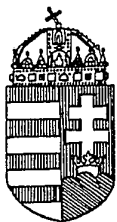


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

204 568 B

(21) A bejelentés száma: 3692/85
(22) A bejelentés napja: 1985. 09. 26.
(30) Elsőbbségi adatok:
654 919 1984. 09. 27. US
(83) Letétbe helyezés: ATCC 11550; ATCC 44773; ATCC
37084; ATCC 37051; ATCC 37061; ATCC 37060; ATCC
31911; ATCC 31912; NRRL B-15211; NRRL B-15210;
NRRL B-15604; NRRL B-15894; NRRL B-15888;

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/80

C 12 N 15/54

(40) A közzététel napja: 1986. 06. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1992. 01. 28. SZKV 92/01

(72) Feltalálók:

jr. Chapman, Jerry Lee, Speedway, Indiana (US)
Ingolia, Thomas Dominick, Indianapolis, Indiana (US)
Kaster, Kevin Ray, Indianapolis, Indiana (US)
Queener, Stephen Wyatt, Indianapolis, Indiana (US)
Skatrud, Paul Luther, Greenwood, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

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

(54)

Eljárás Cephalosporium sejt transzformálására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás Cephalosporium gazdasejtek transzformálására, melynek során

1) higromicin-foszfotranszferázt kódoló szakaszt és ennek kifejeződését elősegítő módon elhelyezett *Saccharomyces cerevisiae* transzkripció és transláció aktiváló szakaszt és autonóm replikációt lehetővé tevő szakaszt vagy a gazdagenommal homológ régiót tartalmazó rekombináns DNS-vektort juttatnak *Cephalosporium* gazdasejtbe és

2) az említett gazdasejtet higromicint tartalmazó tápközegben növesztik.

HU 204 568 B

A jelen találmány tárgya eljárás a cefalosporintermelő gombák genetikai, transzformálására. Jelenleg világszerte a *Cephalosporium acremonium* törzset használják a gyártó üzemekben a cefalosporin-C, a klinikai gyakorlatban fontos cefém antibiotikumok kiindulási anyaga gyártására. A genetikai transzformációs rendszer lényege a megfelelő transzformációs körülmények, valamint a *Cephalosporium acremonium*ban és rokon fajokban gének bejuttatását és kifejeződését lehetővé tevő rekombináns DNS-klónozó vektorok. Az ilyen bejuttatás eredményeképpen új genotípusú – a transzformánsokban meglevő, de a transzformálatlan szülőkből hiányzó – *Cephalosporium* transzformánsokat állítunk elő.

Ez idáig a rekombináns DNS-technológia kifejlesztése és kihasználása késést szenvedett és különösen nehéz volt a *Cephalosporium* és rokon fajoknál a rekombináns DNS-klónozó vektorok és a transzformációs módszerek hiánya miatt. Tény, hogy a jelen találmány előtt a *Cephalosporiumot* nem sikerült transzformálni vagy a rekombináns DNS-technikával manipulálni. A jelen találmány alkalmazható a *Cephalosporiumokra* általában, ezáltal lényeges előrehaladást jelent a szakterületen.

A jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazott vektorok különösen hasznosak, mivel viszonylag kicsinyek, sokoldalúak és bármely olyan *Cephalosporium* sejtbe transzformálhatók és ott szelektálhatók, amelyek érzékeny arra az antibiotikumra, amelyre való rezisztenciát hordoz az adott vektor. Mivel számos, a klinikai gyakorlatban fontos cefalosporin antibiotikumot a *Cephalosporium acremonium* metabolitjából, a cefalosporin-C-ből állítanak elő, kívánatos olyan klónozó módszerek és vektorok kifejlesztése, melyek használhatók ennél az iparilag fontos mikroorganizmusnál. A jelen találmány olyan módszereket és vektorokat nyújt, melyek teljes géncsoportok *Cephalosporium* fajokban való klónozását teszik lehetővé, akár ismert antibiotikumok termelésének növelése, akár új antibiotikumok és antibiotikum-származékok előállítására céljából.

A jelen találmány szerinti eljárás nemcsak vektorokat és DNS-klónozási módszereket nyújt *Cephalosporium* gazdasejtek számára, hanem módszert is a transzformánsok egyszerű szelektálására. Mivel a transzformáció igen alacsony gyakoriságú esemény, gyakorlati szükségesség van annak, hogy meghatározzuk a sejtek milliói közül, melyik tartalmazza a vektor DNS-t. Ez azért fontos, mert a vektorokba nem szelektálható DNS-szakaszokat építhetünk, és a transzformáció után a DNS-t tartalmazó sejteket megfelelő szelektációs módszerekkel izolálhatjuk.

Az alább ismertetett szabadalmi leírásban a következő szakkifejezéseket alkalmazzuk.

Rekombináns DNS-klónozó vektor – bármely a kromoszómába való beépülésre vagy autonóm replikációra alkalmas ágens, ideértve, de nem korlátozva magunkat a plazmidokra, amely olyan DNS-molekula, melyhez egy vagy több DNS-szakaszt adhatunk.

Transzformálás – DNS bejuttatása befogadó gazdasejtbe.

Transzformáns – transzformáción átesett befogadó gazdasejt.

Restrikciós fragment – bármely egy vagy több restrikciós enzim hatására keletkező lineáris DNS-fragment.

Transzkripció aktiválós szakasz – a DNS-nek messenger RNS-sé (mRNS) való átírását kódoló DNS-szakasz.

Transzlációs aktiválós szakasz – a mRNS-nek polipeptiddé való lefordítását kódoló DNS-szakasz.

Funkcionális polipeptid – kinyerhető, biológiailag aktív, teljes egészében heterológ vagy homológ polipeptid vagy prekursor; kinyerhető, biológiailag aktív polipeptid, mely egy heterológ polipeptidet és egy homológ polipeptidet vagy annak egy részét tartalmazza; vagy egy kinyerhető, biológiailag inaktív fúziós polipeptidet, amely egy heterológ polipeptidet és egy specifikusan lehasítható biológiailag inaktíváló homológ polipeptidet tartalmaz.

Fúziós géntermék – kinyerhető heterológ polipeptid, amely egy fehérjével vagy homológ polipeptiddel képez fúziós terméket.

Gazdasejt – transzformálásra alkalmas sejt, ideértve az élő protoplasztokat.

Az ábrák leírása

1. ábra – A pIT221 plazmid restrikciós térképe

2. ábra – A pIT123 plazmid restrikciós térképe

3. ábra – A pIT143 plazmid restrikciós térképe

4. ábra – A pIT213 plazmid restrikciós térképe

5. ábra – A pPS1 plazmid restrikciós térképe

6. ábra – A pIT220 plazmid restrikciós térképe

7. ábra – A pIT219 plazmid restrikciós térképe

8. ábra – A pPS6 plazmid restrikciós térképe.

A jelen találmány tárgya eljárás *Cephalosporium* gazdasejt transzformálására, azzal jellemezve, hogy

1) rekombináns DNS-klónozó vektort juttatunk *Cephalosporium* gazdasejtbe, és az említett vektor a higromcin-B foszfortranszferázt kódoló szakasz kifejeződését biztosító, *Saccharomyces cerevisiae* transzkripció és transzlációs aktiválós szakaszt tartalmaz, és

2) az említett gazdasejtet az említett DNS-vektormolekulának az említett gazdasejtben való fennmaradását biztosító szelektív körülmények között növesztjük. A rekombináns klónozó vektor tartalmazhat továbbá

egy vagy több

1) *Cephalosporium*ban működő autonóm replikációs szakaszt,

2) *Escherichia coli* replikációs origót és egy *Escherichia coli*ban szelektálható fenotípust biztosító szakaszt,

3) *Cephalosporium* riboszómális génszakaszt,

4) *Cephalosporium* funkcionális polipeptidet kódoló szakasz kifejeződése céljából megfelelő helyre helyezett transzkripció és transzlációs aktiválós szakaszt és

5) *Streptomyces* replikációs origót és egy *Streptomyces*ben szelektálható fenotípust biztosító szakaszt.

A találmány foglalkozik továbbá az alább ismertetett módszer végrehajtásánál alkalmazott, fent említett rekombináns DNS-klónozó vektorral és a keletkező transzformánsokkal.

A jelen találmány lehetővé teszi a *Cephalosporium* sejtek genetikai transzformálását, miáltal új genotípusú transzformánsokat állítunk elő. Ezek a transzformánsok polipeptideket kódoló DNS-szakaszokat, szabályozó DNS-molekulákat vagy strukturális ribonukleinsav-molekulákat kódoló DNS-szakaszokat tartalmazó vektor bejuttatása eredményeképpen jönnek létre. A jelen módszer, vektorok és transzformációs körülmények különösen jól használhatók természetes vagy megváltoztatott idegen vagy *Cephalosporium* DNS klónozá-

ra és kifejezésére. A megváltozott összetételű szakaszokat a klónozott természetes szakaszoknak standard rekombináns DNS-technikákkal való *in vitro* módosításával kaphatjuk.

5 A jelen transzformációs eljárás során alkalmazott minden egyes vektor tartalmaz a *Cephalosporium*-ban szelektálható tulajdonságot kódoló szakaszt. Egy előnyben részesített szakasz, melyet az alábbiakban illusztrációs céllal mutatunk be, higromicin-B-foszfofotranszferázt kódol és összetétele a következő:

													Rm
													R ¹ m
													LYS
R2n	CCT	GAA	CTC	ACC	GCG	ACG	TCT	GTC	GAG	AAG	TTT	CTG	
R3n	GGA	CTT	GAG	TGG	CGC	TGC	AGA	CAG	CTC	TTC	AAA	GAC	
LYS	PRO	GLU	LEU	THR	ALA	THR	SER	VAL	GLU	LYS	PHE	LEU	
ATC	GAA	AAG	TTC	GAC	AGC	GTC	TCC	GAC	CTG	ATG	CAG	CTC	
TAG	CTT	TTC	AAG	CTG	TCG	CAG	AGG	CTG	GAG	TAC	GTC	GAG	
ILE	GLU	LYS	PHE	ASP	SER	VAL	SER	ASP	LEU	MET	GLN	LEU	
TCG	GAG	GGC	GAA	GAA	TCT	CGT	GCT	TTC	AGC	TTC	GAT	GTA	
AGC	CTC	CCG	CTT	CTT	AGA	GCA	CGA	AAG	TCG	AAG	CTA	CAT	
SER	GLU	GLY	GLU	GLU	SER	ARG	ALA	PHE	SER	PHE	ASP	VAL	
GGA	GGG	CGT	GGA	TAT	GTC	CTG	CGG	GTA	AAT	AGC	TGC	GCC	
CCT	CCC	GCA	CCT	ATA	CAG	GAC	GCC	CAT	TTA	TCG	ACG	CGG	
GLY	GLY	ARG	GLY	TYR	VAL	LEU	ARG	VAL	ASN	SER	CYS	ALA	
GAT	GGT	TTC	TAC	AAA	GAT	CGT	TAT	GTT	TAT	CGG	CAC	TTT	
CTA	CCA	AAG	ATG	TTT	CTA	GCA	ATA	CAA	ATA	GCC	GTG	AAA	
ASP	GLY	PHE	TYR	LYS	ASP	ARG	TYR	VAL	TYR	ARG	HIS	PHE	
GCA	TCG	GCC	GCG	CTC	CCG	ATT	CCG	GAA	GTG	CTT	GAC	ATT	
CGT	AGC	CGG	CGC	GAG	GGC	TAA	GGC	CTT	CAC	GAA	CTG	TAA	
ALA	SER	ALA	ALA	LEU	PRO	ILE	PRO	GLU	VAL	LEU	ASP	ILE	
GGG	GAA	TTC	AGC	GAG	AGC	CTG	ACC	TAT	TGC	ATC	TCC	CGC	
CCC	CTT	AAG	TCG	CTC	TCG	GAC	TGG	ATA	ACG	TAG	AGG	GCG	
GLY	GLU	PHE	SER	GLU	SER	LEU	THR	TYR	CYS	ILE	SER	ARG	
CGT	GCA	CAG	GGT	GTC	ACG	TTG	CAA	GAC	CTG	CCT	GAA	ACC	
GCA	CGT	GTC	CCA	CAG	TGC	AAC	GTT	CTG	GAC	GGA	CTT	TGG	
ARG	ALA	GLN	GLY	VAL	THR	LEU	GLN	ASP	LEU	PRO	GLU	THR	
GAA	CTG	CCC	GCT	GTT	CTG	CAG	CCG	GTC	GCG	GAG	GCC	ATG	
CTT	GAC	GGG	CGA	CAA	GAC	GTC	GGC	CAG	CGC	CTC	CGG	TAC	
GLU	LEU	PRO	ALA	VAL	LEU	GLN	PRO	VAL	ALA	GLU	ALA	MET	
GAT	GCG	ATC	GCT	GCG	GCC	GAT	CTT	AGC	CAG	ACG	AGC	GGG	
CTA	CGC	TAG	CGA	CGC	CGG	CTA	GAA	TCG	GTC	TGC	TCG	CCC	
ASP	ALA	ILE	ALA	ALA	ALA	ASP	LEU	SER	GLN	THR	SER	GLY	

TTC GGC CCA TTC GGA CCG CAA GGA ATC GGT CAA TAC ACT
 AAG CCG GGT AAG CCT GGC GTT CCT TAG CCA GTT ATG TGA
 PHE GLY PRO PHE GLY PRO GLN GLY ILE GLY GLN TYR THR

 ACA TGG CGT GAT TTC ATA TGC GCG ATT GCT GAT CCC CAT
 TGT ACC GCA CTA AAG TAT ACG CGC TAA CGA CTA GGG GTA
 THR TRP ARG ASP PHE ILE CYS ALA ILE ALA ASP PRO HIS

 GTG TAT CAC TGG CAA ACT GTG ATG GAC GAC ACC GTC AGT
 CAC ATA GTG ACC GTT TGA CAC TAC CTG CTG TGG CAG TCA
 VAL TYR HIS TRP GLN THR VAL MET ASP ASP THR VAL SER

 GCG TCC GTC GCG CAG GCT CTC GAT GAG CTG ATG CTT TGG
 CGC AGG CAG CGC GTC CGA GAG CTA CTC GAC TAC GAA ACC
 ALA SER VAL ALA GLN ALA LEU ASP GLU LEU MET LEU TRP

 GCC GAG GAC TGC CCC GAA GTC CGG CAC CTC GTG CAC GCG
 CGG CTC CTG ACG GGG CTT CAG GCC GTG GAG CAC GTG CGC
 ALA GLU ASP CYS PRO GLU VAL ARG HIS LEU VAL HIS ALA

 GAT TTC GGC TCC AAC AAT GTC CTG ACG GAC AAT GGC CGC
 CTA AAG CCG AGG TTG TTA CAG GAC TGC CTG TTA CCG GCG
 ASP PHE GLY SER ASN ASN VAL LEU THR ASP ASN GLY ARG

 ATA ACA GCG GTC ATT GAC TGG AGC GAG GCG ATG TTC GGG
 TAT TGT CGC CAG TAA CTG ACC TCG CTC CGC TAC AAG CCC
 ILE THR ALA VAL ILE ASP TRP SER GLU ALA MET PHE GLY

 GAT TCC CAA TAC GAG GTC GCC AAC ATC TTC TTC TGG AGG
 CTA AGG GTT ATG CTC CAG CGG TTG TAG AAG AAG ACC TCC
 ASP SER GLN TYR GLU VAL ALA ASN ILE PHE PHE TRP ARG

 CCG TGG TTG GCT TGT ATG GAG CAG CAG ACG CGC TAC TTC
 GGC ACC AAC CGA ACA TAC CTC GTC GTC GTC GCG ATG AAG
 PRO TRP LEU ALA CYS MET GLU GLN GLN THR ARG TYR PHE

 GAG CGG AGG CAT CCG GAG CTT GCA GGA TCG CCG CGG CTC
 CTC GCC TCC GTA GGC CTC GAA CGT CCT AGC GGC GGC GAG
 GLU ARG ARG HIS PRO GLU LEU ALA GLY SER PRO ARG LEU

 CGG GCG TAT ATG CTC CGC ATT GGT CTT GAC CAA CTC TAT
 GCC CGC ATA TAC GAG GCG TAA CCA GAA CTG GTT GAG ATA
 ARG ALA TYR MET LEU ARG ILE GLY LEU ASP GLN LEU TYR

 CAG AGC TTG GTT GAC GGC AAT TTC GAT GAT GCA GCT TGG
 GTC TCG AAC CAA CTG CCG TTA AAG CTA CTA CGT CGA ACC
 GLN SER LEU VAL ASP GLY ASN PHE ASP ASP ALA ALA TRP

 GCG CAG GGT CGA TGC GAC GCA ATC GTC CGA TCC GGA GCC
 CGC GTC CCA GCT ACG CTG CGT TAG CAG GCT AGG CCT CGG
 ALA GLN GLY ARG CYS ASP ALA ILE VAL ARG SER GLY ALA

GGG ACT GTC GGG CGT ACA CAA ATC GCC CGC AGA AGC GCG
 CCC TGA CAG CCC GCA TGT GTT TAG CGG GCG TCT TCG CGC
 GLY THR VAL GLY ARG THR GLN ILE ALA ARG ARG SER ALA
 GCC GTC TGG ACC GAT GGC TGT GTA GAA GTA CTC GCC GAT
 CGG CAG ACC TGG CTA CCG ACA CAT CTT CAT GAG CGG CTA
 ALA VAL TRP THR ASP GLY CYS VAL GLU VAL LEU ALA ASP
 AGT GGA AAC CGA CGC CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG
 TCA CCT TTG GCT GCG GGG TCG TGA GCA GGC TCC CGT TTC
 SER GLY ASN ARG ARG PRO SER THR ARG PRO ARG ALA LYS

GAA R⁴

CTT R⁵

GLU,

ahol

A jelentése dezoxi-adenil,

G jelentése dezoxi-guanil,

C jelentése dezoxi-citidil,

T jelentése timidilcsoport;

R és R₂ csoportok jelentése egymástól függetlenül lizint kódoló dezoxiribonukleotid-triplettek,

R₁ és R₃ olyan dezoxiribonukleotid-triplettek, melyekben a bázisok az R és R₂-ben szereplő bázisok komplementerei,

m és n=0 vagy 1, azzal a korlátozással, hogy ha n=0, akkor m=0 és ha m=1, akkor n=1,

R₄ translációs stopkodont kódoló dezoxiribonukleotid-triplett,

R₅ az R₄ bázisokkal komplementer bázisokat tartalmazó dezoxiribonukleotid-triplett.

A fenti DNS-sel kódolt aminosavak az alábbi jelzéseket kapják:

MET: metionin,

LYS: lizin,

PRO: prolin,

GLU: glutaminsav,

LEU: leucin,

THR: treonin,

ALA: alanin,

SER: szerin,

VAL: valin,

PHE: fenil-alanin,

ILE: izoleucin,

GLY: glicin,

ASP: aszparaginsav

GLN: glutamin,

ARG: arginin,

CYS: cisztein,

TRP: triptofán,

ASN: aszparagin,

HIS: hisztidin,

TYR: tirozin.

