNYPONTOK

1. Eljárás *Streptomyces lipmanii* IPNS aktivitás kifejezésére rekombináns *E. coli* gazdasejtben, *azzal jellemezve*, hogy

(1) *E. coli* gazdasejtet, egy *E. coli* gazdasejtben működőképes promotort és translációs aktiváló szekvenciát és a promotor után egy *Streptomyces lipmanii* izopenicillin N szintetáz kódoló DNS szekvenciát tartalmazó rekombináns DNS kifejező vektorral transzformálunk, és

(2) az (1) lépésben transzformált gazdasejtet tenyésztjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi aminosavgyökök szekvenciát kódoló DNS szekvenciát alkalmazzuk:

H₂N-Met Pro Val Leu Met Pro Ser Ala Asp Val Pro Thr Ile Asp

Ile Ser Pro Leu Phe Gly Thr Asp Pro Asp Ala Lys Ala His Val

Ala Arg Gln Ile Asn Glu Ala Cys Arg Gly Ser Gly Phe Phe Tyr

Ala Ser His His Gly Ile Asp Val Arg Arg Leu Gln Asp Val Val

Asn Glu Phe His Arg Thr Met Thr Asp Gln Glu Lys His Asp Leu

Ala Ile His Ala Tyr Asn Glu Asn Asn Ser His Val Arg Asn Gly

Tyr Tyr Met Ala Arg Pro Gly Arg Lys Thr Val Glu Ser Trp Cys

Tyr Leu Asn Pro Ser Phe Gly Glu Asp His Pro Met Ile Lys Ala

Gly Thr Pro Met His Glu Val Asn Val Trp Pro Asp Glu Glu Arg

His Pro Asp Phe Arg Ser Phe Gly Glu Gln Tyr Tyr Arg Glu Val

Phe Arg Leu Ser Lys Val Leu Leu Leu Arg Gly Phe Ala Leu Ala

Leu Gly Lys Pro Glu Glu Phe Phe Glu Asn Glu Val Thr Glu Glu

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ser Leu Met Ile Arg Tyr Pro Tyr Leu

Asp Pro Tyr Pro Glu Ala Ala Ile Lys Thr Gly Pro Asp Gly Thr

Arg Leu Ser Phe Glu Asp His Leu Asp Val Ser Met Ile Thr Val

Leu Phe Gln Thr Glu Val Val Asn Leu Gln Val Glu Thr Val Asp

Gly Trp Bln Ser Leu Pro Thr Ser Gly Glu Asn Phe Leu Ile Asn

Cys Gly Thr Tyr Leu Gly Tyr Leu Thr Asn Asp Tyr Phe Pro Ala

Pro Asn His Arg Val Lys Tyr Val Asn Ala Glu Arg Leu Ser Leu

Pro Phe Phe Leu His Ala Gly Gln Asn Ser Val Met Lys Pro Phe

His Pro Glu Asp Thr Gly Asp Arg Lys Leu Asn Pro Ala Val Thr

Tyr Gly Glu Tyr Leu Gln Gln Gly Phe His Ala Leu Ile Ala Lys

Asn Val Gln Thr -COOH

ahol ALA jelentése alanin gyök, ARG jelentése arginin gyök, ASN jelentése aszparagin gyök, ASP jelentése aszparaginsav gyök, CYS jelentése cisztein gyök, GLN jelentése glutamin gyök, GLU jelentése glutaminsav gyök, GLY jelentése glicin gyök, HIS jelentése hisztidin gyök, H₂N- jelentése az amino-terminális, ILE jelentése izoleucin gyök, LEU jelentése leucin gyök, LYS jelentése lizin gyök, MET jelentése metionin gyök, PHE jelentése fenilalanin gyök, PRO jelentése prolin gyök, SER jelentése szerin gyök, THR jelentése treonin gyök, TRP jelentése triptofán gyök, TYR jelentése tirozin gyök, és VAL jelentése valin gyök.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi DNS szekvenciát tartalmazó DNS-szekvenciát alkalmazzuk:

