



C (45) Patentti myönnetty
Patent beviljat 23.01.1993

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12Q 1/02, C 12N 15/69, C 12Q 1/66

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	891899
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	20.04.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	20.04.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	16.11.90
(44) Nähtävöksiänsä ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.01.93

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. Bio Orbit Oy, Tykistökatu 2-4, PL 36, 20521 Turku, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Karp, Matti, Tapulikatku 6 A 22, 20180 Turku, (FI)

2. Korpela, Matti, Itäinen rantakatu 48-50 F 154, 20810 Turku, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uusi biotesti
Ny biotest

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 5119 DSM
5120 DSM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Biotechnology Letters, vol. 10, 1988, p. 383-388,

Bioluminescence and Chemiluminescence, Proc. Int. Biolumin. Chemilumin. Symp. 4th 1986, p. 385-388

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää soluun vaikuttavan tekijän määrittämiseksi, joka tekijä vaikuttaa suoraan tai epäsuorasti solun DNA:han, RNA:han ja/tai proteiineihin tai näiden synteesikoneistoihin, jossa menetelmässä soluun siirretään yhdistelmä-DNA-plasmidi, jonka replikaatiosta vastaavan monistuskoneiston aloituskohta tai -kohdat on säädeltävissä olevan promootorin alaisuudessa, jota voidaan kontrolloida joko positiivisella tai negatiivisella palautteella; yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämä solu saatetaan kosketukseen vaikuttavan tekijän kanssa; vaikuttavan tekijän annetaan vaikuttaa yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämään soluun sopivan ajan, minkä jälkeen yhdistelmä-DNA-plasmidin replikaatiosta vastaavan monistuskoneiston aloituskohtaa säätelevä promootori aktivoidaan, jolloin plasmidin kopiolutku alkaa kasvaa solussa, mikäli vaikuttava tekijä ei ole vaikuttanut plasmidin replikoitumista estävästi; yhdistelmä-DNA-plasmidin kopiolutun muutos solussa määritetään suoraan tai epäsuorasti

biologis, immunologis, kemiallisin tai fysikaalisin keinoin; kopiolutku verrataan vertailukokeeseen, jossa vaikuttavaa tekijää ei ollut läsnä ja/tai sitä oli tunnettu määrä reaktiossa, jolloin vaikuttavan tekijän läsnäolo ja/tai määrä saadaan määritettyä.

Uppfinningen avser ett förfarande för bestämning av en till cellen inverkande faktor, vilken faktor inverkar direkt eller indirekt på cellens DNA, RNA och/eller proteiner eller deras syntesmekanismer, vid vilket förfarande intill cellen införs en rekombinant-DNA-plasmid, vars initiationsställe eller -ställen av dupliceringsmekanism ansvarig för replikationen är avhängiga av en reglerbar promotor, som kan kontrolleras antingen med en positiv eller en negativ feedback; cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden bringas i kontakt med en effektiv faktor; den effektiva faktorn får inverka på cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden för en lämplig tid, varefter promotorn som reglerar initiationsstället av dupliceringsmekanismen ansvarig för rekombinant-DNA-plasmidens replikation aktiveras, varvid plasmidens kopital börjar öka i cellen, om den effektiva faktorn inte har inverkat på ett hindrande sätt på plasmidens replikation; Ändring av rekombinant-DNA-plasmidens kopital i cellen bestäms direkt eller indirekt med biologiska, immunologiska, kemiska eller fysikaliska metoder; kopitalet jämförs med ett kontrollprov, vari ingen effektiv faktor var närvarande och/eller den fanns i en känd mängd i reaktionen, varvid närvaron och/eller mängden av den effektiva faktorn kan bestämmas.