A fenti szakaszt, melyben R, R₁, R₂, R₃, R₄ és R₅ jelentését a genetikai kód határozza meg (Watson, J. D., 1976. *Molecular Biology of the Gene*, W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, California), szokásos módon a

módosított foszfor-észter-módszerrel szintetizálhatjuk, teljesen védett tridezoxinukleotid-elemek felhasználásával. Ezek a szintetikus módszerek jól ismertek a szakterületen és lényegében Itakura és munkatársai [*Science*, 198, 1056 (1977)], valamint Crea és munkatársai [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5765 (1978)] eljárásával hajthatók végre. A szakember számára nyilvánvaló, hogy a fenti illusztratív DNS-szakasz által kódolt aminosavakkal azonos aminosavakat kódoló, más DNS-szakaszok is szintetizálhatók.

Ezek az eltérő DNS-szakaszok a genetikai kód degenéráltságát mutatják, és egymással helyettesíthetők, valamint használhatók a jelen találmány céljaira.

A fent említett DNS-szakaszok 1014 bázispárból (m=n=0), 1017 bázispárból (m=0, n=1) vagy 1020 bázispárból (m=1, n=1) állnak, és ennek megfelelően a higromicin-B-foszfozotranszferáz utolsó 338, 339 vagy 340 aminosavát kódolják. A továbbiakban ezeket a DNS-szakaszokat „HPT-szakaszok” néven említjük. A fent említett szakaszok által kódolt higromicin-foszfozotranszferáz aminosavait – a továbbiakban csak „HPT-polipeptidek” néven említjük – is specifikáltuk a fentiekben, ez a peptid a higromicin-B foszforilezését katalizálja. Ennek az enzim reakciónak és termékének részletes leírását Rao és munkatársai közölték [*Antimikrob. Ag. Chemother.*, 24, 689 (1983)]. Míg a higromicin-B magnéziumion távollétében letális a *Cephalosporium*-ra, a higromicin-B foszforilezett származéka nem letális, elhanyagolható hatása van csak. Így ha az egyik HPT-polipeptidet kódoló szakasz kifejeződik egy *Cephalosporium*-ban, például *Cephalosporium acremonium*-ban, akkor a sejtek rezisztenssé válnak higromicin-B-re.

A jelen eljárásban használt rekombináns DNS-klónozó vektorokat részben az jellemzi, hogy *Cephalosporium*-ban működő autonóm replikációs szakaszt (ARS) tartalmaznak. Ha vektor ARS-t tartalmaz, ez megnöveli a *Cephalosporium* genetikai transzformációjának gyakoriságát. Ezt úgy igazoltuk, hogy egy ARS-tartalmú plazmida, például pIT221-gyel kapott transzformációs frekvenciát hasonlítottuk a megfelelő dezARS-plazmida kapotthoz. A pIT221 plazmid (lásd 1. ábra) tartalmaz (többek között)

- 1) egy HPT DNS-szakaszt,
- 2) egy *E. coli* replikációs origót,
- 3) egy *E. coli*-ban szelektálható, fenotípust kódoló DNS-szakaszt és
- 4) egy *Cephalosporium*-ban működő ARS-t.

A pIT221 plazmidot jellemzi továbbá, hogy egyetlen *SphI* restrikciós hasítási helyet tartalmaz a fent említett szakaszokon kívül és hogy egy ~0,3 kb méretű *SmaI* fragmentet is kivághatunk belőle, vagy helyettesíthetünk anélkül, hogy valamelyik funkcióját elvesztenénk. Jóllehet az *E. coli*-ban szelektálható fenotípust kódoló DNS-szakasz a bemutatott pIT221 plazmidban ampicillin-rezisztenciát kódol, ezt más, szelektálható szakasszal helyettesíthetjük. Az ilyen szakaszok lehetnek például tetraciklin, kloramfenikol, apramicin és hasonló rezisztenciát kódoló gének, melyek elérhetőek a szakemberek számára.

A *Cephalosporium*-ban működő ARS-t úgy határozzuk meg, hogy az autonóm replikáció képességét hordozza alacsonyrendű eukariótában. Ezt úgy igazoljuk, hogy egy olyan ARS-t tartalmazó plazmid autonóm replikációját figyeljük meg alacsonyrendű eukariótában. Például *Saccharomyces cerevisiae*-ben, amely az adott szervezetben egyébként replikálódni nem képes plazmidból származik. Jóllehet a *Cephalosporium* ARS funkcióját kényelmesen ellenőrizhetjük *Saccharomyces cerevisiae*-ben, a vizsgálat céljára előnyben részesített alacsonyrendű eukariótaszervezet a *Cephalosporium acremonium*. Azért részesítjük előnyben a *Cephalosporium acremonium*-ot, mivel a *Saccharomyces cerevisiae*-ben kimutatott ARS-ek közül csak kevés képes a genetikai transzformáció gyakoriságának növelésére *Cephalosporium acremonium*-ban. A bemutatott pIT221 plazmid esetében a *Cephalosporium* ARS funkcióját vizsgálták élesztőben [Skatrud and Queener, *Current Genetics*, 8, 155–162 (1984), és Tudzynski and Esser, *Current Genetics*, 6, 153 (1982)], és azt is kimutatták, hogy növeli a *Cephalosporium acremonium* transzformációs képességét. A pPS5 plazmidból, melyet úgy állítunk elő, hogy a pIT221-ből eltávolítjuk a ~1,9 kb *PstI* fragmentet, hiányzik az ARS, és kimutatták, hogy csak igen kis gyakorisággal képes a *Cephalosporium*-ot transzformálni. Ennélfogva a jelen találmány céljaira előnyös az ARS-komponens jelenléte.

A pIT221 plazmid azzal jellemezhető még, hogy a foszfolícérát-kináz (PGK) gén transzkripció és transláció aktiválószerkezetét kódoló *Saccharomyces cerevisiae* DNS-szakaszt tartalmaz. Az említett, pIT141 plazmidon található gén egy erős aktiváló szakaszt tartalmaz, melyet egy *MboII* fragmenten lehet kényelmesen izolálni. A pIT141 plazmidot az *Escherichia coli* K12/pIT141 törzsből lehet kinyerni, amely a Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, állandó törzsgyűjteményében van letétbe helyezve. A törzs, amely a plazmid kinyerésére előnyösen használható NRRL B-15602 szám alatt található. A PGK-szakasz helyett más *S. cerevisiae* aktiválószerkezet is használható, például az élesztőhősokk, glikolitikus és más metabolikus gének transzkripció és transláció aktiválószerkezetek. Különösen előnyösek

az YG100 és YG101 gének, melyek konstrukcióját Ingolia és munkatársai írják le (*Molecular and Cellular Biology*, 2 (11), 1388 (1982)].

A transzkripció és transláció aktiválószerkezet tartalmazó plazmidok különösen hasznosak olyan transzformációk előállításában, melyek javított termelőképességgel rendelkeznek a klinikailag fontos cefém antibiotikumok előállításában használható cefém vegyületekre nézve. Még egy erős aktiválószerkezet is, ha idegen forrásból származik, gyengén, vagy egyáltalán nem működik *Cephalosporium*-ban. Azonban a HPT DNS-szakasz idegen aktiválószerkezetrel irányított, alacsony szintű kifejeződése lehetővé teszi az átmeneti transzformálást, higromicin-B szelekciós körülmények között. Ha az idegen aktiválószerkezet gyengén működik, akkor a HPT DNS-t tartalmazó vektorra erős szelekciós nyomás nehezedik, hogy épüljön be a *Cephalosporium* kromoszómális DNS-ébe. Mivel elvileg nem lehetetlen, úgy gondolják, hogy a beépülés lehetővé teszi, hogy a *Cephalosporium* kromoszómáján levő aktiválószerkezet helyes translációs leolvasási fázisban kerüljön a vektoron levő HPT DNS-szakasz mellé. Az ilyen beépült HPT DNS-szakaszt hordozó transzformációk előnyösek nagy stabilitásuk miatt szelekciós vagy nem szelekciós körülmények között is. Például a *Cephalosporium acremonium* pIT221 plazmiddal való transzformálásával nyert higromicin-B-rezisztens transzformációk elegendően stabilak ahhoz, hogy a törzsek higromicin nélküli szaporítását is lehetővé tegyék. Tény, hogy az új genotípus elvesztése olyan ritka, hogy nem szelektív körülmények között 25 generáción keresztül szaporítva a sejtek 95%-a megtartja az új genotípust. Továbbá a példaként említendő *Cephalosporium acremonium*/pIT221 transzformáció CPC-T1 a cefém antibiotikumok fermentatív körülmények között való előállítása közben is megtartja és kifejezi az újonnan nyert gént.

A jelen találmány szerinti eljárás hatékonysága tovább növelhető, ha olyan vektort használunk, mely még a *Cephalosporium* riboszómális gén (RG) DNS-szakaszt is tartalmazza. Az RG DNS-szakaszt bárhol elhelyezhetjük a vektorban, kivéve a replikációra, szelekcióra vagy a termék kifejeződésére kritikus régiókat. Mivel az alacsonyrendű eukarióták kromoszómáján számos RG-szakasz található, ezért az RG-tartalmú vektor nagy valószínűséggel épül be többször is, homológ rekombinációval a *Cephalosporium* kromoszómájába. Az RG-szakaszt tartalmazó vektorok, például a pPS6 plazmid többszörös beépülésének nagy valószínűsége az alapja annak, hogy ezek a plazmidok nagy frekvenciával képesek transzformálni a *Cephalosporium acremonium*-ot. A pPS6 plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a *Cephalosporium acremonium* RG-szakaszt tartalmazó ~3,7 kb *XmaI* fragmentet az *XmaI*-gyel emésztett pIT221 plazmidba ligáljuk. A kapott pPS6 plazmid nagyobb frekvenciával transzformálja a *Cephalosporium acremonium*-ot, mint az eredeti pIT221 plazmid. Ráadásul néhány pPS6 transzformáció nagyobb higromicin-B-rezisztenciát mutat, mint a *Cephalosporium acremonium* pIT221 transzformációk. Ez

a megfigyelés megegyezik azzal a várakozással, hogy az RG-tartalmú vektorok nagyobb számban épülnek be a kromoszómába. A *Cephalosporium acremonium* pPS6 plazmiddal kapott transzformánsai elég stabilak ahhoz, hogy higromicin-B-nek a fermentációs táptalajhoz való hozzáadása nélkül lehessen őket a cefém vegyületek fermentációs előállítására használni.

A gyakorlott szakember számára nyilvánvaló, hogy a pPS6 plazmiddal kapott *Cephalosporium acremonium* transzformánsok különösen hasznosak abban az esetben, ha idegen DNS nagymértékű kifejezéséhez magas géndózisra van szükség. Ha alacsonyabb géndózis elegendő, vagy kívánatos az idegen DNS kifejezésében, vagy ha a géndózis mérsékelt növekedése szükséges ahhoz, hogy egy *Cephalosporium acremonium* gén kifejeződésében a megfelelő csekély növekedést elérjük, akkor a pIT221 plazmid az előnyösen használható vektor. Így a hasznos *Cephalosporium acremonium* transzformánsok különböző változatait állíthatjuk elő, a jelen találmány szerinti HPT DNS-t tartalmazó vektorok használatával.

További vektorok, melyekben a pIT221 plazmid idegen transzlációs és transzkripció aktiválási szakaszát *Cephalosporium acremonium*-ból származó aktiválószakasszal helyettesítjük, szintén hasznosak. Ezeket a szakaszokat úgy helyezzük el, hogy a HPT DNS-szakasz kifejeződését vezéreljék. Ezek a plazmidok igen hasznosak a laboratóriumi munkákban, és eszközt nyújtanak idegen gének, *Cephalosporium acremonium* gének és *Cephalosporium acremonium* regulációs DNS-szakaszok klónozására. Különösen fontosak azok a DNS-szakaszok, melyek a klinikailag fontos cefém antibiotikumok előállításában intermedierként szolgáló cefém vegyületek fermentatív előállításában hasznosak. Ezek a plazmidok különösen hasznosak, mert egyszerre van meg bennük a *Cephalosporium*-ban működő ARS és a *Cephalosporium acremonium* transzkripció és transzlációs aktiválószakasza, egy olyan kombináció, amely lehetővé teszi a transzformációt a kromoszómába való beépülés nélkül.

Cephalosporium-ban működő ARS-t nélkülöző plazmiddal végzett transzformálásnál a plazmidnak osztódó *Cephalosporium* sejtek populációjában való fennmaradásához integrációra van szükség. *Cephalosporium* aktiválószakasz nélküli plazmidvektorokkal végzett transzformálásnál szintén integrálódásra van szükség ahhoz, hogy a HPT-kódoló szakasz megfelelően illeszkedjen egy kromoszomális aktiválószakaszhoz. Ezzel ellentétben, a HPT-kódoló szakasz kifejezéséhez megfelelően elhelyezett *Cephalosporium acremonium* akti-

válószakaszt tartalmazó plazmidok szelekciós nyomás alatt a *Cephalosporium acremonium*-ban működő ARS miatt önállóan replikálódó vektorokként maradnak fent. A szelekciós nyomás azt jelenti, hogy a transzformánsokat olyan koncentrációjú higromicin-B-hatásnak tesszük ki, amelynél a nem transzformált sejtek nem nőnek. A HPT-poliipeptid kifejeződése független a kromoszomális integrációtól, a plazmidon levő *Cephalosporium acremonium* aktiválószakasz miatt. A sikeres transzformációs eseményhez ennél fogva a *Cephalosporium acremonium* sejteknek csak fell kell vennie az ilyen plazmidokat. Mindegyik esemény a DNS bejuttatása a *Cephalosporium acremonium* sejtbe és beépülése a *Cephalosporium acremonium* genomba igen kis gyakorisággal körülbelül 10^{-3} – 10^{-4} vagy néha 10^{-5} gyakorisággal. Ennél fogva az a transzformáció, amelyhez mindkét eseményre szükség van, meglehetősen ritka a csak bejuttatást igénylő transzformációhoz képest.

A jelen eljárásban használható plazmidokat tovább módosíthatjuk, ha egy *Streptomyces* plazmidba, úgymint például a pIJ702-be (ATCC 39155) ligáljuk. Ehhez a pIJ702 és pIT221 plazmidokat *Pst*I enzimmel emésztjük, majd összeligáljuk, így kapjuk a ~13 kb méretű pETS702 és pPLS221 plazmidokat. Ez utóbbi plazmidok multifunkcionálisak és shuttle-vektorként használhatók genetikai információ átvitelére *Escherichia coli*, *Cephalosporium* és *Streptomyces* fajok között, ideértve a rokon *Nocardia*-kat is, úgymint például *Nocardia lactamdurans*. A *Streptomyces* és rokon *Nocardia* fajok transzformálását lényegében az International Publication (PCT/GB79/00095 sorszámú International Patent Application) No. WO79/01169 második példája alapján végezzük. A transzformánsokat kényelmesen szelektálhatjuk a thiostrepton-rezisztencia alapján, szkrínelésüket pedig ismert módszerekkel a melanintermelés alapján végezhetjük. Fontos, hogy az előbb említett *Cephalosporium acremonium* transzformánsok nagyon stabilak. Így a plazmidok nagyon hasznosak arra, hogy a *Cephalosporium acremonium* törzsek fermentatív módon általában, normális körülmények között nem található módosított penam és cefém vegyületek előállításában kulcsszerepet játszó géneket *Streptomyces* fajokból *Cephalosporium acremonium* törzsekbe vigyük át.

A gyakorlott szakember számára nyilvánvaló, hogy bármely, *Streptomyces*-ben működő replikációs origót és szelektálható markert tartalmazó *Streptomyces* klónozó vektor helyettesítheti, az említett pIJ702 plazmidot. Számos ilyen klónozó vektor ismert, ideértve, de nem korlátozó jelleggel említve az alábbi, I. táblázatban bemutatott vektorokat.

I. táblázat
Streptomyces plazmidok

Plazmid	Forrás	Letéti sorsz.
SCP2	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2)	NRRL* 15 042
SCP2*	<i>Streptomyces coelicolor</i> M110	NRRL 15 041
pEL7	<i>Streptomyces ambofaciens</i> /pEL7	NRRL 12 523
pUC6	<i>Streptomyces oспinosus</i>	NRRL 11 439

Plazmid	Forrás	Letéti sorsz.
pUC3	<i>Streptomyces</i> 3022A	NRRL 11 441
SLP1	<i>Streptomyces lividans</i>	NCIB** 11 417
pNM100	<i>Streptomyces virginiae</i>	NRRL 15 156
PEL103	<i>Streptomyces granulatoruber</i> A39912.13/pEL103	NRRL 12 549

* Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, United States of America

** National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Post Office Box 31, 135 Abbey Road, Aberdenn AB98DG, Scotland, United Kingdom

A jelen találmány szerinti módszer és rekombináns shuttle-vektorok alkalmazása nem korlátozódik egyetlen *Cephalosporium*, *Streptomyces* vagy *Escherichia coli* fajra vagy törzsrre. Ellenkezőleg, a vektorok széleskörűen alkalmazhatók és transzformálhatók számos *Cephalosporium*, *Streptomyces* és *Escherichia coli* fajhoz tartozó gazdasejtbe, különösen ezek restriktíómentes törzseibe. Továbbá a *Streptomyces* és *Cephalosporium* közül számos gazdaságilag fontos és különböző antibiotikumokat, például aminoglikozid, makrolid, β -laktám, poliéter, glikopeptid, penam és cefam antibiotikumot termel. A *Streptomyces* és a velük rokon *Nocardia* fajok ismertek változékony metabolizmusukról. Így számos *Streptomyces* és *Nocardia* faj hasznos forrása *Cephalosporium*ban termelt vegyületeket funkcionizáló vagy módosító enzimeknek.

A *Streptomyces* és rokon *Nocardia* fajokból könnyen szelektálhatók és izolálhatók restriktíómentes törzsek, a szakirodalomban ismert elvek kiterjesztésével, ismert eljárásokkal [Lomovskaja et al. *Microbiological Reviews*, 44, 206 (1980)]. A *Cephalosporium* törzsekről az a vélemény, hogy eredendően restriktíómentesek. A restriktíómentes törzsek gazdasejtjeiből hiányoznak a restriktíós enzimek, ennél fogva nem vágják el vagy bontják le a transzformálással bejuttatott plazmid DNS-t. A jelen módszer alkalmazása szempontjából azokat a gazdasejteket, melyek a jelen vektorokon lévő egyetlen restriktíós helybe sem vágnak bele, szintén restriktíómentesnek tekintjük.

A *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktíómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként, melyek β -laktám-antibiotikumokat termelnek, amelyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók. Ide tartoznak például a következő restriktíómentes törzsek: *S. lipmanii* (A16884, MM4550, MM13902), *S. clavuligerus* (cephamycin-C, clavulanic acid), *S. néha Nocardia lactamdurans*ként írják le (cephamycins-A, -B és -C), *S. griseus* (cephamycin-A, -B), *S. hygroscopicus* (deacetoxcephalosporin-C), *S. wadayamensis* (WS-3442-D), *S. chartreusis* (SF1623), *S. heteromorphus* és *S. panayensis* (C2081X); *S. cinnamomensis*, *S. fimbriatus*, *S. halsstedii*, *S. rochei* és *S. viridochromogenes* (cephamycins-A, -B): *S. cattleya* (thienamycin); és *S. olivaceus*, *S. flavovirens*, *S. flavus*, *S. fulvoviridis*, *S. argenteolus*, és *S. siyoensis* (MM4550 és MM13902).