5'-ATGCCTGTCCTGATGGCGTCGGCCGAC
GTGCCGACGATCGACATCTCCCCCTGTTCG
GG

ACCGACCCGGACGCCAAGGCGC³ACGTGC
CGCGGCAGATCAACGAGGCCTGCCGCGGTT
CG

GGCTTCTTCTACGCCTCCCACCACGGCATC
GACGTGCGGCGGCTGCAGGACGTGGTCAAC
GAGTTCCACCGGACCATGACCGACCAGGA
GAAGCGACCTGGCGATCCACGCGTACAAC
GAGAACAACCTCGCATGTGCGCAACGGTT
ATTACATGGCCCGCCCGGCCGGAAGACCGTC
GAGTCCTGGTGCTACCTGAACCCGTCGTT
CGGCGAGGACCAACCGATGATCAAGGCCG
GG

ACGCCGATGCACGAGGTGAACGTCTGGC
CGGACGAGGAACGCCATCCGGACTTCCGGT
CC

TTCGGCGAGCAGTACTACCGCGAGGTGTT
CCGGCTCTCGAAGGTGCTGCTGCGGGC
TTCGCGCTGGCGCTCGGCAAGCCGGAGG
AGTTCTTCGAGAACGAGGTCACCGAGGAG
GAC

ACCTCTCTCTGCCGATCTCTGATGATCCGG
TACCCGTACCTGGATCCGTACCCGGAAGCG
GCGATCAAGACGGGCCCCGGACGGCACCA
GGCTCAGCTTCGAGGACCACCTCGACGTGT
CG

ATGATCACCGTCTCTGTTCCAGACCGAGGT
GCAGAACCTCCAGGTCGAGACGGTGGACG
GG

TGGCAGAGCCTGCCGACGTCCGGGGAGA
ACTTCTGATCAACTGCGGCACCTACCTCGGG
TACCTCACGAACGACTACTTCCCGGCCCC
CAACCACCGGGTCAAGTACGTCAACGCGGAA
CGCCTGTCCCTGCCGTCTTCTTCCACGCC
GGGACAGACAGCGTGATGAAGCCGTTCCAC
CCGGAGGACACCGGCGACCGGAAGCTCA
ACCCGGCCGTCACGTACGGGGAGTACCTGA
CAA

GAGGGCTTCCACGCGCTGATCGCGAAGA
ACGTCCAGACC-3'

ahol A jelentése dezoxi-adenil, G jelentése dezoxi-guanil, C jelentése dezoxi-citidil és T jelentése timidil

csoport.

4. Eljárás rekombináns DNS vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy DNS-vektorba beépítünk

- a) egy E. coli gazdasejtben működőképes promotort és aktivációs szekvenciát, és
- 5 b) a promotor után egy Streptomyces lipmanii IPNS-t kódoló DNS-szekvenciát.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az IPNS aktivitást kódoló DNS szekvenciaként az alábbi aminosav-szekvenciát kódoló DNS-t alkalmaz-