Uusi biotesti

Biotesteiksi kutsutaan yleensä menetelmiä, joissa käytetään
5 apuna eläviä soluja tai organismeja. Useissa kehitetyissä
biotesteissä käytetään hyväksi bakteeri- tai hiivasoluja.
Bakteerit ja erityisesti Escherichia coli -bakteeri tun-
netaan hyvin tarkasti. Hiivasolut edustavat eukaryootti-
soluja, mutta ovat yksisoluisia. Hiivojen kanssa työskente-
10 ly on helpompaa kuin korkeampien eukaryoottisolujen kanssa,
sillä hiivat jakautuvat nopeasti yksinkertaisissa kasvatus-
liuoksissa eivätkä vaadi monimutkaisten kasvutekijöiden
läsnäoloa. Hiivojen tuntemus kasvaa nopeasti ja muutamista
kannoista tunnetaan jo kattavat geenikartat. Bakteereis-
15 ta ja hiiwoista tunnetaan satoja mutanttikantoja, joiden
avulla on mahdollista tutkia esimerkiksi spesifisten reak-
tioiden aktiivisuutta ja tapahtumia. Antibiooteille eri-
tyisen herkillä bakteerimutanteilla jo pienetkin antibi-
oottijäämät saavat aikaan käytettävän bakteerin metaboliassa
20 ja soluseinissä havaittavia muutoksia. Käyttämällä sopivia
bakteerimutantteja voidaan antibioottijäämätestit kehittää
erityisen herkiksi. Tällaiset bakteerikannat voivat olla
villikantojen mutantteja, joiden soluseinämät voivat olla
rakenteeltaan poikkeuksellisia niin, että antibiootit pää-
25 sevät villikantoihin verrattuna helpommin tunkeutumaan solu-
seinämän läpi. Samoin genotoksisille tekijöille herkillä
bakteerit ja hiivat ovat mutanttikantoja, joiden DNA:n
korjausmekanismit eivät toimi yhtä tehokkaasti kuin vil-
likantojen. Mutanttikantoja hyväksi käyttämällä voidaan
30 ja on voitu mitata antibiootteja, mutageenisia ja toksisia
tekijöitä. Bakteeri- ja hiivakantoihin on suhteellisen
yksinkertaista siirtää uusia ominaisuuksia geeninsiirto-
tekniikoiden avulla, mikä seikka laajentaa ko. organismien
hyväksikäyttömahdollisuuksia biotesteissä. Uusilla ominai-
35 suuksilla tarkoitetaan tässä yhteydessä viruksen, eukaryoot-
ti- tai prokaryoottisten solujen geenien koodittamia prote-
iineja, joita ei luonnostaan esiinny geeninsiirtotekniikkaa
hyväksi käyttävissä kohdeorganismeissa.

Karsinogeenisuuden ja mutageenisuuden välinen yhteys on lähtökohtana mutageenisuustestien käyttämiselle karsinogeenisten yhdisteiden esitestauksessa. Karsinogeenisuuden testaus koe-eläimillä on erittäin kallista ja hidasta. Mutageenisuustestien käyttöön karsinogeenisuuden pikateinä onkin kiinnitetty paljon toiveita ja huomiota. Mikrobian käyttöön perustuvia mutageenisuustestejä kehittämällä eläinkokeita on myös mahdollista vähentää. Kokeellisten testien käytön perustana on deoksiribonukleiinihapon, DNA:n, universaalisuus, jonka mukaan DNA:n rakenne ja toimintaperiaatteet ovat eri organismeissa samanlaiset.

Yleisimmin käytetty mutageenisuustesti on Salmonella typhimurium -bakteereja kohdeorganismina käyttävä Ames-testi (Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975) Mutat. Res. 31-347). Tällä testillä kyetään havaitsemaan muun muassa useimpien mykotoksiinien, aromaattisten amiinien ja polysyklisen hiilivetyjen genotoksisuus. Ames-testi ei kuitenkaan kykene tunnistamaan karsinogeenisten metallisuolojen tai kloorattujen hiilivetyjen genotoksisuutta. Tässä testissä käytettävissä Salmonella typhimurium -bakteerikannoissa on pistemutaatioita histidiinin biosynteesiin tarvittavassa geenissä. Kun bakteerit altistetaan mutageenisten yhdisteiden vaikutukselle, tapahtuu revertoituminen l. takaisin-mutaatio kyseisessä geenissä ja bakteeri alkaa tuottaa histidiiniä itsenäisesti eikä tarvitse enää ulkopuolista histidiinilähdettä. Haittapuolena Ames-testissä on sen hitaus ja huono herkkyys. Tässä testissä kaikki muut genotoksiset muutokset kuin ko. entsyymiin kohdistuvat jäävät toteamatta. Testi on myös suhteellisen kallis testattavaa yhdistettä kohden.