15 A *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktíómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként, melyek aminoglikozid-antibiotikumokat termelnek, amelyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók. Ide tartoznak például a következő restriktíómentes törzsek. *S. kanamyceticus* (kanamicin), *S. chrestomyceticus* (aminosidin), *S. griseoflavus* (MA1267 antibiotikum), *S. microsporeus* (SF767 antibiotikum), *S. ribosidificus* (SF733 antibiotikum), *S. flavopersicus* (spectinomycin), *S. spectabilis* (actinospectacin), *S. rimosus*-forma paromomycinus (paromomicin, catenulin), *S. fradiae* var. *italicus* (aminosidin), *S. bluensis* var. *bluensis* (bluensomicin), *S. catenulae* (catenulin), *S. olivo reticuli* var. *cellulophilus* (destomicin-A), *S. tenebrarius* (tobramicin, apramicin), *S. lavendulae* (neomycin), *S. albogriseolus* (neomycin), *S. albus* var. *metamycinus* (metamicin), *S. hygroscopicus* var. *sagamiensis* (spectinomycin), *S. bikiniensis* (streptomycin), *S. griseus* (streptomycin), *S. erythrochromogenes* var. *narutoensis* (streptomycin), *S. poolensis* (streptomycin), *S. galbus* (streptomycin), *S. rameus* (streptomycin), *S. olivaceus* (streptomycin), *S. mashuensis* (streptomycin), *S. hygroscopicus* var. *limoneus* (validamicin), *S. rimofaciens* (destomicin), *S. hygroscopicus*-forma *glebosus* (glebomicin), *S. fradiae* (hybrimicinek, neomicinek), *S. eurocidicus* (A16316-C antibiotikum), *S. aguacanus* (N-metil higromicin-B), *S. crystallinus* (higromicin-A), *S. noboritoensis* (higromicin), *S. hygroscopicus* (higromicin), *S. atrofaciens* (higromicin), *S. kasugaspinus* (kasugamicinek), *S. kasugaensis* (kasugamicinek), *S. netropsis* (LL-AM31 antibiotikum), *S. lividus* (lividomicinek), *S. hofuensis* (seldomicin-komplex) és *S. canus* (ribozil paromamin).

50 A *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktíómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként, melyek makrolid antibiotikumokat termelnek, amelyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók. Ide tartoznak például a következő restriktíómentes törzsek.

55 *S. caelestis* (M188 antibiotikum), *S. platensis* (plate-nomicin), *S. rochei* var. *volubilis* (T2636 antibiotikum), *S. venezuelae* (metimicinek), *S. griseofuscus* (bundlin), *S. narbo nensis* (josamycin, narbomicin), *S. fungicidicus* (NA-181 antibiotikum), *S. griseofaciens* (PA133A, B antibiotikum), *S. roseocitreus* (albociklin), *S. bruneogriseus* (albociklin), *S. roseochromogenes* (albociklin), *S. cine-*

rochromogenes (cineromicin-B), *S. albus* (albomicetin), *S. felleus* (argomicin, pikromicin), *S. rochei* (lankacidin, borrelidin), *S. violaceoniger* (lankacidin), *S. griseus* (borrelidin), *S. maizeus* (ingramicin), *S. albus* var. *coilmyceticus* (coleimicin), *S. mycarofaciens* (acetil-leukomicin, espinomicin), *S. hygrosopicus* (turimicin, relomicin, maridomicin, tilosin, karbomicin), *S. griseospiralis* (relomicin), *S. lavendulae* (aldgamicin), *S. rimousus* (neutramicin), *S. deltae* (deltamicin), *S. fungicidicus* var. *epinomycticus* (epinomicin), *S. furdicidicus* (midekamicin), *S. ambofaciens* (foromacidin-D), *S. eurocidicus* (metimicin), *S. griseolus* (griseomicin), *S. flavochromogenes* (amaromicin, shinomicin), *S. fimbritus* (amaromicin), *S. fasciculus* (amaromicin), *S. erythreus* (eritromicin), *S. antibioticus* (oleandomicin), *S. olivochromogenes* (oleandomicin), *S. spinichromogenes* var. *suragaensis* (kujimicin), *S. kitasatoensis* (elukomicin), *S. narbonensis* var. *josamyceticus* (leukomicin A3, josamicin), *S. albogriseolus* (mikronomicin), *S. bikiniensis* (chalcomicin), *S. cirratus* (cirramicin), *S. dakartensis* (niddamicin), *S. aurythermus* (angolamicin), *S. fradiae* (tilosin, laktenocin, makrocin), *S. goshikiensis* (bandamicin), *S. griseoflavus* (akumicin), *S. halstedii* (karbomicin), *S. tendae* (karbomicin), *S. macrosooreus* (karbomicin), *S. thermotolerans* (karbomicin) és *S. abireticuli* (karbomicin).

A *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktiómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként, melyek poliéter-antibiotikumokat termelnek, amelyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók. Ide tartoznak például a következő restriktiómentes törzsek:

S. albus (A204, A28695A és B, salinomicin), *S. hygrosopicus* (A218, emeracid, DE3936), A120A, A28695A és B, eteromicin, dianemicin), *S. griseus* (grisorixin), *S. conglobatus* (ionomicin), *S. eurocidicus* var. *asterocidicus* (laidolomicin), *S. lasaliensis* (lasalocid), *S. ribosidificus* (ionomicin), *S. cacaoi* var. *asoensis* (lisocellin), *S. cinnamomensis* (monensin), *S. aureofaciens* (narasin), *S. gallinarius* (RP 30504), *S. longwoodensis* (lisocellin), *S. flaveolus* (CP38936), *S. mutabilis* (S-11743a) és *S. violaceoniger* (nigericin).

A *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktiómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként, melyek glikopeptid-antibiotikumokat termelnek, amelyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók. Ide tartoznak például a következő restriktiómentes törzsek:

S. orientalis és *S. haranomachiensis* (vancomicin): *S. candidus* (A-35512, avoparcin), és *S. eburosporeus* (LL-AM 374).

Előnyben részesítünk gazdasejtként más *Streptomyces* fajokhoz tartozó restriktiómentes törzseket, melyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók és a sejtekbe transzformálhatók, például *S. coelicolor*, *S. granuloruber*, *S. roseosporus*, *S. lividans*, *S. spinosus* és *S. azureus*.

A *Cephalosporium* fajokhoz tartozó restriktiómentes törzsek közül előnyben részesítjük gazdasejtként azokat, melyekben a jelenlegi shuttle-vektorok jól használhatók, és melyekbe a vektorok transzformálhatók. Ide tartoznak

például a következő restriktiómentes törzsek. *Cephalosporium acremonium*, *Cephalosporium salmosynnematum* (újban Emarcellospis salmosynnematumként írják le), a *Cephalosporium chrysogenum* taxon, ideértve a C-1778, 199 C-0012, C-3259, C-1877, C-0003, C-3479 és az ATCC No. 14615 törzseket a *Cephalosporium purpurascens*, *Cephalosporium acremonium* taxon, ideértve a C-007, C-0306, C-4653, C-4473, C-5454 törzseket, főleg a CMI 49137 (ATCC 11550) törzset és származékait, különösen az M8650 (ATCC 14553) törzset és származékait, valamint a *Cephalosporium curtisii* (C. sp. S-0161). Ráadásul más *Cephalosporium* fajok is használhatók, például a *Cephalosporium chrysogenum* és *Cephalosporium polyaleusans*. Ezek a fajok a cefalosporin-C-t deamináló és dekarboxilező enzimeket termelnek. Ezek az enzimek lehetővé teszik olyan cefalosporinok előállítását, melyeket alacsony pH-n szerves oldószerbe lehet extrahálni és amelyeket olyan amidázok szubsztrátjaként lehet használni, melyek a 7-amino-helyzetben elhidrolizálják a cefalosporin oldalláncát, ezáltal 7-ACA-t és glutarátot termelve. Mind a szerves oldószerbe való extrahációnak, mind az enzimátikus oldallánchasításnak az egyszerűsége és hatásossága gazdaságilag fontos tényező. Az orális cefalosporinok előállítása során a penicillin-V (és -G) átalakítása részben azért könnyű, mert szerves oldószerbe extrahálható és részben azért, mert 6-APS-t és fenoxi-acetátot (vagy fenil-acetátot) eredményező amidázok, szubsztrátjaiként szolgálnak. A fentiekben leírt, jellemző *Streptomyces*, *Nocardia* és *Cephalosporium* gazdasejtek mellett, a jelen vektorok igen hasznosak és különböző gomba és *E. coli* törzseket transzformálhatnak, úgymint például: *E. coli* K12 RR1, *E. coli* K12 JA221, *E. coli* K12 C600, *E. coli* K12 C600R_k-M_k, *E. coli* K12 HB101, *E. coli* K12 RV308 és hasonló törzseket. A penicillintermelő gombák közül azokat részesítjük előnyben gazdasejtként, melyekben a jelen vektorok jól használhatók és oda transzformálhatók, idetartoznak például az *Aspergillusok*, úgymint *Aspergillus nidulans*, a *Penicillium* fajokat, főleg a *P. chrysogenum* és *P. notatum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Malbranchea*, *Emmericella*, *Eupeenicillia*, *Talomyces*, *Polypaecilum*, *Thermoascus* és *Gymnoascus*.

A cefalosporintermelő gombák közül előnyösen használhatók gazdasejtként azok, melyekben a jelen vektorok hasznosak és transzformálhatók. Ide tartoznak az előzőekben említett *Cephalosporium* fajok mellett a *Paecilomycesek*, úgymint a *P. persinicus*, *Arachnomyces*, *Anixiopsis* és *Spirodium*. Tehát a jelen találmány szerinti módszer és vektorok széles körben használhatók a gazdasejtek szempontjából, különböző mikroorganizmusoknál.

A *higromicin-B*-antibiotikum nagyon széles antibiotikum-spektruma, a PGK-gén jelenléte a legtöbb gombánál, valamint az alacsonyrendű eukarióták foszfoglicerát-kináz génei transzkripció és transzláció aktiválásának minimális konzerválódása által lehetővé vált alapszínű kifejeződése a HPT-kódoló szakaszoknak, a jelen találmányt széles körben alkalmazhatóvá teszi számos különböző gombánál. Részletesebben a jelen találmány alkalmazható.

1) Az alkoholos italok és alkohol tüzelőanyagok termelésében használt *Saccharomyces cevarum* és rokon élesztők alkalmazásával működő fermentációs eljárások javításában;

2) a citromsav termelésére használt *Aspergillus* fermentációk javítására;

3) a mikofenolsav előállítására használt *Penicillium stoloniferum* fermentációk javítására, és

4) a kereskedelmi enzimek termelésére használt különböző gombák termelőképességének javítására.

A jelen találmány különösen jól használható azoknál a mikroorganizmusoknál, amelyek nincsenek jól jellemezve genetikailag és biokémiaiilag, mivel nincs szükség auxotróf mutánsok előzetes izolálására és az auxotrófiát javító génekre. Továbbá az alacsonyabb rendű eukariótákat nagyon hatékonyan öli a higromicin B és a legtöbb, különösen a gombák nem mutatnak lényeges hajlamot arra, hogy mutációval higromicin-B-rezisztenssé váljanak. A *Cephalosporium acremonium*ot magnézium és egyéb, a toxikus hatást ellensúlyozó ionok távollétében 8 µg/ml – 5 mg/ml higromicin-B kipurisztítja. Ebben a tartományban, vagy az előnyben részesített 100 µg/ml koncentráció mellett nem figyeltünk meg higromicin-B-rezisztencia mutációt. A higromicin-B-mutáció kialakulásának hiánya nagyon fontos paraméter a jelen transzformációs rendszer kereskedelmileg fontos alacsonyrendű eukariótákra való alkalmazásánál. A mutációval keletkező rezisztensmutánsok magas „háttér” mellett igen nehéz kimutatni, izolálni és manipulálni a kevés számú transzformánst. Mivel gyengén ismert genetikájú és biokémiájú alacsonyrendű eukarióták transzformációs rendszerének kifejlesztésében szükséges idő és költség igen lényeges,

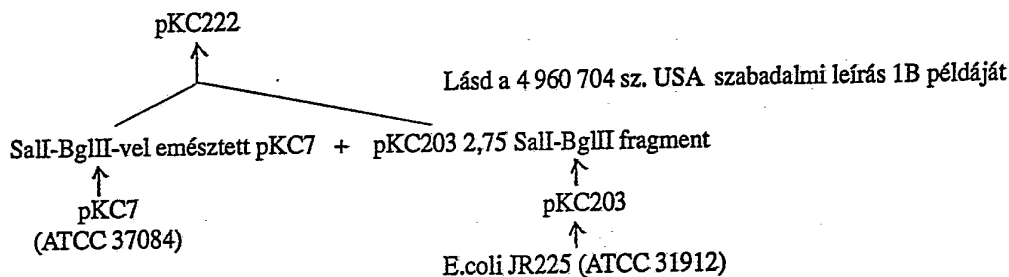
ezért a jelen szabadalomnak az ilyen eukarióta-organizmusoknak széles körére való alkalmazhatósága miatt nagy gyakorlati jelentősége van.

5 A pIT221, pPS5, pPS6, pETS702 és pLS221 plazmidokról kifejeződő higromicin-foszfotranszferáz géntermékek nemcsak szelekcióra használhatók, hanem molekulatömeg-markerként is. A higromicingén- termék teljes aminosav-sorrendje ismert, és a fehérje molekulatömege ~37,972 dalton. A higromicin-foszfotranszferáz-enzimet szokásos módon tisztíthatjuk, lényegében Haas and Drowning módszerével [Methods in Enzymology, 48, 611 (1978)]. A higromicin-foszfotranszferáz-fehérje molekulatömege kényelmes módon a Bio-Rad (32nd and Griffin Ave., Richmond, CA 94804-9984) Alacsony Molekulatömegű Fehérje Standardok legmagasabb molekulatömege és a Bio-Rad Magas Molekulatömegű Fehérje Standardok legalacsonyabb molekulatömege között található. A Bio-Rad fehérje standardok jól ismertek a szakterületen, és az előzőleg említett plazmidok higromicin-rezisztencia génterméke kényelmesen kiterjeszti mind az Alacsony, mind a Magas Molekulatömegű Fehérje Standardok mérettartományát.

20 A következő példák és előállítási sémák tovább illusztrálják és részletezik az alább ismertetett találmányt. Ahol szükséges mind a magyarázatot, mind az eljárást ismertetjük.

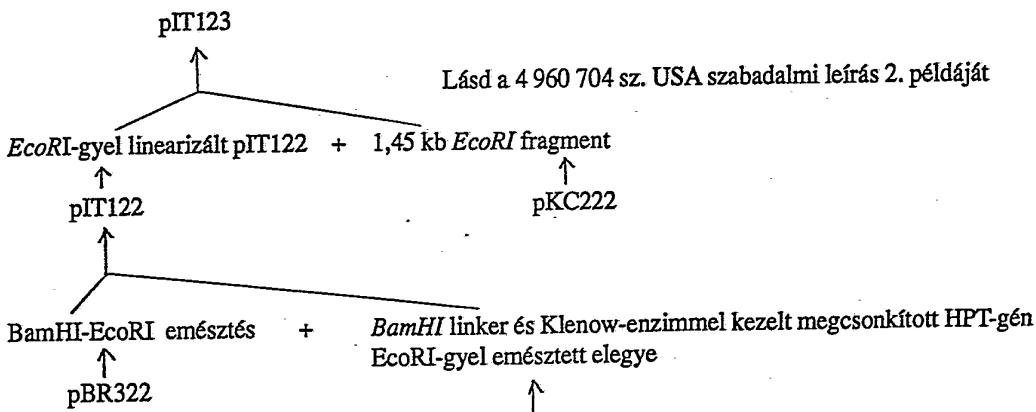
I. előállítási folyamatábra

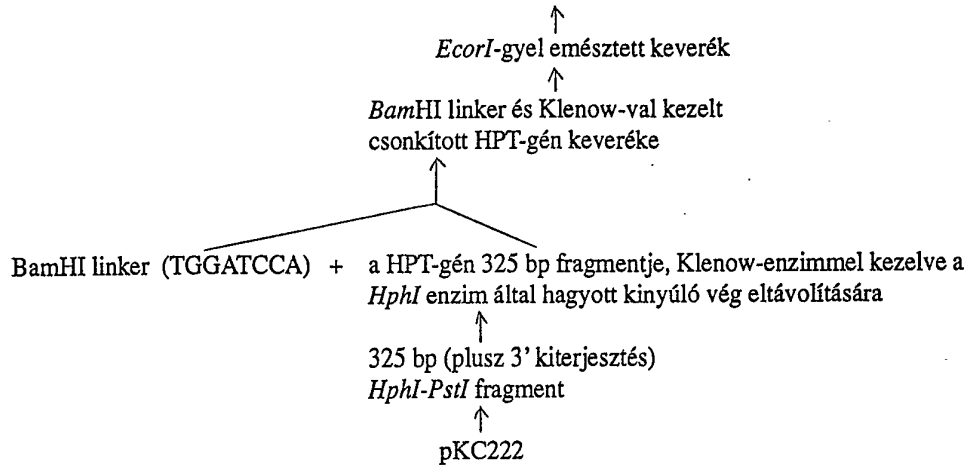
30 Eljárás a pKC222 plazmid – közbenső termék a pIT221 plazmid előállításában – előállítására a pKC7 (ATCC 37084) plazmidból és a pKC203 plazmidot tartalmazó *E.coli* JR225-ből (ATCC 31912).



II. előállítási folyamatábra

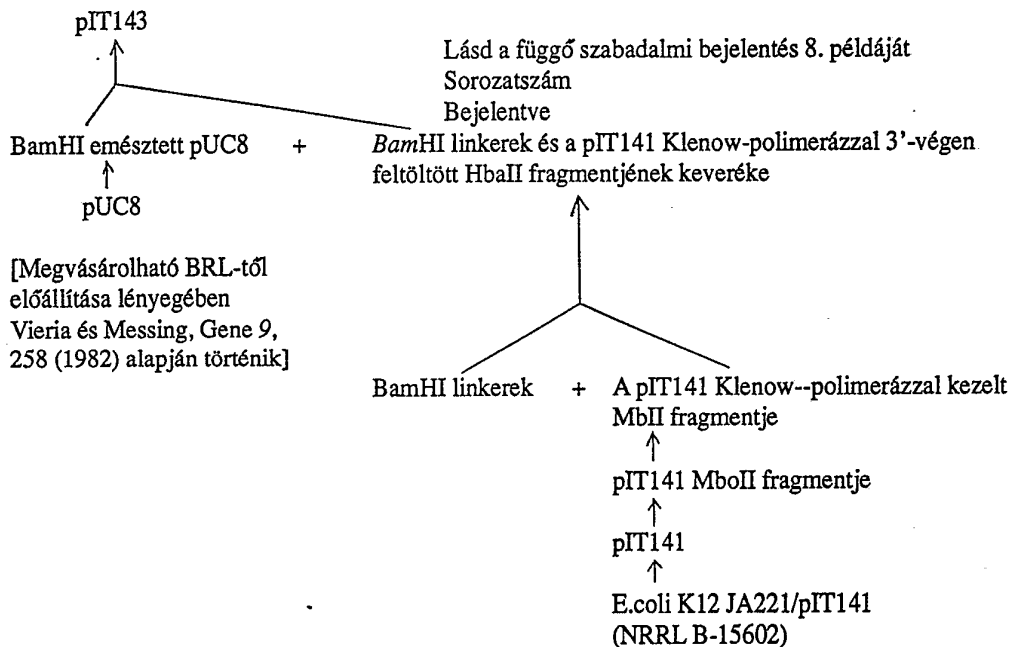
Eljárás a pIT123 plazmid – a pIT222 plazmid előállításában használt közbenső termék – előállítására, pBR322 és pKC222 plazmidokból.