50 zuk:
H₂N-Met Pro Val Leu Met Pro Ser Ala Asp Val Pro Thr Ile Asp

Ile Ser Pro Leu Phe Gly Thr Asp Pro Asp Ala Lys Ala His Val

Ala Arg Gln Ile Asn Glu Ala Cys Arg Gly Ser Gly Phe Phe Tyr

Ala Ser His His Gly Ile Asp Val Arg Arg Leu Gln Asp Val Val

20 Asn Glu Phe His Arg Thr Met Thr Asp Gln Glu Lys His Asp Leu

Ala Ile His Ala Tyr Asn Glu Asn Asn Ser His Val Arg Asn Gly

Tyr Tyr Met Ala Arg Pro Gly Arg Lys Thr Val Glu Ser Trp Cys

25 Tyr Leu Asn Pro Ser Phe Gly Glu Asp His Pro Meg Ile Lys Ala

Gly Thr Pro Met His Glu Val Asn Val Trp Pro Asp Glu Glu Arg

30 His Pro Asp Phe Arg Ser Phe Gly Glu Gln Tyr Tyr Arg Glu Val

Phe Arg Leu Ser Lys Val Leu Leu Leu Arg Gly Phe Ala Leu Ala

Leu Gly Lys Pro Glu Glu Phe Phe Glu Asn Glu Val Thr Glu Glu

35 Asp Thr Leu Ser Cys Arg Ser Leu Met Ile Arg Tyr Pro Tyr Leu

Asp Pro Tyr Pro Glu Ala Ala Ile Lys Thr Gly Pro Asp Gly Thr

40 Arg Leu Ser Phe Glu Asp His Leu Asp Val Ser Met Ile Thr Val

Leu Phe Gln Thr Glu Val Val Asn Leu Gln Val Glu Thr Val Asp

Gly Trp Bln Ser Leu Pro Thr Ser Gly Glu Asn Phe Leu Ile Asn

45 Cys Gly Thr Tyr Leu Gly Tyr Leu Thr Asn Asp Tyr Phe Pro Ala

Pro Asn His Arg Val Lys Tyr Val Asn Ala Glu Arg Leu Ser Leu

50 Pro Phe Phe Leu His Ala Gly Gln Asn Ser Val Met Lys Pro Phe

His Pro Glu Asp Thr Gly Asp Arg Lys Leu Asn Pro Ala Val Thr

Tyr Gly Glu Tyr Leu Gln Gln Gly Phe His Ala Leu Ile Ala Lys

55 Asn Val Gln Thr -COOH

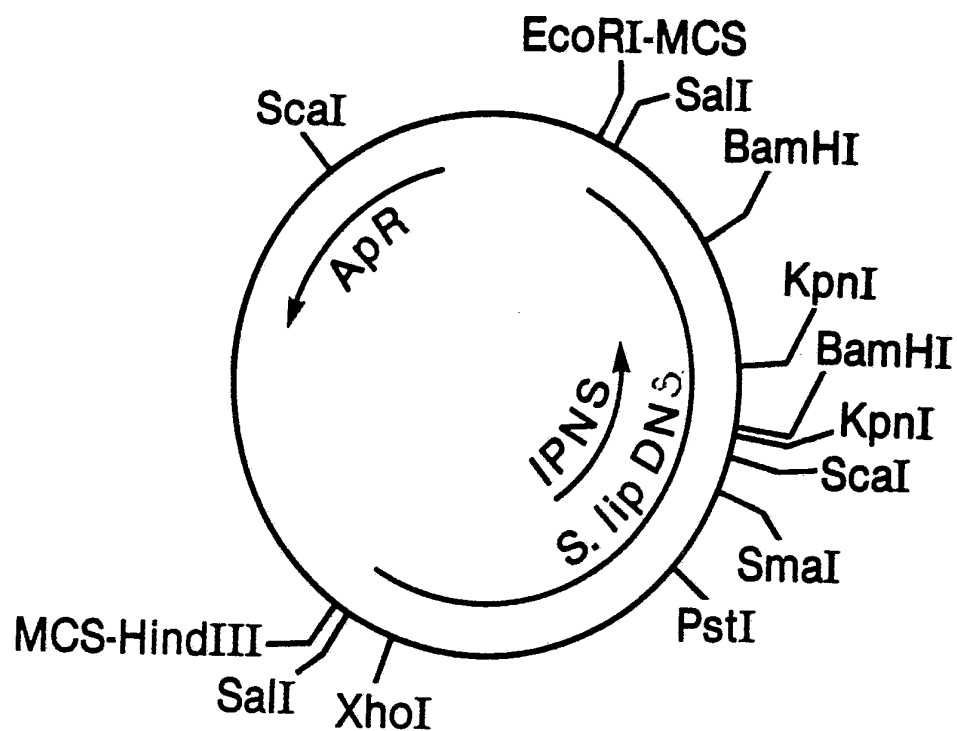
ahol ALA jelentése alanin gyök, ARG jelentése arginin gyök, ASN jelentése aszparagin gyök, ASP jelentése aszparaginsav gyök, CYS jelentése cisztein gyök, GLN jelentése glutamin gyök, GLU jelentése gluta-

minsav gyök, GLY jelentése glicin gyök, HIS jelentése hisztidin gyök, H_2N - jelentése az amino-terminális, ILE jelentése izoleucin gyök, LEU jelentése leucin gyök, LYS jelentése lizin gyök, MET jelentése metio-

nin gyök, PHE jelentése fenilalanin gyök, PRO jelentése prolin gyök, SER jelentése szerin gyök, THR jelentése treonin gyök, TRP jelentése triptofán gyök, TYR jelentése tirozin gyök, és VAL jelentése valin gyök.