Bioluminesenssiin eli valonmuodostumisen mittaukseen perustuva genotoksisten tekijöiden määrittäminen on myös kehitetty (Ulitzur S., Weiser, I. and Yannai, S., 1980, Mut. Res., 74, 113-121). Tässä menetelmässä käytetään hyväksi valaisemattomia Photobacterium leiognathi -kantoja

ja Photobacterium fischeri mutanttikantoja. Genotoksisten tekijöiden vaikutuksesta edellä mainitut bakteerit alkavat tuottaa valoa. Tämän menetelmän teoreettinen perusta on vielä arvailujen varassa. Muun muassa jonkin tuntemattoman repressorin l. estäjän vaikutuksen poistuminen tai sen muodostumisen estymisen sekä bakteerien kromosomaalisen DNA:n fysikaalisessa rakenteessa tapahtuvan muutoksen arvelaan edistävän lusiferaasin tuotannon alkamista bakteerisoluisissa. Eri genotoksiset yhdisteet vaikuttavat tässä testissä eri nopeuksilla johtuen tekijöiden vaikutusmekanismien vaihtelevuudesta. Tämä testi on Ames-testiä nopeampi, mutta ei läheskään yhtä helppokäyttöinen. Testissä käytettyjen bakteerien tuottamaa valoa täytyy pystyä mittaamaan kineettisesti hyvin pitkiä ja vaihtelevia aikoja (30 min - 10 h) tutkittavasta yhdisteestä riippuen. Käytettävät bakteerit eivät myöskään kykene tuottamaan stabiilia valoa, mikä tekee määrityksestä ongelmallisen. Edellä mainituista syistä johtuen kuvattua bioluminesenssiin perustuvaa Photobacterium-kantoja hyväksi käyttävää genotoksisten tekijöiden määritysmenetelmää ei voida helposti automatisoida ja ottaa rutiinikäyttöön, kun määritettäviä näytteitä on paljon.

Mikrobilääkkeinä käytettyjä antibiootteja määritetään muun muassa potilaiden seerumista selvitetessä hoidossa käytettävän lääkkeen annostusta ja imeytymistehokkuutta. Useiden käytettyjen antibioottien terapeuttinen pitoisuusalue on suhteellisen kapea ja yliannostuksesta potilaalle aiheutuvat riskit voivat olla suuria. Lihasta ja lehmän maidosta on tärkeää määrittää mikrobilääkejäämät niiden allergikoille aiheuttamien oireiden takia. Juuston valmistuksessa käytettävä maito ei saa sisältää antibiootteja sillä ne estävät juustobakteerien toiminnan. Yleisimmät tämänhetkiset mikrobilääkkeiden tunnistamiseen käytetyt menetelmät ovat mikrobiologisia. Näissä testeissä mitataan joko antibiootteille herkkien mikrobien suoranaista kasvua tai kasvun yhteydessä tapahtuvien aineenvaihduntatuotteiden tuoton estymistä esimerkiksi bakteerien hapontuotantoa erilaisten väri-indikaattorien avulla. Yleisesti käytössä ovat aga-

reilla tehtävät mikrobiologiset testit. Agardiffuusiotestin sylinteri-, kuoppa- ja kiekkomenetelmä ovat esimerkkisovel-
lutuksia. Näiden menetelmien välillä olevat erot rajoit-
tuvat ainoastaan näytteen applikaatioon agarille ja bak-
teerikannan käyttötapaan testeissä.

Koska mikrobiologiset menetelmät käyttävät hyväkseen bak-
teereja tai bakteerien itiöitä, on testibakteerin herkkyys
antibiooteille ratkaisevan tärkeä näissä menetelmissä.

10 Tähän asti on ollut tarpeen tehdä kompromisseja sopivien
testimikrobien valinnoissa, koska suuri antibioottiherkkyys
ja muut testimikrobilta vaadittavat ominaisuudet eivät
välttämättä ole olleet saman bakteerikannan ominaisuuksia.

15 Mikrobien käyttöä antibioottijäämien testauksessa rajoittaa
ennen kaikkea menetelmien hitaus ja epäherkkyys. Koska
menetelmissä tavalla tai toisella aina kontrolloidaan tes-
timikrobien kasvua, ei testiä voida kuvitellakaan saatavan
suoritetuksi alle tunnin. Tämä johtuu siitä, että mikrobien
20 kasvu nopeimmillaankin on hidas tapahtuma. Lisäksi useissa
testeissä mikrobit ovat kylmäkuivattuina tai itiöinä, mikä
entisestäänkin hidastaa testien suoritusta.

Myös bioluminesenssiin perustuvia antibioottien määritys-
25 menetelmiä on kehitetty. Ulitzur (1986, Methods in En-
zymology, vol. 133, s. 275-284) on esittänyt kolme erilaista
tapaa käyttää bioluminesenssiin perustuvaa menetelmää anti-
bioottien määrittämisessä ja ne ovat a) lysis-testi, b) induk-
tiotesti ja c) bakteriofagitesti.