III. előállítási folyamatára

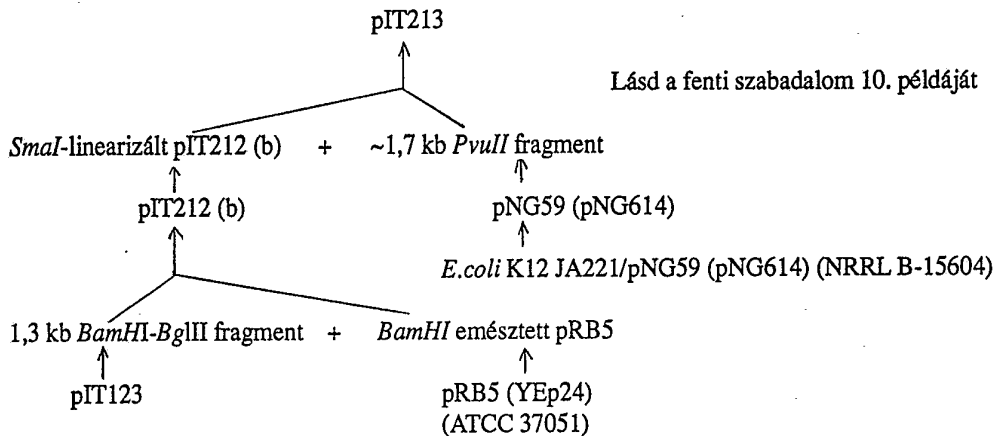
Eljárás a pIT143 plazmid – a pIT221 plazmid előállításában használt közbelső termék előállítására pUCP és pIT141 (NRRL-B- 15602) plazmidokból.



IV. előállítási folyamatára

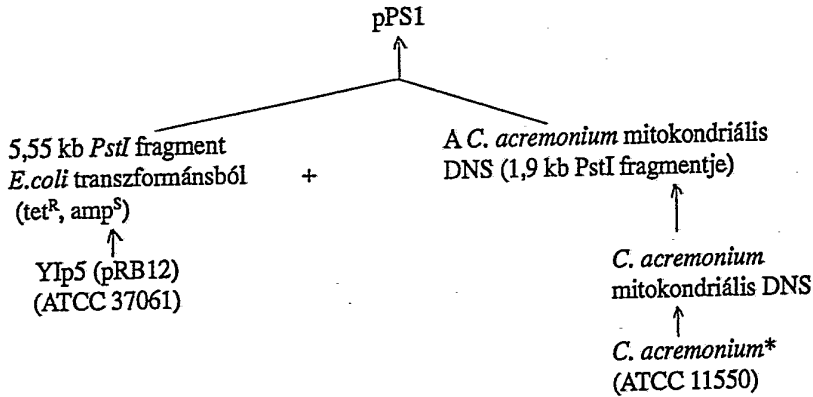
Eljárás a pIT213 plazmid – a pIT221 plazmid előállításában használt közbelső termék – előállítására az

Yep24 pRB5, ATCC 37051) és pIT123 (leírása a 4 960 704 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban található) plazmidokból.



V. előállítási folyamatábra

Eljárás a pPS1 plazmid – a pIT221 plazmid előállításában használt közbelső termék – előállítására YIp5 (pRB12, ATCC 37061) plazmidból és *Cephalosporium acremonium*ból (ATCC 11550).



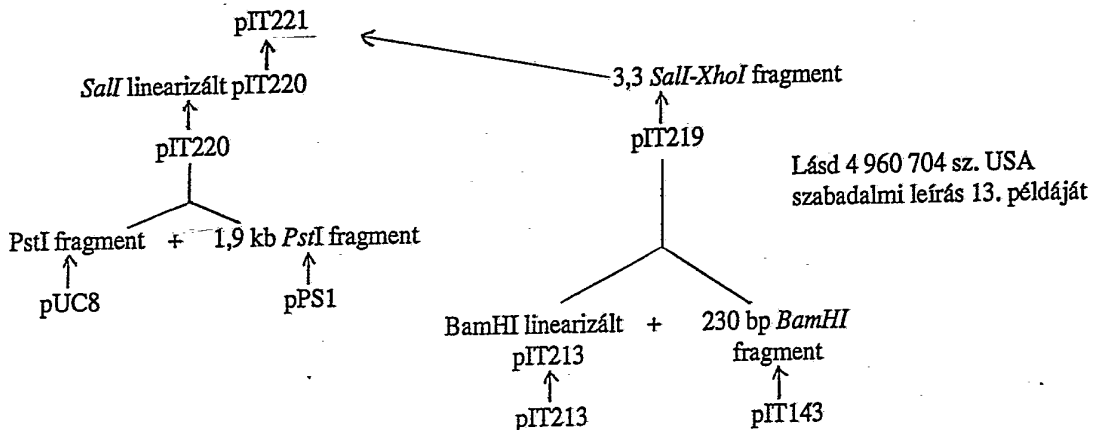
Megjegyzés:

- * Jóllehet a cefalosporin-C termelésben magas szintet elért *Cephalosporium acremonium* törzseket is használhatunk *Cephalosporium acremonium* ARS (antonóm replikálódó szakasz) forrásaként (Skatrud

és Queener, 1984), az ATCC 11550 törzs előnyösebb, mert gyorsan nő és könnyen tenyészíthető.

VI. előállítási folyamatábra

Eljárás a pIT221 plazmid előállítására a pUC8, pPS1, pIT213 és pIT143 plazmidokból.



I. példa

A pCK222 plazmid előállítása

A) A pCK203 plazmid izolálása és az *E. coli* K12 BE827/pKC203 készítése

Az *Escherichia coli* JR225 baktériumot (ATCC 31912) TY-táptalajon (1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 0,5% nátrium-klorid, pH 7,4) tenyésztjük 100 µg/ml higromicin-B jelenlétében, a szokásos mikrobiológiai eljárások szerint. Körülbelül 18 órás tenyésztés után a tenyészetnek körülbelül 0,5 ml-ét 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe visszük és körülbelül 15 másodpercig centrifugáljuk. Ha csak másként nem jelezük, az összes műveletet szobahőmérsékleten végezzük. A kapott felülúszót óvatosan eltávolítjuk és vékonyhegyű leszívóval és a sejtömeget körülbelül 100 µl frissen készített lizozimoldatban szuszpendáljuk. Ennek összetétele 2 mg/ml lizozim 50 mM glükóz, 10 mM CDTA (ciklohexán-diamin-tetraacetát) és 25 mM Trisz-HCl (pH 8,0). 30 percig 0 °C-on inkubáljuk, majd 200 µl alkalikus SDS (nátrium-dodecil-szulfát) ol-

datot adunk hozzá. Ennek összetétele: 0,2 N nátrium-hidroxid, 1% SDS. A csövet gyengén vortexeljük, 15 percig 0 °C-on tartjuk, majd körülbelül 150 µl 3 mólos nátrium-acetátot adunk hozzá. Ennek készítése: 3 mól nátrium-acetátot minimális mennyiségű vízben oldunk, pH-ját jéggeccsel 4,8-ra állítjuk, majd egy literre egészítjük ki. A cső tartalmát enyhén összekeverjük a csövet néhányszor fejfelé lefelé buktatva pár másodpercig, ezalatt a DNS-csapadék létrejön.

A csövet 0 °C-on tartjuk 60 percig, majd 5 percig centrifugálva majdnem tiszta felülúszót kapunk. A felülúszóból körülbelül 0,4 ml-t egy másik centrifugácsőbe teszünk, ehhez 1 ml hideg etanol adunk. A csövet -20 °C-on tartjuk 30 percig, a kapott csapadékot 2 perces centrifugálással összegyűjtjük és a felülúszót leszívóval eltávolítjuk. Az összegyűjtött csapadékot 100 µl 0,1 M nátrium-acetát/0,5 M Trisz-HCl (pH 8) oldatban oldjuk és térfogat hideg etanol hozzáadásával újra kicsapjuk. 10 percig 20 °C-on tartjuk és a kívánt

Escherichia coli JR225 plazmid DNS-t a fent leírt centrifugálással összegyűjtjük.

Az *Escherichia coli* JR225 plazmid DNS-csapadékot körülbelül 40 µl vízben vagy híg pufferban oldjuk és *Escherichia coli* K12 BE287 transzformálására használjuk, lényegében Sensink transzformációs módszere alapján [Cell, 3, 315 (1974)]. Az *Escherichia coli* K12 BE287 törzset letétbe helyezték és az American Type Culture Collection, Rockville, Maryland állandó törzsgyűjteményében található, bárki számára hozzáférhető ATCC 31911 szám alatt. A kapott transzformánsokat 200 µg/ml higromicin-B-antibiotikumot tartalmazó TY- agaron szelektáljuk. Ennek összetétele 1% tripton, 0,5% élesztő kivonat, 0,5% nátrium-klorid, 1,5% agar, pH 7,4. A transzformánsok közül néhány gélelektroforézissel [lásd Rao and Rogers, Gene, 3, 247 (1978)] és más tesztekkel kimutatható módon mind nagy, mind kis (~15 kb) plazmidokat is tartalmazott és rezisztens volt ampicillinre és higromicin-B-re. Más transzformánsok csak a kisebb, ~15 kb plazmidot tartalmaztak és rezisztensek voltak higromicin-B-re és G 418-ra, de érzékenyek voltak ampicillinre.

Az utóbbi típusú transzformánsokat 100 µg/ml higromicin-B-antibiotikumot tartalmazó TY-agarra szelésztyük és standard mikrobiológiai technikákkal tenyésztjük. A kapott sejtekből izoláljuk a fent leírt, ~15 kb méretű, higromicin-B és G 418 rezisztenciát okozó plazmidot. Ennek jele a továbbiakban pKC203 plazmid. A higromicin-B és G 418 antibiotikum- rezisztenciáéknak pKC203 plazmidon való jelenlétét a továbbiakban transzformációs és szelekciós analízissel erősítettük meg.

B) A pKC222 plazmid és az E.coli K12

JA221/pKC222 transzformáns előállítása

(1) A pKC203 plazmid ~2,75 kb méretű SalI/BglII fragmentjének izolálása

Körülbelül 5 µg pKC203 DNS-t 100 µl össztérfogatban BglII restriktív enzimmel 1x BglII pufferben* 37 °C-on 2 órán át emésztünk. Az emésztés befejeződését agaróz-gélelektroforézissel igazoljuk. A teljes emésztődés után a nátrium-klorid-koncentrációt 2 µl 5 M nátrium-klorid hozzáadásával 0,15 M-ra emeljük. Körülbelül 10 egység SalI restriktív endonukleázt adunk hozzá, és másodszer is emésztjük 2 órán át 37 °C-on. Egy körülbelül 2,75 kb méretű fragment tartalmazza a higromicin-B és G 418 antibiotikumokra való rezisztenciát kódoló géneket és szabályozó elemeket, és agaróz-gélelektroforézissel vagy más szokásos eljárással nyerhető ki. [Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)].

* 10x BglII következő összetételű puffert készítünk és a kívánt 1x koncentrációra hígítjuk.

0,5 M NaCl
0,5 M Trisz-HCl, pH 7,4
0,1 M MgCl₂
0,01 M Ditiotritol

(2) Ligálás és végső összeállítás

Körülbelül 5 µg pKC7 plazmidot (ATCC 37084), melyet Rao és Rogers szerint [Gene, 7, 79 (1979)] állíthatunk elő, az 1. B) (1) példában leírt módon SalI és BglII restriktív enzimekkel kezelünk. Miután az enzimeket 5 percig 70 °C-on tartva inaktiváltuk, körülbelül 1 µg DNS-t keverünk 1:1 arányban a pKC203 plazmid ~2,75 kb méretű SalI/BglII fragmentjével. A fragmenteket 25 µl össztérfogatban, 1x ligáló pufferben* 1 Weiss egység, T4 DNS-ligázzal kapcsolunk össze 4 °C-on 16 órán át. A kapott pKC plazmidot az 1. A) példa szerint *Escherichia coli* K12 JA221 (NRRL B-15211) törzsbe transzformáljuk. A kapott transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó TY-agaron (1% tripton, 0,5% élesztő kivonat, 0,5% nátrium-klorid, 1,5% agar) szelektáljuk. A kapott transzformánsokat megvizsgáljuk, tartalmazza-e a kívánt plazmidot.

* 10x ligáló puffert készítünk az alábbi összetételben és a kívánt 1x koncentrációra hígítjuk.

0,3 M Trisz-HCl (pH 8)
0,07 M MgCl₂
0,012 M EDTA
0,005 M ATP
0,01 M Ditiotritol

(3) A pKC222 plazmid izolálása

A tisztított transzformánsokat 50 µg/ml ampicillint tartalmazó TY-táplevesben (1% tripton, 0,5% élesztő kivonat, 0,5% nátrium-klorid, pH 7,4), ismert mikrobiológiai eljárásokkal tenyésztjük. 18 órás inkubálás után a kívánt plazmidot lényegében az 1. A) példában leírt módon izoláljuk.

2. példa

A pIT123 plazmid és az E.coli K12 JA221/pIT123 készítése

A) A pKC222 plazmid HphI-PstI fragmentjének izolálása

Körülbelül 50 µg pK222 plazmid DNS-t emésztünk 1x HphI sóoldatban (6 mM KCl, 10 mM Trisz-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 1 mM Ditiotritol) 100 µl össztérfogatban 20 New England Biolab Egység HphI restriktív endonukleázzal. Az emésztés teljességét a reakcióelegy 2%-ának agarózzélen való elektroforézissel ellenőrizzük. A nátrium-klorid-koncentrációt megfelelő mennyiségű 5 M nátrium-klorid hozzáadásával 60 mM-ra állítjuk, majd 20 egység PstI restriktív endonukleázt adunk hozzá. Az emésztés teljességét ismét agaróz-gélelektroforézissel ellenőrizzük. A kívánt ~325 bp (plusz egyszerű kinyúlások) méretű HphI-PstI fragmentet standard módszerekkel akrilamidból tisztítjuk [Schliet and Wensint, Practical Methods in Molecular Biology, Springer-Verlag, New York (1981)].

A tisztított ~325 bp méretű fragmentet a DNS-polimeráz I nagy fragmentjével kezeljük (New England Biolabs). Így körülbelül 1,5 µl (1 µg) fragmentet, 0,5 µl 10x puffert (0,5 M Trisz, pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 0,5–0,5 µl-t a dCTP, dATP, dTTP, DGTP mindegyikének 200 mM-os oldatából és 1 µl (1 egység tartalmú) DNS-polimeráz I

nagy (Klenow) fragmentet inkubálunk 15 percig 37 °C-on. A polimeráz hőinaktiválása után Roberts és Lauer [Methods in Enzymology, 68, 473 (1979)] eljárása szerint *Bam*HI linkereket adunk hozzá. A kapott *Bam*HI linkert tartalmazó DNS-t szokásos módon emésztjük *Bam*HI restrikciós enzimmel 1x *Bam*HI pufferben (150 mM nátrium-klorid, 6 mM Trisz-HCl pH 7,9, 6 mM magnézium-klorid). Ezután megfelelő mennyiségű 2 M Trisz-HCl (pH 7,4) hozzáadásával a Trisz-HCl-koncentrációt 100 mM-ra növeljük és a DNS-t újra emésztjük *Eco*RI restrikciós enzimmel. A kapott, emésztett DNS-t is elektroforetizáljuk 7% akrilamidgélben és a kívánt ~250 bp méretű fragmentet az előzők szerint tisztítjuk.

B) A pIT122 plazmid és az E.coli K12 JA221/pIT122 készítése

Körülbelül 2 µg pBR322 DNS-t egymás után emésztünk *Bam*HI és *Eco*RI restrikciós enzimekkel lényegében a 2. A) példában leírtak szerint. Miután az enzimeket 5 percig 70 °C-on tartva inaktiváltuk, körülbelül 1 µl (1 µg) pBR322 DNS-t összekeverünk, körülbelül 1 µl (1 µg) tisztított 250 bp fragmenttel, 37 µl vízzel, 5 µl (10 mM) ATP-vel, 5 µl ligáló eleggyel (0,5 M Trisz-HCl, pH 7,8 0,2 M ditiotreitól, 0,1 M magnézium-klorid) és 1 µl T4 DNS-ligáz (körülbelül 1000 New England Biolabs Egység). Az elegyet körülbelül 2 órán át 15 °C-on inkubáljuk, majd a reakciót 5 perces 70 °C-os inkubálással leállítjuk. Jégben való hűtés után a kapott ligált elegyet használjuk *Escherichia coli* K12 JA221 (NRRL B-15211) transzformálására, lényegében Wensink 1974-es transzformációs eljárása szerint, 50 µg/ml ampicillint tartalmazó TY-lemezekben. A kívánt transzformánsokat szokásos módon azonosítjuk a várt fenotípus (Amp^r, Tet^s) alapján, valamint a megfelelő *Eco*RI-*Bam*HI inszert alapján. A kapott *Escherichia coli* K12 JA221/pIT122 transzformánsokat szokásos módon tenyésztjük a pIT122 plazmid temelése és izolálása céljából.

C) A pKC222 plazmid ~1,45 kb méretű EcoRI fragmentjének ligálása EcoRI-gyel emésztett pIT122 plazmidba

A pKC222 és a pIT122 plazmidokból külön-külön 20 µg-ot emésztünk külön 200–200 µl-es reakcióelegyben 40–40 egység *Eco*RI restrikciós enzimmel 1x *Eco*RI keverékben (0,1 M Trisz-HCl, pH 7,5), 0,05 M nátrium-klorid, 0,005 M magnézium-klorid. A kívánt ~1,45 kb méretű *Eco*RI fragmentet szokványosan tisztítjuk 7%-os akrilamidgélből és *Eco*RI-gyel emésztett pIT122 plazmidba ligáljuk. A kapott ligált DNS-t pIT123 plazmidnak nevezzük és *Escherichia coli* K12 JA221 (NRRL B-15211) törzs transzformálására használjuk. Mind a ligálást, mind a transzformálást lényegében a 2. B) példában leírtak szerint végezzük. Az ampicillin-rezisztens transzformánsokat szokványos módon vizsgáljuk az 1,45 kb *Eco*RI fragment jelenlétére és helyes irányú beépülésére, a megfelelő plazmidok restrikciós enzimekkel és agaróz-gélelektroforézissel való emésztésével. Az első kilenc bázispár kivételével a teljes higromicin-B-rezisztenciagént tartalmazó plazmidok a pIT123 plazmidok. Az így azonosított *Esche-*

richia coli K12 JA221/pIT123 transzformánsokat a pIT123 plazmidok előállítására és tisztítására céljából tenyésztjük. A pIT123 plazmid restrikciós térképét a kísérő rajzok között, a 2. árn mutatjuk be.