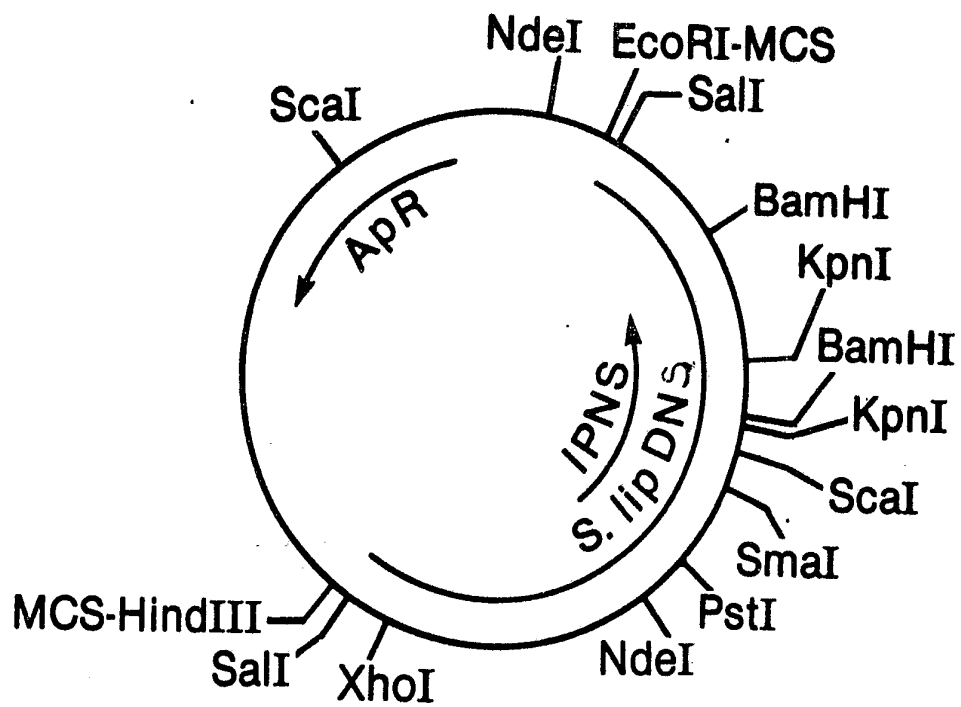
1. ábra

A pOG0239 plazmid restrikciós helyei és funkcionális térképe
(5.500 bp)



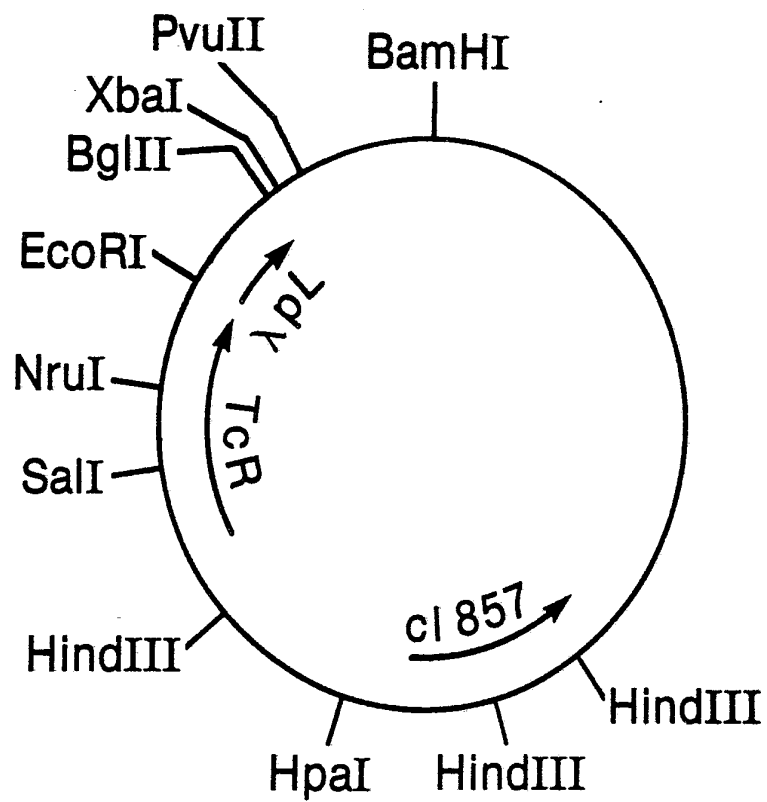
2. ábra

A pOG0246 plazmid restrikciós helyei és funkcionális térképe
(5.500 bp)



5. ábra

A pCZR111 plazmid restrikciós helyei és funkcionális térképe
(6.395 bp)



h. abra

A pOG0249 plazmid restrikciós helyei és funkcionális térképe
(7.186 bp)