30

Ensimmäisessä eli nk. lysis-testissä käytetään hyväksi
Vibrio fischeristä eristettyjä lux-geenejä, jotka tuottavat
lusiferaasia ja substraatin läsnäollessa muodostuu valoa.
Nämä geenit on asetettu plasmidiin, joka on siirretty Bacil-
35 lus subtilikseen, joka on erittäin herkkä bakteerien solu-
kalvoihin vaikuttaville antibiooteille kuten esimerkiksi
penisilliineille ja kefalosporiineille. Testissä tällaista
plasmidin sisältävää B. subtilista kasvatetaan antibioottia

sisältävän näytteen kanssa ja bakteerisolukalvojen synteessin inhiboituessa bakteerit hajoavat. Antibioottien vaikutus todetaan kohdebakteerin alentuneessa valontuottotasossa.

- 5 Induktiotestissä käytetään hyväksi nk. dim-mutantteja Photobacterium phosphoreum -bakteereja, jotka nimensä mukaisesti eivät tuota valoa villikantoihin verrattuna. Tämä kuten muutkin Ulitzurin ryhmän kehittämät bioluminesenssiin perustuvat testit ovat kohdebakteerin kromosomaalisen DNA:n
- 10 hyväksikäyttöön perustuvia testejä. Induktiotestillä voidaan määrittää proteiinisynteesiin vaikuttavia antibiootteja. Inkuboitaessa bakteereja DNA:han sitoutuvien yhdisteiden läsnäollessa alkavat nämä alunperin valoa tuottamattomat bakteerit valaista 1. bakteeri alkaa tuottaa lusiferaasi-
- 15 proteiinia. Kun proteiinisynteesiä inhiboivaa antibioottia on mukana reaktiossa, jossa lusiferaasia tuotetaan induoituneesti Photobacterium phosphoreumin kromosomaalisesta DNA:sta, estävät antibiootit lusiferaasin synteesiä. Antibiootin vaikutus todetaan bakteerien tuottaman valontason
- 20 laskuna verrattuna bakteereihin, joita ei ollut inkuboitu proteiinisynteesiä estävien antibioottien kanssa. Tällä induktiotestillä ei voida kuitenkaan määrittää DNA:n synteesiä estäviä antibiootteja. Myöskin käytettävän induktion tapahtumat ja selitys ovat arvailujen varassa. Testin
- 25 suorittamiseen tarvittavat olosuhteet ovat ongelmalliset, koska em. bakteerit tarvitsevat määritysliuoksessa minimisuolat (muun muassa Ca^{2+} - ja Mg^{2+} -ionit), joiden tiedetään vähentävän tai täysin estävän aminoglykosidien (streptomysiini, kanamysiini, neomysiini, erytromysiini) toiminnan.
- 30 Myös bakteerin induktio-olosuhteet ovat erittäin tarkat ja lisäksi näytteissä saattaa olla antibiootteja (esim. nalidiksiinihappo) tai muita yhdisteitä, jotka indusoivat bakteerin valontuotannon satunnaisesti. Tässä testissä olemassa olevien indusorien suuri lukumäärä onkin vaikea ongelma.
- 35 Testeissä käytettävällä bakteerimäärällä on myös mainittu olevan vaikutusta määritykseen. Testissä voidaan käyttää suhteellisen pientä määrää bakteereja, sillä suuremman bakteerimäärän käyttäminen vaatii reaktioseoksen erityistä

hapetusta näissä bakteereissa olevan bioluminesenssi-systeemin happiherkkyyden takia. Tämä aiheuttaa ongelmia silloin, kun käytetään mittalaitteita (luminometrit, valodiodit, valokuvauslevy), jotka eivät ole niin herkkiä kuin nestetuikelaskimet. Myös testin toistettavuus kärsii näiden tekijöiden vuoksi.