3. példa

A) pIT143 plazmid készítése

A) A pIT141 plazmid izolálása

A pIT141 plazmid tartalmazza a *Saccharomyces cerevisiae* teljes foszfoglicerát-kináz (PGK) génjét és a pIT143 plazmid készítésére használjuk. A plazmidot szokványosan izolálhatjuk *Escherichia coli* K12 JA221/pIT141-ből, mely törzset a Northern Regional Research Laboratory-nál (Peoria, Illinois) letétbe helyezték, és az állandó törzsgyűjtemény része. A törzs bárki számára hozzáférhető az NRRL B-15602 sorszám alatt, a pIT141 plazmid előnyös forrásaként. A pIT141 plazmid ampicillin-rezisztenciát kódol és lényegében az 1. példában leírtak szerint izoláljuk.

B) A pIT143 plazmid készítése

A pIT143 plazmidot, melyből a *Saccharomyces cerevisiae* PGK transzkripció és transzláció aktiválószerét nyerjük, úgy állítjuk elő, hogy (kb. 200 µl összreakcióterfogóban), körülbelül 50 µg pIT141 DNS-t emésztünk 1x *Bgl*II pufferben 100 egység *Hind*III restrikciós enzimmel 2 órán át 37 °C-on. A teljes megemésztődést agaróz-gélelektroforézissel követjük. A teljes megemésztődés után a nátrium-klorid-koncentrációt 4 µl 5 M nátrium-klorid hozzáadásával 0,15 M-ra növeljük. Ezután 100 egység *Sall* restrikciós enzimet adunk hozzá és az emésztést további két órán át, 37 °C-on folytatjuk. Amikor az emésztés teljes, a kapott ~958 bp méretű *Sall*-*Hin*II fragmentet szokványos módon izoláljuk akrilamidgélből és ismert módszerekkel (Maniatis et al., 1982) tisztítjuk.

Körülbelül 5 µg tisztított ~958 bp méretű *Sall*-*Hin*II fragmentet ezután 20 egység *Mbo*II restrikciós enzimmel 1x *Mbo*II pufferben*, 50 µl össztérfogóban, körülbelül 2 órán át 37 °C-on emésztünk. A kapott *Mbo*II-vel hasított DNS-t szokványos módon fenolos extrakcióval, kétszer kloroformos extrakcióval és két etanolos kicsapással tisztítjuk. A tisztított DNS-t ezután 20 µl 1x Klenow-pufferben** szuszpendálunk, majd 0,5 egység *Escherichia coli* DSN-polimeráz I nagy (Klenow) fragmenttel kezeljük 37 °C-on 30 percig. A DNS-t egyszer etanollal kicsapjuk, majd 25 µl 1x ligáló pufferben szuszpendáljuk körülbelül 30 pmól foszforilezett *Bam*HI linkerrel (TGGATCCA, az egyszerűség kedvéért csak az egyik szálát mutatjuk be). A linkert lényegében Itakura et al. (1977) és Crea et al. (1978) módszerével szintetizáljuk. A ligálást lényegében az 1. B) (2) példa szerint végezzük. A ligált DNS-t ezután elhasítjuk, a ligáló elegyet 100 µl-re hígítva 1x *Bam*HI pufferrel*** és 100 egység *Bam*HI restrikciós enzim hozzáadásával. Három órán át emésztjük 37 °C-on, majd az elegyet 7%-os akrilamidgélben elektroforetizáljuk és a PGK-gén promoterét tartalmazó ~230 bp méretű fragmentet szokványos módon izoláljuk és tisztítjuk (Maniatis, 1982).

Egy külön csőben körülbelül 1 µg pUC8 plazmidot (vásárolható a BRL-től) 5 egység *Bam*HI restrikciós enzimmal emésztünk *Bam*HI reakcióelegyben 37 °C-on körülbelül egy órán át. A *Bam*HI-gyel hasított pUC8 plazmidot ezután a ~230 bp méretű *Bam*HI fragmenttel ligáljuk, lényegében az 1. B) (2) példa szerint. A kapott pIT143 jelű plazmidot szokványos módon izoláljuk és tisztítjuk további felhasználás céljából.

A pIT143 megfelelő DNS-szakasza, mely a transzlációs iniciációs hellyel kezdődik, a következő nukleotid-sorrendű 5'-ATG GAT CC-3'. A pIT143 plazmid *Bam*HI hasítási helye fázisban van a pIT123-on levő, megcsonkított higromicin-rezisztenciát kódoló gén *Bam*HI helyével. A pIT143 plazmid restrikciós hasítási térképét a kísérő rajzok között a 3. ábrán közöljük.

* 10x *Mbo*II reakciópuffert készítünk az alábbi összetételben, és a kívánt 1x koncentrációra hígítjuk.

0,06 M KCl
0,1 M Trisz-HCl, pH 7,9
0,1 M MgCl₂
0,01 M Ditiotritol

** 10x Klenow-puffert készítünk az alábbi összetételben és a kívánt 1x koncentrációra hígítjuk.

0,4 M KPO₄, pH 7,5
0,03 M MgCl₂
0,01 M 2-merkaptó-etanol
0,31 M dCTP, dATP, dTTP és dGTP (külön-külön)

*** 10x *Bam*HI reakciópuffert készítünk az alábbi összetételben és a kívánt 1x koncentrációra hígítjuk.

1,5 M NaCl
0,5 M Trisz-HCl, pH 7,4
0,1 M MgCl₂
0,01 M Ditiotritol

4. példa

A pIT213 plazmid készítése

A Tn 601 (903)-ból származó kanamicin-rezisztenciagént beépítjük az YEp24 plazmidba (RB5, ATCC 37051), úgy, hogy a pNG59 plazmidból (NRRL B-15604) kivágjuk a ~1,7 kb *Pvu*II fragmentet és az YEp24 plazmid egyetlen *Sma*I helyére ligáljuk. A megcsonkított higromicin-gént is beépítjük, a pIT123 plazmidból származó ~1,3 kb *Bgl*II-*Bam*HI fragmentet ligálva az egyetlen *Bam*HI helyre.

A *Pvu*II, *Bam*HI, *Bgl*II és *Sma*I emésztéseket és a szükséges fragmentizálásokat lényegében az 1. B) (1) példa szerint végezzük, kivéve hogy a *Pvu*II* és *Sma*I pufferek (Maniatis *et al.*, 1982) helyett a megfelelő helyeken *Bgl*II puffert használunk. A ligálást lényegében az 1. B) (2) példa szerint végezzük. A pIT213 plazmid restrikciós térképét a kísérő rajzok 4. ábráján mutatjuk be.

5. példa

A pPS1 plazmid készítése

A) A pRB12 (YIp5) plazmid (ATCC No. 37061) izolálása

5 Az *Escherichia coli* K12 RR1 (NRRL B-15210) törzset L-táptalajban (1% Bacto tripton, 0,5% Bacto élesztő-kivonat, 1% nátrium-klorid) tenyésztjük, szokványos mikrobiológiai eljárással. 16 órás inkubálás után a sejteket centrifugálással összegyűjtjük és pRB12 (YIp5) plazmid DNS-sel (ATCC-től származik) transzformáljuk, lényegében Mandel és Higa módszerével [J. Mol. Biol. 53, 154 (1979)]. A transzformánsokat 50 µg/ml ampicillinnel kiegészített minimál táptalajon szelektáljuk.

10 Egy transzformánst izolálunk és ampicillin jelenlétében, szokványos mikrobiológiai módszerekkel tenyésztünk. Ebből a tenyészetből lényegében Clewell [Journal of Bacteriology, 110, 667 (1972)] módszerével izoláljuk a pRB12 (YIp5) plazmid DNS-t. Transzformációval és restrikciós analízissel igazoljuk, hogy a
20 DNS valóban a pRB12 (YIp5) plazmid.

B) A *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-ének izolálása

25 Az antibiotikum-termelő fonalas gombát a *Cephalosporium acremonium*ot (bármely *Cephalosporium* törzs, különösen az ATCC 11550 és ATCC 14553 elfogadható) TS-táptalajon (BRL triptikázszója) tápleves 3%, kálium-foszfát 0,035%, pH 6,7) standard mikrobiológiai módszerekkel tenyésztjük. 48 órás növekedés után a micéliumot Büchner-tölcsérbe helyezett Whatman No. 1. szűrőn keresztül vákuumszűréssel összegyűjtjük. A micéliumtömeget kétszer azonos térfogatú TE-pufferrel (10 mM Trisz pH 7,9, 10 mM Na₂EDTA) mossuk. 80 g micéliumból össz-DNS-t izolálunk lényegében Minuth *et al.*, módszerével [Current Genetics, 5, 227 (1982)].

30 A mitokondriális DNS-t cézium-klorid egyensúlyi centrifugálással (45 000 rpm, 65 óra), 0,33 mg/ml propidium-jodid jelenlétében választjuk el a kromoszomális DNS-től. Így egy széles kromoszomális csíkot kapunk és egy kisebb, sűrűbb csíkot, mely főleg mitokondriális DNS-t tartalmaz. A mitokondriális DNS-sávot a centrifugációs oldatát injekciós tűvel átszűrve eltávolítjuk, hatszor extraháljuk egyenlő térfogatú, cézium-kloriddal telített izopropil-alkohollal, 16 órán át TE-pufferral szemben dializáljuk a cézium-klorid eltávolítására, majd etanollal kicsapjuk. A mitokondriális DNS jelenlétét szokványos módon, restrikciós elemzéssel igazoljuk (Skatrud and Queener, Current Genetics, 8, 155 (1984)).

C) A pPS1 plazmid és az *E.coli* K12 HB101/pPS1 transzformáns előállítás

(1) A ~1,9 kb méretű *Pst*I fragment izolálása a *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-ből

55 Körülbelül 35 µg *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-t kezelünk a *Pst*I restrikciós enzimmal, lényegében a 2. A) példa szerint, azzal a kivétellel, hogy csak *Pst*I, és nem *Pst*I-*Hph*I enzimet használ-

lunk, az emésztésnél. Az 1,9 kb *PstI* fragmentet agarózgélből izoláljuk DEAE-cellulózpapírra (Whatman) végzett elektroelúcióval. A DEAE-papírcsíkot a hozzákötött DNS-sel kétszer mossuk 100 mM kálium-klorid, 0,1 mM EDTA, 10 mM Trisz, pH 7,9 összetételű oldattal. A DNS-t a DEAE-papírról 4 ml, 1,0 M nátrium-klorid, 0,1 M EDTA, 10 mM Trisz, pH 7,9 összetételű oldattal mossuk le, majd egytized térfogatú 3 M nátrium-acetát pH 8,0 és két térfogatú jéghideg etanol hozzáadásával kicsapjuk. Ezt az elegyet -70 °C-on tartjuk 30 percig. A DNS-t centrifugálással gyűjtjük össze (16 000 g, 25 perc) és TE-pufferben oldjuk.

(2) A *PstI*-gyel linearizált *pRB12* izolálása

A *pRB12* (YIp5, ATCC No. 37061) plazmid két *PstI* hasítási helyet tartalmaz, egyiket az ampicillin-rezisztenciagénben, a másikat az élesztő *URA3* génben. Hogy az ~1,9 kb méretű, *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-ből származó *PstI* fragmentet az ampicillin-rezisztenciagénben lévő *PstI* hasítási helyre ligáljuk, 30 µg *pRB12* (YIp5) plazmidot *PstI* enzimmel részlegesen emésztünk 20 mM Trisz-HCl, pH 7,5, 10 mM magnézium-klorid, 50 mM ammónium-szulfát, 100 µg BSA és 750 egység *PstI* restriktív enzim összetételű pufferoldatban. 37 °C-on 3 percig végzett emésztés után a reakciót leállítjuk, 10 percig 65 °C-on tartva az elegyet. A teljes hosszúságú lineáris fragmentek elegyét a fent leírt módon, gélből izoláljuk.

(3) Ligálás és végső koncentráció

Körülbelül 1 µg, *Cephalosporium acremonium* mitokondriális DNS-ből származó 1,9 kb méretű *PstI* fragmentet azonos mennyiségű, *PstI*-gyel linearizált *pRB12* (YIp5) plazmid DNS-sel keverünk össze. Ezeket a DNS-fragmenteket lényegében a 2. A) példa szerint, T4 DNS-ligázzal összekapcsoljuk. A kapott plazmidkeverékkel, mely recirkularizált kiindulási plazmidot és a *pRB12* (YIp5) plazmidnak vagy az ampicillingén *PstI* helyére vagy az élesztő *URA3* gén helyére beépített ~1,9 kb *PstI* mitokondriális fragmentet tartalmazó plazmidból áll, használjuk. *Escherichia coli* K12 RR1 (NRRL B-15210) törzs transzformálására a tetraciklin-rezisztencia alapján, lényegében Mandel és Higa [J. Mol. Biol. 53, 154 (1979)] módszere alapján. A tetraciklin-rezisztens transzformánsokat az ampicillin-rezisztenciában lévő inszerciós inaktiválásra Boyko és Ganschow [Analytical Biochemistry, 122, 85 (1982)] módszerével vizsgáljuk át.

Egy tisztított, tetraciklin-rezisztens, ampicillin-érzékeny transzformáns szelektív körülmények között (azaz 12,5 µg/ml tetraciklin jelenlétében) tenyésztünk. Kis mennyiségű plazmidot izolálunk lényegében Klein *et al.*, [Plasmid 3, 88 (1980)] módszerével és restriktív analízissel vizsgáljuk, hogy melyik plazmidpreparátum tartalmazza a ~1,9 kb méretű *PstI* fragmentet helyesen beépítve. Miután azonosítottunk egy a kívánt plazmidot tartalmazó izolátumot, nagy mennyiségű plazmid DNS-t izolálunk lényegében Clewell módszerével [Journal of Bacteriology, 110,

667 (1972)], így kapjuk a *pPS1* plazmidot. A *pPS1* plazmid szerkezetét restriktív analízissel és hibridizációs analízissel igazoljuk. Skatrud és Queener (1984) szerint. A plazmidot használjuk a DBY-746 (ATCC 74773) élesztőtörzs transzformálására, az uraciltól való függetlenséget használva markerként, lényegében Beggs módszerével [Nature, 275, 104 (1978)]. A transzformációs frekvencia és a hibridizációs analízis együtt azt mutatják, hogy a *pPS1* plazmid képes autonóm replikációra élesztőben. A *pPS1* plazmid restriktív térképét a kísérő rajzok között, az 5. ábrán mutatjuk be.

6. példa

A *pIT221* plazmid készítése

A) A *pIT220* plazmid készítése

(1) A ~1,93 kb *PstI* fragment tisztítása *pPS1* plazmidból

Körülbelül 20 µg *pPS1* plazmidot emésztünk *PstI* pufferben (0,1 M nátrium-klorid, 0,5 M Trisz-HCl, pH 8, 0,01 M magnézium-klorid) 50 egység restriktív endonukleázzal 37 °C-on, míg az emésztés teljes lesz. A ~1,93 kb méretű *PstI* fragmentet standard módszerekkel izoláljuk és tisztítjuk poliakrilamidból (Maniatis *et al.*, 1982).

(2) A *pUC8* plazmid emésztése *PstI*-gyel

Körülbelül 5 µg *pUC8*-at (kapható a Bethesda Research Laboratories cégtől, Bethesda, Maryland, ugyanazzal a módszerrel készül, mint amit az 1. példában ismertettünk, a *pKC202* izolálására) lényegében a fenti, 6. A) példa szerinti módszerrel emésztünk.

(3) A ~1,93 kb méretű *PstI* fragment ligálása a *pPS1* plazmidból a *pUC8* plazmidba

Körülbelül 1 µg *PstI*-gyel hasított *pUC8* plazmidot és 0,1 µg ~1,93 kb méretű *PstI* fragmentet 1000 egység (New England Biolabs) T4 DNS-ligázzal pufferben (20 mM Trisz-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP, 10 mM ditioneitol) 30 µl össztérfogatban 15 °C-on 2 órán át inkubálunk. Ezzel a kapott DNS-sel transzformáljuk az *Escherichia coli* K12 RR1 (NRRL B-1520) törzset, a keresett *pIT220* plazmidot az 1. A) példa szerint, a kapott ampicillin-rezisztens *Escherichia coli* transzformánsokból állítjuk elő. A *pIT220* plazmid restriktív térképét a kísérő rajzok között a 6. ábrán mutatjuk be.

B) A *pIT219* plazmid készítése

(1) A *pIT213* plazmid *BamHI*-gyel linearizált formájának izolálása

Körülbelül 5 µg *pIT213* plazmidot emésztünk *BamHI* pufferben (150 mM nátrium-klorid, 6 mM Trisz-HCl, pH 7,9, 6 mM magnézium-klorid és 150 µg/ml szarvasmarha-szérumalbumin) 25 egység *BamHI* restriktív endonukleázzal 50 µl térfogatban 37 °C-on, amíg az emésztés teljesen lejátszódik. A linearizált *pIT213* plazmidot szokványos módon, agaróz-gélelektroforézissel izoláljuk és tisztítjuk.

(2) A *pIT143* plazmid ~230 bp *Bam*HI fragmentjének izolálása

Körülbelül 5 µg *pIT143* plazmidot *Bam*HI restrikciós endonukleázzal emésztünk, lényegében a 3. B) példa szerint. A fragmentet szokványos módon, poliakrilamid-gélelektroforézissel tisztítjuk.

(3) A *Bam*HI-gyel linearizált *pIT213* plazmid ligálása a *pIT143* plazmid ~230 bp méretű *Bam*HI fragmentjéhez

Körülbelül 2 µg *Bam*HI-gyel linearizált *pIT213* plazmidot és 2 µg, a *pIT143* plazmidból származó ~230 bp méretű *Bam*HI fragmentet inkubálunk együtt pufferben (20 mM Trisz-HCl, pH 7,6, 10 mM magnézium-klorid, 0,5 mM ATP és 10 mM ditiotreitolt) 1000 (New England Biolabs) egység T4 ligázzal 15 °C-on két órán át. A kapott DNS-sel transzformáljuk az *Escherichia coli* K12 RR1 (NRRL B-15210) törzset, és a keresett *pIT219* plazmidot az 1. A) példa szerint a kapott ampicillin-rezisztens *Escherichia coli* transzformánsokból izoláljuk. A plazmid szerkezetét szokványos módon restrikciós térképezéssel határozzuk meg. A *pIT219* plazmid restrikciós térképét a kísérő rajzok között a 7. ábrán mutatjuk be.

(4) *Saccharomyces cerevisiae* transzformálása *pIT219*-cel

A *Saccharomyces cerevisiae* replikációs origó és a hibrid PGK/HPT gén működését *Saccharomyces cerevisiae*-ben a *Saccharomyces cerevisiae* DBY-746 (ATCC 44773) és DBY-689 (vásárolható a Yeast Genetics Stock Center-től, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, California 94720) transzformálásával és azzal a megfigyeléssel igazoltuk, hogy a kapott higromicin-B-rezisztens *Saccharomyces cerevisiae* transzformánsokban a *pIT219* plazmid képes autonóm replikációra. A *Saccharomyces cerevisiae* protoplasztok készítését és transzformálását Hinnen *et al.* [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] módszerével végeztük, minimális módosításokat alkalmazva. Ezek szerint, ahelyett, hogy Hinnen *et al.* (1978) módszere szerint az élesztőt a regeneráló fedőagarhoz adnánk, az élesztőt 1,2 M szorbitolt tartalmazó komplett táptalajhoz adjuk és 30 ml-t teszünk minden egyes Petri-csészébe. Az auxotrófok komplementálása céljából a táptalaj 0,67% élesztő-nitrogénbázist tartalmaz aminosavak nélkül (Difco), valamint 2% glükózt, 3% agart, 1,2 M szorbitolt és más tápigényt kielégítő anyagokat 20 µg/ml koncentrációban. A higromicin-B-szelekció céljára alkalmazott szuszpendáló táptalaj 1% Bacto élesztőkivonatot, 2% Bacto peptont, 2% glükózt, 1,2 M szorbitolt és 3% agart tartalmaz. Különböző hosszú idő elteltével a lemezeket 500 µg/ml higromicin-B-t tartalmazó, ugyanilyen összetételű oldattal rétegezzük le.

A *pIT219* plazmidot tartalmazó sejteket közvetlenül lehet szelektálni transzformálás után, anélkül, hogy először uracil-prototrófiára szelektálnánk. A transzformált sejteket 20 ml, YPD plusz 1,2 M szorbitol és 3% agar összetételű lemezre szélesztjük és különböző

hosszú ideig inkubáljuk 30 °C-on. Ezeket a lemezeket ugyanilyen összetételű, 1,5 mg/ml higromicin-B-t tartalmazó táptalajból 10 ml-rel felülrétegezzük és az inkubálást 30 °C-on folytatjuk. Jóllehet a transzformálás után szükséges „magához térési” idő kísérletről kísérletre változott, kielégítő eredményeket kaphatunk, ha a higromicin-B-t négy óra elteltével adjuk a lemezek egy részéhez, és 20 órával a transzformálás után a lemezek másik részéhez. A magához térési idő kapcsolatban lehet a higromicin-B hatásmechanizmusával. Ha a higromicin-B-t négy órával transzformálás után adtuk a sejtekhez, az antibiotikum megölte néhány kísérletben a transzformált és transzformálatlan sejteket is, míg ezekben az esetekben ha az antibiotikumot 20 órával transzformálás után adtuk a sejtekhez, a transzformánsokat egyértelműen tudtuk szelektálni. Más kísérletekben 20 órával transzformálás után a háttérnövekedés már túl magas ahhoz, hogy a higromicin-B hozzáadása után könnyen tudjuk szelektálni a transzformánsokat. Ez a változékonyság származhat abból, hogy a protoplasztolásban használ zymolyáz milyen mértékben emésztette le a sejtfalat.

C) A *pIT221* plazmid készítése

(1) A *pIT220* plazmid emésztése *Sal*I restrikciós endonukleázzal

Körülbelül 5 µg *pIT220* plazmidot *Sal*I pufferben (10x puffer=1,5 M nátrium-klorid, 0,06 M Trisz-HCl, pH 7,5, 0,06 M magnézium-klorid, 0,06 M β-merkapto-etanol) 200 µl ösztérfogatban 37 °C-on 10 egység *Sal*I restrikciós endonukleázzal a hasítás teljes lejátszódásáig emésztünk. A DNS-t ezután a 6. A) példában leírt módon tisztítjuk.

(2) A *pIT219* plazmid ~3,3 kb *Sal*I-*Xho*I fragmentjének izolálása

Körülbelül 20 µg *pIT219* plazmidot inkubálunk 1x *Sal*I pufferben 200 µl ösztérfogatban 10–10 egység *Sal*I és *Xho*I restrikciós enzimmel 37 °C-on amíg az emésztés teljesen lejátszódik. A ~3,3 kb *Sal*I-*Xho*I fragmentet izoláljuk és tisztítjuk 7%-os poliakrilamidgélből (60:1=akrilamid:biszakrilamid) a 6. A) (1) példában leírtak szerint.

(3) A *pIT219* plazmid ~3,3 kb méretű *Sal*I-*Xho*I fragmentjének ligálása a *Sal*I-gyel hasított *pIT220* plazmiddal

Körülbelül 1 µg *Sal*I-gyel hasított *pIT220* plazmidot és a *pIT219* plazmid ~3,3 kb méretű *Sal*I-*Xho*I fragmentjéből 1 µg-ot a 6. A) (3) példában leírt módon ligálunk. A keresett *pIT221* rekombináns plazmidot az 1. A) példában leírt módon izoláljuk és tisztítjuk. A *pIT221* plazmid restrikciós térképét a kísérő rajzok között az 1. ábrán mutatjuk be.

7. példa

A *Cephalosporium acremonium* genetikai transzformálása *pIT221* plazmiddal

A) *Cephalosporium acremonium* törzsek

A transzformáláshoz előnyösen használható *Cephalosporium* törzset az Anoricon Type Culture Collection-

től kaptuk, ATCC 11550 lajstromszám alatt. Más restriktiómentes *Cephalosporium* törzs, vagy az ATCC 11550-ből a cefalosporin-C termelésének javítása céljából mutációval/szelekcióval vagy genetikai keresztezéssel származó ipari törzs is használható.

B) Oltóanyag-készítés a sejtenyészethez

Hogy hatékonyan tudjuk a *Cephalosporium acremonium* sejteket genetikusan transzformálni, ehhez az szükséges, hogy a sejtfaalakot eltávolítsuk és stabil protoplasztokat képezzünk. Ilyen protoplasztok készítésekor nagyon előnyös, ha egyöntetű oltóanyagból indulunk ki. Máskülönben a sejtek nem reprodukálható módon keletkeznek a tenyészetben és csak az időt vesztesítjük az alkalmatlan, vagy nem elegendő mennyiségű sejtekből való protoplasztkészítési kísérletekkel.

C) Egységes oltóanyag készítése sejtenyészethez

Egy spórát tartalmazó ampullát (körülbelül 10^9 konidium 1,5 ml tároló közegben, 5% laktóz, 10% glicerin és 0,1% Tween 80) kiveszünk a folyékony nitrogénes tárolóból szobahőmérsékleten megolvasszjuk és 5 ml steril sóoldattal hígítjuk. Körülbelül 0,1–0,1 ml szuszpenzióval oltunk 50 ferdeagart, mely 20 ml Triptikáz-szójaagart (BBL) tartalmaz. Oltás előtt a táptalajt addig hagyjuk száradni, míg a felületi nedvesség már nem látható. A beoltott ferdeket körülbelül négy napig $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. Körülbelül 10 ml tároló, táptalajt adunk az egyes ferdek felszínét borító micéliális növekedéshez. A ferdeagarakat Vortexeljük a konidiumok szuszpendálása céljából, az egyes ferdekről származó konidiumszuszpenziókat egyesítjük és 10 ml-es alikvot részeket $80\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasz-tunk. A lefagyasztott konidiumszuszpenzió lassan elveszti életképességét és három havi, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -os tárolás után már nem használható.

D) A sejtek növesztése protoplasztkészítés céljából

500 ml-es Erlenmeyer-lombikban lévő körülbelül 106 ml vizes táptalajt 10 ml fagyasztott konidiumszuszpenzióval oltunk. A sejteket centrifugálással nyerjük ki (10 perc, 2600/perc), majd közvetlenül szuszpendáljuk a vizes tenyésztő táptalajban.*

* A vizes tenyésztő táptalajt következőképpen állítjuk elő: 100 ml A oldatot teszünk 500 ml-es Erlenmeyer-lombikba, a lombikot szokásos módon lezárjuk és $121\text{ }^\circ\text{C}$ -on 20 percig autoklávozunk. Két ml B oldatot és 4 ml C oldatot adunk ezután az A oldathoz.

A felülúszó dekantálására a szuszpendálás előtt azért van szükség, mert a laktóz és a glicerin hátrányosan befolyásolja a sejtek növekedését. A szuszpendált sejteket tartalmazó lombikot körkörös vízfürdős rázógépre helyezük és 24 órán át 285/perc fordulatszámmal, 2,54 cm-es kitéréssel $29\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. Fontos figyelni arra, hogy az ajánlott hőmérséklet $29\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ a tenyésztő lépésben, így kapunk ugyanis transzformálható protoplasztok készítésére alkalmas sejteket. Azonban az alacsonyabb, $25\text{ }^\circ\text{C}$ -os hőmérséklet is alkalmas.

A szakterületen jártas szakember felismeri, hogy a $29\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ különbözik a $25\text{ }^\circ\text{C}$ -tól, mely a *Cephalosporium acremonium*-nak antibiotikum-termelés céljából való tenyésztése esetén célszerű.

5	A oldat:	Glükóz	36 g/l
		L-aszparagin	7,5 g/l
		KH_2PO_4	15 g/l
		K_2HPO_4	21 g/l
10		Na_2SO_4	0,75 g/l
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,18 g/l
		CaCl_2	0,06 g/l
		sóoldat	1 ml/l,
			természetes pH
15	Sóoldat:	$\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15 g/l
		$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3 g/l
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 g/l
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,8 g/l
	B oldat:	Glükóz	108 g/l
20			($121\text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 percig autoklávozva)
	C oldat:	Glükóz	25 g/l
		kukoricalekvár*	12,5 ml
		ammónium-acetát	5,5 g/l
25		CaCO_3	5 g/l
		pH 6,5 KOH-dal	
		Sterilizés $121\text{ }^\circ\text{C}$, 20 perc	

* 4 N % nitrogén

E) *Cephalosporium protoplasztok készítése*

24 órás tenyészetből származó sejteket vákuumszűrővel összegyűjtünk (Whatman # 1 papír Büchner-tölcsérben), majd 7,1-es pH-jú Mc Ilvaine-pufferben szuszpendáljuk (0,1 M citromsav, 0,2 M kétbázisú nátrium-foszfát), ehhez 0,01 M koncentrációban ditiotreitolt adunk. Annyi puffert használunk hogy a végső sejt koncentráció 1 g (szűrés után mért) sejt tömeg per 20 ml puffer legyen. A sejt szuszpenziót körkörös vízfürdős rázóra helyezük 50 ml-es lombikban és 90 percig 140/perc fordulatszámmal, 2,54 cm-es kitéréssel $29\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. A ditiotreitollal kezelt sejteket vízzel mossuk, majd az enzimoldatban szuszpendáljuk [25 mg/ml béta-glükuronidáz (Sigma Chemical Company) Mc Ilvaine-pufferben pH 6,35, 0,8 M nátrium-kloriddal és 0,2 M magnézium-szulfáttal kiegészítve]. A végső sejt koncentráció: 1 g kezelt sejt tömeg 10 ml enzimoldatban. A sejt szuszpenziót ezután körkörös, vízfürdős rázógépre helyezük és 3 órán át 120/perc fordulatszámmal, 2,54 cm-es kitéréssel $29\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. A protoplaszt szuszpenziót 4 térfogat mosóoldattal hígítjuk (0,8 M nátrium-klorid és 0,02 M magnézium-klorid), majd gravitációs szűrővel két réteg papírtörülközőn szűrjük át. A protoplasztokat tartalmazó szűrletet 5 percig 2600/perc fordulatszámmal, szobahőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszót dekantáljuk és a protoplasztüledéket 10 ml mosóoldatban szuszpendáljuk. Miután a mosást kétszer megismételtük, a mosott protoplasztokat elegendő 0,8 M nátrium-kloridban szuszpendáljuk, így $2\text{--}3 \cdot 10^8$ protoplasztot kapunk milliliterenként (hemacytométer szám).

F) Transzformálás

1 ml *Cephalosporium* protoplasztuszszuszpenzióhoz (2–3·10⁸ protoplaszt/ml, 0,8 M nátrium-klorid-oldatban) 0,005 ml frissen desztillált dimetil-szulfoxidot és 80 mM végkoncentrációban kalcium-kloridot adunk, majd körülbelül 1–20 mikrogramm pIT221 DNS-t. Ezután 4000-es molekulatömegű polietilén-glikolt (Baker >20 V% vízben) adunk hozzá, annyit, hogy a keverék térfogata 10 ml legyen. A keveréket 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 700/perc fordulatszámmal 5 percig, utána 2500/perc fordulatszámmal 10 percig centrifugáljuk. A protoplasztüledéket 1 ml, 0,8 M nátrium-kloridban szuszpendáljuk. 0,1 ml-es alikvot részeket viszünk ki Triptikáz-Szója, agartáptalaj (BRL) felszínére, melyet a protoplasztok ozmatikus stabilizálása céljából 10,8% szacharózzal egészítünk ki. A Petri-lemezeket 24 órán át 15 °C-on inkubáljuk, majd 4 ml, 0,8 M nátrium-kloridot és a 100 µg/ml végkoncentrációé létrehozásához szükséges mennyiségű higromicint tartalmazó folyékony agart (0,41 V%, 42 °C) adunk mindegyik Petri-csészébe. Miután a felülrétegezett agar megszilárdult, a Petri-lemezeket 25 °C-on, nedvesített légtérű kamrában inkubáljuk. Jól lehet izolálásra alkalmas méretű transzformáns telepek jelen vannak már 12 nappal a transzformálás után, a lassan növekvő transzformánsok esetleg 60 napig is nőnek. Az elvetélt transzformánsokat könnyű megkülönböztetni a stabil transzformánsoktól, mivel ezek nem nőnek friss szelektív táptalajra való áttöltés után.

8. példa

A (³²P) pBR322 plazmid DNS-ének Southern-hibridizálása a *Cephalosporium CPC-T1* transzformáns nagy molekulatömegű DNS-éhez

A Southern-hibridizációs kísérletek egyértelmű bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy higromicinrezisztens *Cephalosporium* transzformánsok, úgymint például a CPC-T1 keletkezik a *Cephalosporium acremonium* protoplasztokkal és pIT221 plazmiddal végzett transzformációs kísérletből. Az egyik kísérletben körülbelül 2,2·10⁸ protoplaszt volt jelen egy 10 ml-es transzformációs elegyben 20 mikrogramm pIT221 plazmid DNS-sel. A teljes transzformációs elegyet 0,1 ml alikvot részekben Petri-csészékre vittük, és szelektív táptalajon inkubálva 60 napig figyeltük. Ezalatt az idő alatt három telep nőtt ki. A telepek közül a legnagyobb a CPC-T1, a kisebbek a CPC-T2 és CPC-T3 jelzést kapták. Egy „vak” pIT221 transzformációs elegyet is használtunk. Egyébként az eljárás azonos volt. A transzformációs elegy egy milliliteréből 6·10⁵ telepképző egységet kapunk, a „vak” elegy alikvot részzeit nem szelektív táptalajra (higromicin nincs jelen) szélesztve. Egyáltalán nem kaptunk növekedést a „vak” transzformációs eleggyel beoltott szelektív táptalajon. A hígított (10⁴-szeres hígítás) „vak” transzformációs eleggyel beoltott nem szelektív táptalajról kiválasztottunk egy telepet és kontrollnak neveztük el. A CPC-T1, -T2 és -T3 telepek részeit folyékony nitrogénbe helyeztük. A CPC-T1 telep egy részét nem szelektív táptalajon elszaporítottuk és a CPC-T1 tenyészetből, valamint

a „kontroll” tenyészetből Minuth és munkatársai módszerével (1982) DNS-t izoláltunk. A CPC-T1 és a „kontroll” izolátumból származó, ekvivalens mennyiségű DNS-t agarózgélén elektroforetizálunk. Összehasonlítás céljából lambda-fágból, a DBY-746 élesztőből és a DBY-746 élesztő YRp7 transzformánsából származó DNS-preparátumokat is megfuttattuk. Az YRp7 (ATCC 37060) egy olyan élesztő/*Escherichia coli* hibrid plazmid, mely a DBY-746/YRp7 törzsből autonóm replikálódó formában van jelen. A lambda-DNS-t *EcoRI/BamHI* enzimekkel emésztettük elektroforézis előtt. Az elektroforézis és etidium-bromidos festés után az *EcoRI/BamHI* fragmentek helyzetét ismert méretükkel (1,1–16,3 kilobázis) jelöltük. Southern-hibridizációt végeztünk az agarózgélén, (³²P) pBR322-t használva DNS-próbaként {a Nick-transzlációt Rigby *et al.* [J. Mol. Biol. 113, 237 (1977)] módszerével végeztük}. A CPC-T1 izolátumból származó nagy molekulatömegű DNS-nek megfelelő egyik csík tiszta és erős hibridizációt mutatott a (³²P) pBR322 próbához. Ezzel ellentétben a „kontroll”, azaz a „vak” transzformációból származó transzformálatlan gazdasejtéből származó DNS egyáltalán nem mutatott hibridizációt. Hasonlóképpen, a DBY-746 élesztőtörzsből származó össz-DNS nem hibridizálódott a (³²P) pBR322 DNS-hez, míg a DBY-746 YRp7-tel transzformált sejtjeiből származó össz-DNS-ben voltak olyan DNS-csíkok, melyek hibridizáltak a (³²P) pBR322-höz. Ezek a sávok megfelelnek a szabadon replikálódó YRp7 plazmid ccc (covalently closed circular, normál állapotú) lineáris, nyitott kör és multimer formáinak. Ez a plazmid Struhl és munkatársai közleménye szerint [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1036 (1979)] pBR322 szakaszokat tartalmaz.

A higromicin-rezisztens *Cephalosporium acremonium* CPC-T1 izolátumból származó nagy molekulatömegű DNS-nek a (³²P) pBR322-höz való hibridizálódása azt mutatja, hogy ez az izolátum egy olyan transzformáns, melyben a pIT221 plazmid vagy annak egy része integrálódott a *Cephalosporium* genomba. A pIT221 plazmid ccc, lineáris vagy nyitott kör alakjának megfelelő hibridizációs csíkok nem találhatóak a CPC-T1-ből származó DNS-ben. Külön kísérletekben kimutattuk, hogy a CPC-T2 és a CPC-T3 higromicin-rezisztens izolátumokból származó nagy molekulatömegű DNS is hibridizálódott a (³²P) pBR322-höz. A transzformálatlan *Cephalosporium acremonium* kontrollok ismét nem hibridizálódtak.

9. példa

A (³²P) pBR322 plazmid Southern hibridizálódása a *Cephalosporium CPC-T1* transzformáns emésztett össz-DNS-éhez

A CPC-T1 klónból származó *Cephalosporium acremonium* sejtek a pIT221 DNS-sel való transzformálás után genotípusosan higromicin-rezisztensek lettek. Mivel a pIT221 plazmid tartalmaz a pBR322 plazmidből származó részeket, az ezekből a higromicin-rezisztens sejtekből származó emésztetlen össz-DNS-ben lévő (³²P) pBR322-vel hibridizáló DNS egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a CPC-T1 klónból származó sejtek pIT221

DNS-t tartalmaznak. Mivel a transzformáció előtti sejt-ből származó össz-DNS nem hibridizálódik a (³²P) pBR322-höz, ez azt bizonyítja, hogy a kialakult higromicin-rezisztencia a pIT221 plazmid bejutásával van kapcsolatban. A CPC-T1 hasítatlan össz-DNS (³²P) pBR322-höz hibridizálódó részének agarózgélben való vándorlási sebessége azt mutatja, hogy a pIT221 plazmid integrálódott a nagy molekulatömegű *Cephalosporium acremonium* DNS-be. Mivel a higromicin-rezisztens sejtek össz-DNS-ének alacsony molekulatömegű részében semmi nem hibridizálódik a (³²P) pBR322 DNS-hez, ez azt mutatja, hogy a pIT221 plazmid nem létezik autonóm replikálódó formában a CPC-T1 klón sejtjeiben. A (³²P) pBR322-höz hibridizálódó többszörös szakaszokat a *Cephalosporium* CPC-T1 transzformáns emésztett össz-DNS-ében nem részleges DNS-emésztést tükröznek.

A pIT221 plazmid integrációjáról kimutatták, hogy több, mint egy helyen történik. Mivel a *KpnI* enzim nem hasítja a pIT221 plazmidot, ezért ha a pIT221 plazmid csak egy helyen épült be a CPC-T1 kromoszómájába, akkor a CPC-T1 össz-DNS *KpnI* enzimmel való emésztésekor csak egyetlen (³²P) pBR322-höz hibridizálódó fragmentet kapnánk. A CPC-T1 össz-DNS *KpnI* enzimmel való emésztésekor kapott két, (³²P) pBR322-höz hibridizálódó fragmentet azt mutatja, hogy a pIT221 plazmid legalább kétszer integrálódott a gombakromoszómába; egyszer a *Cephalosporium acremonium* DNS olyan régiójába, melyet a beépült pIT221 plazmid DNS-től távol levő *KpnI* helyek határolnak, egyszer pedig a *Cephalosporium acremonium* DNS olyan régiójába, melyet a beépített DNS végeihez közel levő *KpnI* helyek határolnak. A CPC-T1 össz-DNS *SacI* és *XbaI* emésztése után megfigyelt, a (³²P) pBR322-höz hibridizálódó fragmentek száma szintén azt sugallja, hogy a CPC-T1-ben a pIT221 plazmid többszörös integrálódása fordul elő. A gombage-nomba való minden egyes integrációnál a CPC-T1 össz-DNS teljes *SacI* vagy *XbaI* emésztésekor két, (³²P) pBR322-höz hibridizálódó fragmentet várhatunk. A *SacI*-gyel való teljes emésztésekor nyolc, az *XbaI* enzimmel való emésztésekor hat, a (³²P) pBR322-höz hibridizálódó fragmentet keletkezett. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pIT221 plazmid legalább négy különböző helyre integrálódott.

10. példa

A pIT221 plazmidon levő higromicin-foszfozotranszferáz-gén kimutatása a *Cephalosporium acremonium* transzformánsokban

Hogy tovább vizsgáljuk a CPC-T1 *Cephalosporium acremonium* transzformánsban megnyilvánuló higromicin-rezisztencia alapját, ehhez az szükséges, hogy fizikailag kimutassuk a pIT221 plazmidon levő higromicin-foszfozotranszferáz (HPT) génszakaszok jelenlétét. A pJC10 plazmidból lehet megfelelő próbát készíteni ennek a fizikai tesztnek a végrehajtásához. A pJC10 plazmid tartalmazza a pIT221 plazmidban jelen lévő teljes HPT-génszakaszt, és így keletkezett, hogy az előzőekben leírt pKC203 plazmidból keletkező nagy BglII fragmentet cirkularizáltuk. A megfelelő próba tartalmazza a HPT-gént, de semmi más, a pIT221 plazmid vagy a befogadó

Cephalosporium törzs DNS-éhez hibridizálódó DNS-t. A pIT221 öt típusú DNS-t tartalmaz

- 1) pBR322 szakaszt
- 2) a *Cephalosporium* mitokondriális DNS-ből származó 1,8 kb méretű *PstI* fragmentet,
- 3) a Tn 601 inaktív fragmentjét,
- 4) két *Saccharomyces cerevisiae* DNS-szakaszt egy, 0,275 kb méretű *BamHI* fragmentet az élesztő DNS-ből, melyen a PKG-aktiváló szakasz található, és egy másik 40 bp méretű, ismeretlen funkciójú szakaszt,
- 5) a pKC203 plazmidból származó, csonkított formájú HPT-gént.

Ezeknek a DNS-daraboknak a helyzete az előzőekben leírt pIT221 plazmid szerkezetéből ismert. A (³²P) pJC10 plazmidot használtuk még *PstI*-gyel, *BamHI*-gyel, *EcoRI*-gyel és *HindIII*-mal emésztett pIT221 plazmidminták vizsgálatára. Ezek a Southern-hibridizációs kísérletek azt mutatták, hogy csak a HPT-gént vagy darabjait tartalmazó fragmentek hibridizálódtak a (³²P) pJC10 próbához.

11. példa

A (³²P) pJC10 plazmid Southern-hibridizációja a CPC-T1 *Cephalosporium* transzformáns nagy molekulatömegű DNS-éhez

Transzformálatlan *Cephalosporium*ból származó hasítatlan össz-DNS-t és a pIT221 plazmiddal transzformált CPC-T1 *Cephalosporium*ból származó hasítatlan össz-DNS-t elektroforetizálunk agarózgélben. A DNS-eket (³²P) pJC10 plazmidból készült próbához hibridizáljuk Southern-technikával. Az eredmények azt mutatják, hogy a (³²P) pJC10 a CPC-T1 *Cephalosporium* transzformáns nagy molekulatömegű DNS-éhez hibridizálódik. Autonóm replikálódó plazmidnak megfelelő sávot nem találtunk. Az a tény, hogy a (³²P) pJC10 plazmid nem képes a transzformálatlan *Cephalosporium*ból származó DNS-ből hibridizálódni, azt mutatja, hogy a CPC-T1 a kromoszómába integrálódott, pIT221-en lévő HPT-gént (géneket) tartalmaz. Ugyanezeket az eredményeket kapjuk a CPC-T2 és CPC-T3 *Cephalosporium* transzformánsokból származó hasítatlan össz-DNS-sel is külön Southern-hibridizációs kísérletben, ugyanennek a próbának a használatával.

12. példa

Higromicin-rezisztencia a CPC-T1 transzformánsban körülbelül 25 generáción át tartó, nem szelektív táptalajon való növesztés után

Hogy a *Cephalosporium acremonium*/pIT221 stabilitására számszerű értéket kapjunk, a szelektív agaron nőtt (100 mikrogramm per milliliter higromicint tartalmaz) CPC-T1 telep 0,5 cm-es részét eltávolítjuk és nem szelektív táptalajon 14 cm átmérőjűre növesztjük. A nem szelektív táptalajon nőtt sejteket eltávolítjuk, sóoldatban szuszpendáljuk, homogenizáljuk, hígítjuk és szelektív, valamint nem szelektív táptalajra szélesztjük. A II. táblázatból láthatjuk, hogy a telepkepző egysegek száma lényegében azonos mind a szelektív, mind a nem szelektív táptalajon.

II. táblázat

A CPC-T1 *Cephalosporium* transzformáns stabilitása körülbelül 25 generáción át tartó, nem szelektív táptalajon való növesztés után

Kísérlet száma	Rezisztens sejtek száma
# 1	100%
# 2	94%

Eljárás

10,3 g szacharózzal és 100 µg/ml higromicin-B-vel kiegészített Triptikáz-szója agartáptalajon nőtt *Cephalosporium acremonium*/pIT221 sejtekből egy 0,5 cm széles csíkot higromicin-B nélküli Triptikáz-Szója-Szacharóz agarra viszünk át. Mikor a telep átmérője eléri a 14 cm-t, a növekedést eltávolítjuk a nem szelektív táptalajról, sóoldatban szuszpendáljuk, egyenletes sóoldattá szuszpendáljuk, hígítjuk sóoldatban, majd Triptikáz-Szója-Szacharóz agartáptalajra és ugyanilyen összetételű, 100 µg/ml higromicin-B-vel kiegészített táptalajra szélesztjük.

Eredmények: 1. kísérlet:

CFU (telepképző egység) nem szelektív táptalajon=21

CFU szelektív táptalajon=22

2. kísérlet:

CFU nem szelektív táptalajon=213

CFU szelektív táptalajon=201

A CPC-T1 *Cephalosporium* transzformáns higromicin-rezisztens fenotípusának stabilitása egybevág a *Cephalosporium* transzformánsok nagy molekulatömegű DNS-ében a HPT-génszakasz jelenlétének fizikai kimutathatóságával.

Egy második kísérletben a CPC-T1 48 órás vegetatív tenyészetéből egy alikvot résszel a cefalosporin-C szintézisére alkalmas táptalajt oltunk. 96 órás fermentáció után a tenyészle alikvot részét a következő szempontok szerint analizáljuk.

1) a penicillin-N és cefalosporin-C antibiotikumok mennyisége,

2) az élő sejtek száma,

3) az élő higromicin-B-rezisztens sejtek száma.

Az élő CPC-T1 sejtek mért száma (nem szelektív, azaz higromicint nem tartalmazó táptalajon növesztve) a statisztikai analízis szerint lényegében ugyanannyi volt, mint az élő higromicin-rezisztens CPC-T1 sejtek száma (szelektív agaron, azaz higromicin jelenlétében növesztve). A szelektív táptalajra (100 µg/ml higromicin-B) kiszélesztett transzformálatlan *Cephalosporin* sejtek közül egy sem nőtt. Mind a CPC-T1 transzformáns mind a kiindulási törzs termelt β-laktám antibiotikumokat a fermentációs tenyészetben. A sejtek tömegére számítva a termelt antibiotikum mennyisége közel azonos volt, jóllehet a CPC-T1 növekedési sebessége és a sejtek össztömege kicsit alacsonyabb volt, mint a transzformálatlan szülőé. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a pIT221 *Cephalosporium acremonium* transzfor-

mánsok elég stabilak ahhoz, hogy a cefém antibiotikumok ipari fermentációjában használják őket szelektív ágensként hozzáadott higromicin-B nélkül.

5 13. példa

A pPS6 plazmid készítése

A) Riboszomális DNS-szakasz izolálása

*Cephalosporium acremonium*ból

(1) Génbank készítése

10 A kívánt génbankot szokványos módon készítjük *Cephalosporium acremonium*ból (bármely *Cephalosporium acremonium* törzs elfogadható, különösen az ATCC 11550 és ATCC 14553 törzsek) lényegében Rimun és munkatársai (Gene, 12, 301, 1980) módszerével. Ezenkívül a génbank készítésében alkalmazható eljárásokat ismertettek Maniatis és munkatársai (1982). A Charon 28 bakteriofágot és az *Escherichia coli* K12 Q359 baktériumgazda-törzset használjuk a génbank készítésében. A Charon 28 bakteriofág megvásárolható a Bethesda Research Laboratory-tól, Gaithersburg, Maryland, míg az *Escherichia coli* K12 Q359-et Regional Research Laboratory-nál, Peoria, Illinois helyezték letétbe, és lett az állandó törzsgyűjtemény része. A törzset az NRRL-15894 sorszám alatt található meg.

25 A *Cephalosporium acremonium* össz-DNS-t lényegében az 5. B) példában leírt eljárással izoláljuk. A DNS-t részlegesen emésztjük *Mbol** restriktions enzimmel az 5. C) (2) példában leírt eljárás szerint, azzal a különbséggel, hogy az *Mbol* DNS-fragmenteket méret szerint frakcionáljuk szacharózgradiensen.

A 15–20 kb méretű fragmenteket választjuk a génbank készítéséhez.

30 A Charon 28 bakteriofág DNS-ét teljesen megemésztjük *Bam*HI restriktions enzimmel, lényegében a 6. B) (1) példában leírt módon. A Charon 28 DNS-ből három fragment keletkezik: a jobb kar, a középső, ~7 kb méretű, „kitömő” fragment és a bal kar. A középső ~7 kb méretű, „kitömő” fragmentet szacharózgradiens centrifugálással eltávolítjuk, majd a ~15–20 kb méretű *Cephalosporium acremonium* DNS-fragmenteket ligáljuk a Charon 28 bakteriofág DNS-ének bal és jobb karjához, lényegében a 6. A) (3) példában leírt módszer szerint. A ligált anyagot használjuk az *in vitro* pakolási reakcióban. Az *in vitro* pakoláshoz szükséges anyagok és kiték megvásárolhatók, például a Promega Brotech-től, Madison, Wisconsin, vagy más jól ismert cégektől. A kapott bakteriofág-részecskékkal szokványos módon fertőzzük az *Escherichia coli* K12 Q359 törzset és a kapott plakkok között keressük a kívánt DNS-szakaszt, a Maniatis és munkatársai által leírt (1982) plakkhibridizációs technikával.

55 * Az *Mbol* restriktions enzim reakcióelegyének összetétele a következő:

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 mM MgCl₂

60 1 mM Ditiotritol

(2) A riboszomális DNS keresése a kromoszomális génbankban

Ezt az eljárást úgy hajthatjuk végre legjobban, hogy olyan radioaktív próbát használunk, mely a keresett gén egy részét, vagy azzal közeli rokonságban levő szakaszt tartalmaz. A pY1rA12 plazmid tartalmazza az 5,8, 18 és 25S riboszomális RNS-géneket kódoló élesztő DNS-szakaszokat, és előnyösen használható vizsgálatban. A plazmidot a Northern Regional Research Laboratory-nál helyezték letétbe és lett az állandó gyűjtemény része, hozzáférhető az NRRL B-15888 sorszám alatt. A pY1rA12 plazmidot Nick-transzlációval ³²P-dCTP-vel jelöljük lényegében Rigby és munkatársai módszerével [J. Mol. Biol., 113, (1977)]. A jelzett pY1rA12 plazmiddal hibridizálódó egyik plakkot megtisztítjuk és a DNS-t Maniatis és munkatársai módszerével (1982) kivonjuk a bakteriofágból. A restriktív analízis és a Southern-hibridizációs analízis kiderítette, hogy egy ~3,7 kb méretű *Xma*I fragment hibridizálódik a pY1rA12 plazmiddal. A ~3,7 kb méretű fragmentet DEAE-celulózspapírra végzett elektroelúcióval izoláljuk, lényegében az 5. C) (1) példában leírt módszer szerint, és ez a fragment a kívánt *Cephalosporium acremonium* riboszomális DNS-t tartalmazó szakasz.

B) A pIT221 plazmid emésztése *Xma*I enzimmel

A kívánt emésztést lényegében a 6. A) példában leírt eljárással végezzük, azzal a különbséggel, hogy a *Pst*I restriktív enzim és reakció-puffer helyett *Xma*I restriktív enzimet és reakciópuffert* használunk. Egy ~274 bp méretű és egy ~8 kb méretű fragment keletkezik a pIT221 plazmid emésztése során.

* Az *Xma*I restriktív enzim reakciópufferét a következő összetételben állítjuk elő:

10 mM Trisz-HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM ditiotreitolt

C) Az *E. coli* K12 600/pPS6 ligálása és végső előállítás

A ~3,7 kb méretű *Xma*I fragmentből körülbelül 0,125 µg-ot keverünk össze az *Xma*I-gyel emésztett pIT221 plazmid 0,1 µg-jával. A fragmenteket lényegében az 5. C) (3) példában leírtak alapján ligáljuk. A kapott pPS6 jelű plazmidot használjuk az *Escherichia coli* K12 C600 törzs ampicillin-rezisztenssé transzformálására, lényegében Mandel és Higa (1970) módszerével. Egy tisztított transzformánsból izoláljuk a plazmid DNS-t és restriktív enzimes emésztéssel elemezzük. A pPS6 plazmid restriktív térképét a kísérő rajzok között, a 8. ábrán mutatjuk be.

14. példa

A *Cephalosporium acremonium*/pPS6 készítése

A kívánt konstrukciót lényegében a 7. példában leírtak alapján készítjük, azzal a különbséggel, hogy a pIT221 plazmid helyett pPS6 plazmidot használunk.

15. példa

A pETS702 és pPLS221 plazmidok készítése

A) A pIJ702 plazmid emésztése *Pst*I-gyel

A pIJ702 plazmid (ATCC 39155) kívánt emésztését lényegében az 5. C) (2) példa szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy a részleges emésztés helyett teljes emésztést végzünk.

B) A pIT221 plazmid részleges emésztése

A kívánt részleges emésztést lényegében az 5. C) (2) példában leírtak szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy a pRB12 plazmid helyett a pIT221 plazmidot használjuk.

C) Az *E. coli* K12 C600/pETS702 és az *E. coli* K12 C600/pPLS221 ligálása és végső elkészítése

A fenti A és B DNS-emésztések kívánt ligálását lényegében az 5. C) (3) példában leírtak szerint végezzük. A kapott pETS702 és pPLS221 jellel jelölt plazmidokat használjuk az *E. coli* K12 C600 törzs ampicillin-rezisztenssé transzformálására, lényegében Mandel és Higa módszerével (1970). Két ~13 kb méretű plazmidot kapunk a fenti ligálásból, mivel a pIJ702 plazmid DNS-t ligálhatjuk a pIT221 plazmid 5 óránál vagy 8 óránál lévő *Pst*I restriktív helyére (lásd 1. ábra). Az 5 óránál lévő helyre való ligálás eredményeképpen kapjuk a pETS702 plazmidot, a 8 óránál lévő helyre való ligálás eredményeképpen kapjuk a pPLS221 plazmidot. A pIJ702 fragment orientációja mindkét plazmidban olyan, hogy a *Kpn*I hasítási hely közelebb van a pIT221 plazmid DNS *Sal*I hasítási helyéhez. A plazmidokat szokványos módon izoláljuk az *E. coli* K12 C600 transzformánsokból és restriktív enzimes analízissel azonosítjuk.

16. példa

A *Streptomyces lividans*/pPLS221 készítése

A kívánt konstrukciót lényegében a 4 468 462 sorszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (főleg a 9. példa) alapján készítjük el, azzal a különbséggel, hogy *Sambofaciens* helyett *Streptomyces lividans*-t használunk.

17. példa

A *Cephalosporium acremonium*/pPLS221 készítése

A kívánt konstrukciót lényegében a 7. példában leírtak szerint készítjük el, azzal a különbséggel, hogy a pIT221 plazmid helyett a pPLS221 plazmidot használjuk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás *Cephalosporium* gazdasejtek transzformálására, azzal jellemezve, hogy legalább

1) higromicin-foszfotranszferáz kódoló szakaszt és ennek kifejeződését elősegítő módon elhelyezett *Saccharomyces cerevisiae* transzkripció és transzláció aktiválós szakaszt és autonóm replikációt lehetővé tevő szakaszt vagy a gazdagenommal homológ régiót tartalmazó rekombináns DNS-vektort juttatunk *Cephalosporium* gazdasejtebe és

2) az említett gazdasejtet higromicint tartalmazó tápközegen növesztjük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vektorként egy plazmidot juttatunk a gazdasejtbe.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* transzkripció és

transzlációs aktiválószerkezetként a foszfoglicerát-kináz-gén transzkripció és transzlációs aktiválószerkezetét tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a következő nukleotid-sorrendű szakaszt tartalmazó vektort juttatjuk a gazdasejtbe:

												Rm
												R _{1m}
R2n	CCT	GAA	CTC	ACC	GCG	ACG	TCT	GTC	GAG	AAG	TTT	CTG
R3n	GGA	CTT	GAG	TGG	CGC	TGC	AGA	CAG	CTC	TTC	AAA	GAC
	ATC	GAA	AAG	TTC	GAC	AGC	GTC	TCC	GAC	CTG	ATG	CAG
	TAG	CTT	TTC	AAG	CTG	TCG	CAG	AGG	CTG	GAC	TAC	GTC
	TCG	GAG	GGC	GAA	GAA	TCT	CGT	GCT	TTC	AGC	TTC	GAT
	AGC	CTC	CCG	CTT	CTT	AGA	GCA	CGA	AAG	TCG	AAG	CTA
	GGA	GGG	CGT	GGA	TAT	GTC	CTG	CGG	GTA	AAT	AGC	TGC
	CCT	CCC	GCA	CCT	ATA	CAG	GAC	GCC	CAT	TTA	TCG	ACG
	GAT	GGT	TTC	TAC	AAA	GAT	CGT	TAT	GTT	TAT	CGG	CAC
	CTA	CCA	AAG	ATG	TTT	CTA	GCA	ATA	CAA	ATA	GCC	GTG
	GCA	TCG	GCC	GCG	CTC	CCG	ATT	CCG	GAA	GTG	CTT	GAC
	CGT	AGC	CGG	CGC	GAG	GGC	TAA	GGC	CTT	CAC	GAA	CTG
	GGG	GAA	TTC	AGC	GAG	AGC	CTG	ACC	TAT	TGC	ATC	TCC
	CCC	CTT	AAG	TCG	CTC	TCG	GAC	TGG	ATA	ACG	TAG	AGG
	CGT	GCA	CAG	GGT	GTC	ACG	TTG	CAA	GAC	CTG	CCT	GAA
	GCA	CGT	GTC	CCA	CAG	TGC	AAC	GTT	CTG	GAC	GGA	CTT
	GAA	CTG	CCC	GCT	GTT	CTG	CAG	CCG	GTC	GCG	GAG	GCC
	CTT	GAC	GGG	CGA	CAA	GAC	GTC	GGC	CAG	CGC	CTC	CGG
	GAT	GCG	ATC	GCT	GCG	GCC	GAT	CTT	AGC	CAG	ACG	AGC
	CTA	CGC	TAG	CGA	CGC	CGG	CTA	GAA	TCG	GTC	TGC	TCG
	TCC	GGC	CCA	TTC	GGA	CCG	CAA	GGA	ATC	GGT	CAA	TAC
	AAG	CCG	GGT	AAG	CCT	GGC	GTT	CCT	TAG	CCA	GTT	ATG
	ACA	TGG	CGT	GAT	TTC	ATA	TGC	GCG	ATT	GCT	GAT	CCC
	TGT	ACC	GCA	CTA	AAG	TAT	ACG	CGC	TAA	CGA	CTA	GGG
	GTG	TAT	CAC	TGG	CAA	ACT	GTG	ATG	GAC	GAC	ACC	GTC
	CAC	ATA	GTG	ACC	GTT	TGA	CAC	TAC	CTG	CTG	TGG	CAG
	GCG	TCC	GTC	GCG	CAG	GCT	CTC	GAT	GAG	CTG	ATG	CTT
	CGC	AGG	CAG	CGC	GTC	CGA	GAG	CTA	CTC	GAC	TAC	GAA
	GCC	GAG	GAC	TGC	CCC	GAA	GTC	CGG	CAC	CTC	GTG	CAC
	CGG	CTC	CTG	ACG	GGG	CTT	CAG	GCC	GTG	GAG	CAC	GTG
	GAT	TTC	GGC	TCC	AAC	AAT	GTC	CTG	ACG	GAC	AAT	GGC
	CTA	AAG	CCG	AGG	TTG	TTA	CAG	GAC	TGC	CTG	TTA	CCG
	ATA	ACA	GCG	GTC	ATT	GAC	TGG	AGC	GAG	GCG	ATG	TTC
	TAT	TGT	CGC	CAG	TAA	CTG	ACC	TCG	CTC	CGC	TAC	AAG

GAT TCC CAA TAC GAG GTC GCC AAC ATC TTC TTC TGG AGG
 CTA AGG GTT ATG CTC CAG CGG TTG TAG AAG AAG ACC TCC

CCG TGG TTG GCT TGT ATG GAG CAG CAG ACG CGC TAC TTC
 GGC ACC AAC CGA ACA TAC CTC GTC GTC TGC GCG ATG AAG

GAG CGG AGG CAT CCG GAG CTT GCA GGA TCG CCG CGG CTC
 CTC GCC TCC GTA GGC CTC GAA CGT CCT AGC GGC GCC GAG

CGG GCG TAT ATG CTC CGC ATT GGT CTT GAC CAA CTC TAT
 GCC CGC ATA TAC GAG GCG TAA CCA GAA CTG GTT GAG ATA

CAG AGC TTG GTT GAC GGC AAT TTC GAT GAT GCA GCT TGG
 GTC TCG AAC CAA CTG CCG TTA AAG CTA CTA CGT CGA ACC

GCG CAG GGT CGA TGC GAC GCA ATC GTC CGA TCC GGA GCC
 CGC GTC CCA GCT ACG CTG CGT TAG CAG GCT AGG CCT CGG

GGG ACT GTC GGG CGT ACA CAA ATC GCC CGC AGA AGC GCG
 CCC TGA CAG CCC GCA TGT GTT TAG CGG GCG TCT TCG CGC

GCC GTC TGG ACC GAT GGC TGT GTA GAA GTA CTC GCC GAT
 CGG CAG ACC TGG CTA CCG ACA CAT CTT CAT GAG CGG CTA

AGT GGA AAC CGA CGC CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG
 TCA CCT TTG GCT GCG GGG TCG TGA GCA GGC TCC CGT TTC

GAA R₄
 CTT R₅,

ahol

A jelentése dezoxiadenilcsoport,

G jelentése dezoxiguanilcsoport,

C jelentése dezoxicitidilcsoport,

T jelentése timidilcsoport,

R₁ és R₂ jelentése egymástól függetlenül lizint kódoló dezoxiribonukleotid-triplettek;

R₁ és R₃ olyan dezoxiribonukleotid-triplettek, melyekben a nitrogénbázisok komplementerei a megfelelő R és R₂ tripletek bázisainak

m és n=0 vagy 1, azzal a korlátozással, hogy ha n=0, akkor m=0, és ha m=1, akkor n=1,

R₄ transzlációs stopkodont kódoló dezoxiribonukleotid-triplett, R₅ pedig az R₄ megfelelő bázisaival komplementer bázisokat tartalmazó dezoxiribonukleotid-triplett.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Cephalosporium*ban működő, autonóm replikációt lehetővé tevő szakaszt tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a gazdagenommal homológ régiót tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *E.coli* replikációs origót és *E.coli*-ban szelektálható fenotípust kódoló szakaszt is tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Cephalosporium* riboszomális génszakaszt is tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Streptomyces* replikációs origót, és *Streptomyces*-ben szelektálható fenotípust kódoló szakaszt is tartalmazó vektort juttatunk a gazdasejtbe.

35 10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett gazdasejteket higromicin-B-antibiotikumot tartalmazó táptalajon növesztjük.

40 11. Az 5-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy vektorként a pIT221, pPS6, pETS702 vagy pPL221 plazmidot juttatjuk a gazdasejtbe.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Cephalosporium acremonium* törzset transzformálunk.

13. Eljárás a pIT221 plazmid előállítására, azzal jellemezve, hogy a pIT219 3,3 kb méretű Sall-XhoI restrikciós fragmentjét a Sall-gyel emésztett pIT220-szal ligáljuk.

50 14. Eljárás a pPS6 plazmid előállítására, azzal jellemezve, hogy az XmaI-gyel emésztett pIT221 plazmidot a *Cephalosporium acremonium* kromoszómájából származó, riboszomális gént tartalmazó 3,7 kb méretű XmaI fragmenttel ligáljuk.

55 15. Eljárás a pETS702 és pPLS221 plazmidok előállítására, azzal jellemezve, hogy a PstI-gyel emésztett pIJ702 plazmidot a PstI- gyel részlegesen emésztett pIT221 plazmid 8 kb méretű fragmensével ligáljuk.

60 16. Eljárás transzformált *Streptomyces* sejtek előállítására, azzal jellemezve, hogy a *Streptomyces* sejtet a

15. igénypont szerint előállított plazmiddal transzformáljuk.

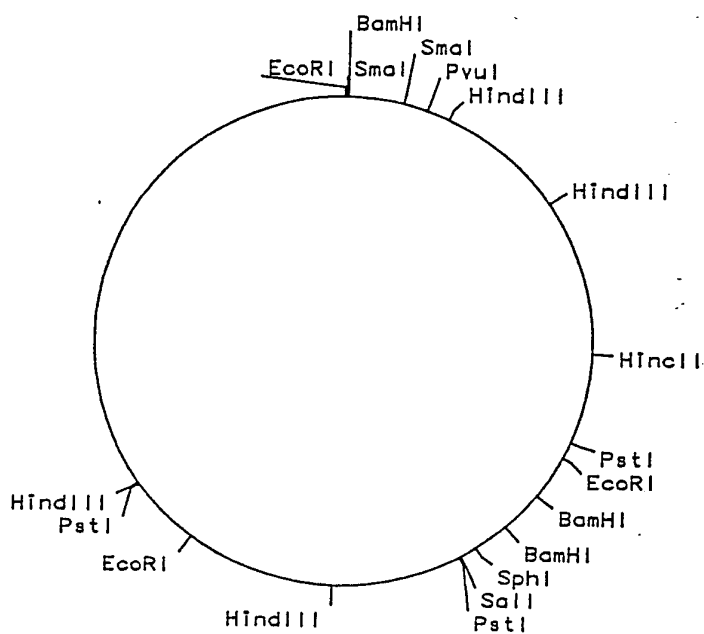
17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Streptomyces lividans*t transzformálunk.

18. Eljárás transzformált *E.coli* sejtek előállítására, 5

azzal jellemezve, hogy *E.coli* sejtet a 13–15. igénypont szerint előállított plazmiddal transzformálunk.

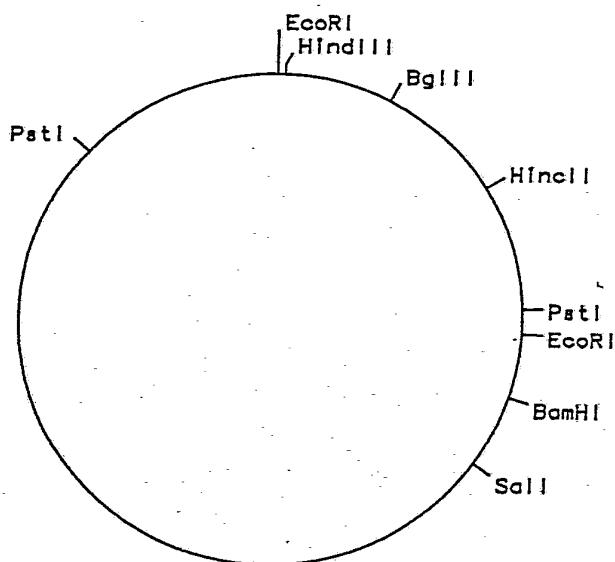
19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az *E.coli* K12 RR1 sejtet transzformáljuk.

1. ábra



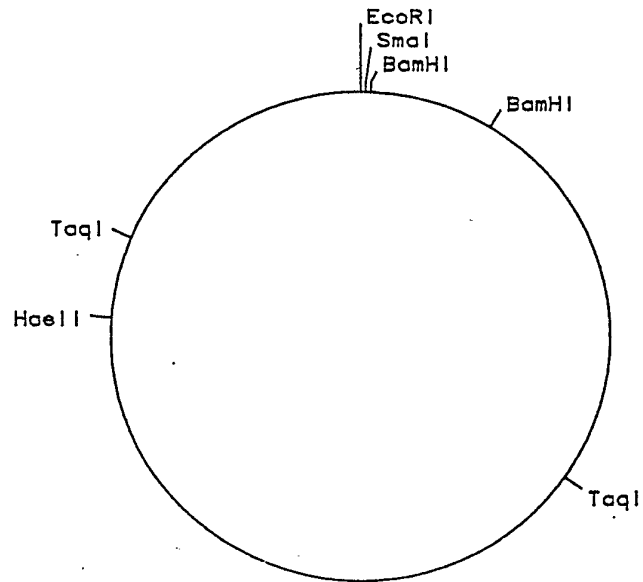
A pIT 221 plazmid (8 kb)
restriktációs térképe

2. ábra



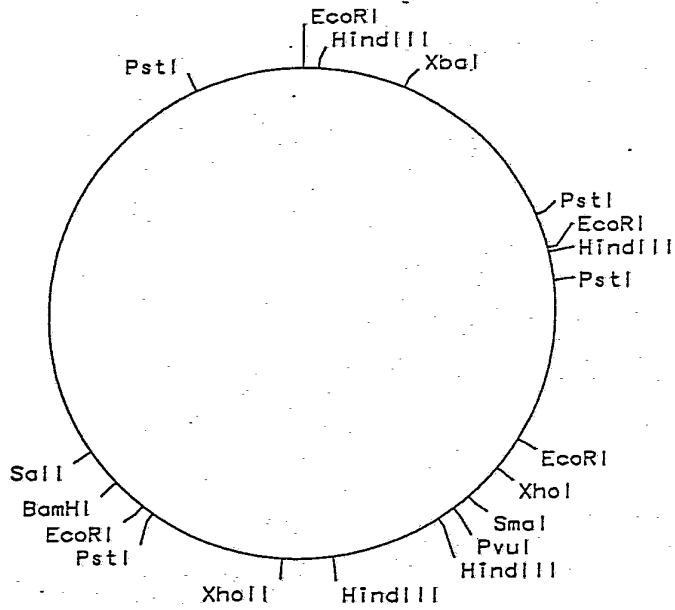
A pTT 123 plazmid (5,7 kb)
restrikciós térképe

3. ábra



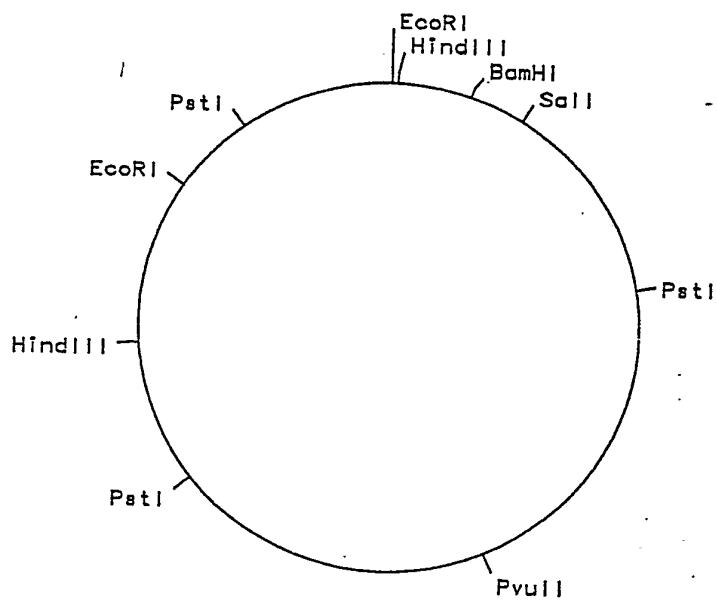
A pIT 145 plazmid (3 kb)
restriktívus térkép

4. ábra



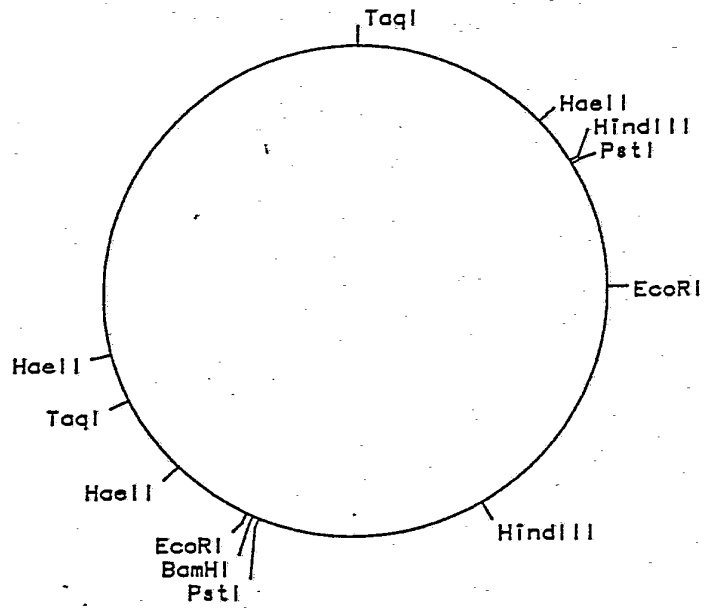
A PIT 213 plazmid (10,8 kb)
restriktív térkép

5. ábra



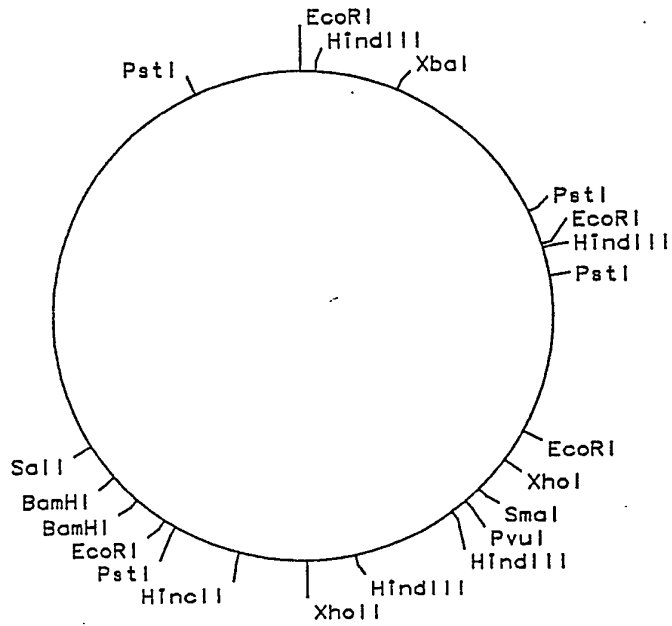
A pPS1 plazmid (7,5 kb)
restriktációs térképe

G. ábra



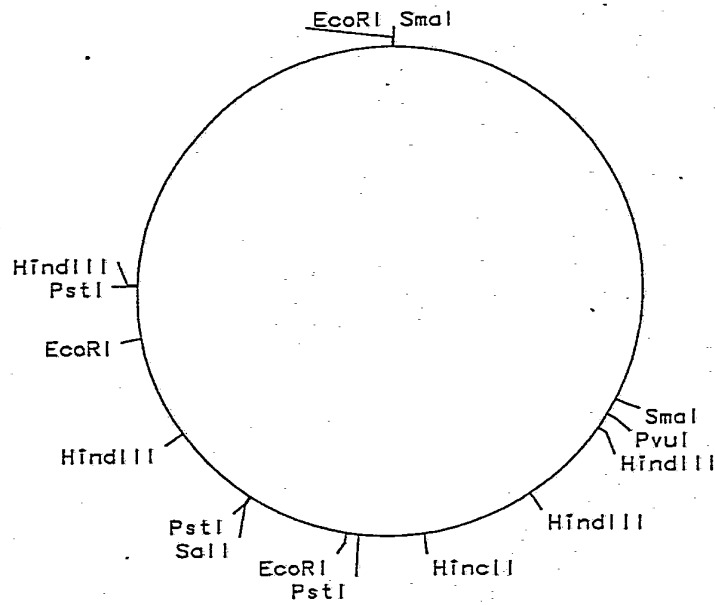
A pIT220 plazmid (4,7 KB)
restriktív térkép

Ábra



A pIT 249 plazmid (4,1 kb)
restriktions térkép

8. ábra



A pTSS plazmid (11,4 kb)
restriktációs térképe