DNA-synteesiä, transkriptiota ja translaatiota estävät antibiootit kuuluvat bakteriofagitestin piiriin. Tässä testissä normaalit, valaisevat Photobacterium phosphoreum -bakteerit infektoidaan lyyttisillä bakteriofageilla. Antibiootin läsnäollessa uusia bakteerisolua hajottavia viruksia ei pääse syntetisoitumaan DNA-, RNA- tai proteiinisynteesiin vaadittavien synteesikoneistojen toiminnan estyttyä. Antibiootin läsnäollessa bakteerien tuottaman valon määrässä ei todeta muutosta verrattuna antibiooteilla käsittelemättömiin kontrollisoluihin, joiden valotasot laskevat nopeasti bakteriofagien kyetessä lisääntymään ja hajottamaan bakteerisolun. Bakteriofagitesti on ongelmallinen suorittaa, koska siinä vaaditaan erityinen bakteriofagien lisäys bakteerisuspensioon ja antibioottinäytteen lisäämisen ajoitus on tarkka. Tässä testissä on myös samoja ongelmia kuin induktiotestissä määritysliuoksen ja testissä käytettävien bakteerimäärien suhteen.

Tämän hetkisillä mikrobiologisilla antibioottitesteillä ei voida määrittää yksittäisiä antibiootteja tai antibioottiryhmiä vaan kaikki antibiootit, joille testissä käytettävä mikrobi on herkkä. Mittausolosuhteita muuttamalla ja lisäämällä tiettyjä antibiootteja hajottavia entsyymejä voidaan eräiden antibioottien vaikutus poistaa.

Tarve raskasmetallien, toksiinien ja elintarvikkeiden lisäaineiden määrittämiseksi nopeasti ja yksinkertaisesti on suuri. Tällä hetkellä määritykset täytyy tehdä useimmiten keskitetysti suurissa laboratorioissa, koska tarvittavat mittalaitteistot ovat erittäin kalliita ja vaativat käyttäjiltään erityiskoulutusta. Nopeat, kvalitatiiviset testit

voisivat olla paikan päällä tehtyinä myös merkittävä seula jatkotutkimuksia vaativille näytteille. Tällöin laboratorioden kuormitus vähentyisi ja ongelmanäytteiden määrittäminen nopeutuisi.

5

Toksisten yhdisteiden määrittämiseksi ympäristönäytteistä on kehitetty nk. Microtox-testi, jossa käytetään hyväksi valoa tuottavia Photobacterium phosphoreum -bakteereja. Tutkittavaa näytettä ja bakteereja inkuboidaan yhdessä ja toksisten aineiden mukanaolo todetaan bakteerien alentuneesta valontuottotasosta verrattuna kontrollinäytteeseen. Myös useita eläinsolustestejä on kehitetty mittaamaan toksisia tekijöitä, mutta näiden laajamittaiselle käytölle on useita esteitä, kuten esimerkiksi niiden hitaus ja monimutkainen käyttö sekä valmistus.

15

Toksisia ja mutageenisia aineita on tarpeellista pystyä määrittämään erilaisista vesistä, tällaisia ovat esimerkiksi jätevesi, talousvesi, raakavesi, pohjavesi, virkistyskäyttöön tarkoitettuihin vedet, teollisuuden prosessivesi, elintarvikkeiden valmistusprosesseissa käytetty vesi ja lääketeollisuudessa käytettävä raakavesi. Myös maanäytteistä ja ilmanäytteistä on yhä lisääntyvä tarve saada määritetyksi toksisia ja mutageenisia tekijöitä. Elintarviketeollisuudessa käytettävien raaka-aineiden, ravintoaineiden ja nautintoaineiden laadun kontrollointiin kiinnitetään suurta huomiota.

25

Keksintö perustuu aiemmin tunnettuihin ja hyväksyttyihin periaatteisiin geenien ilmentymiseen eli ekspressioon vaikuttavista säätelytekijöistä ja niiden käyttöön yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuissa eliöissä kuten esimerkiksi bakteereissa ja hiivoissa.

30

Keksinnön oleelliset tunnuspiirteet on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

35

Geeniteknologia on tehnyt mahdolliseksi bakteerien ja hiivojen käytön tuotto-organismeina sellaisillekin valkuaisaineille, joita nämä mikrobit eivät normaalisti tuota. Näihin tarkoituksiin on valmistettu erilaisia yhdistelmä-

DNA-plasmideja, jotka ovat kromosomin ulkopuolisia ja tätä paljon lyhyempiä rengasmaisia DNA-molekyylejä. Yhdistelmä-DNA-plasmidit voivat sisältää useita eri geenejä ja ne pystyvät lisääntymään itsenäisesti. Yhdistelmä-DNA-plasmiditekniikka on yleisimmin käytetty tapa siirrettäessä 5 vieraita geenejä bakteerisoluihin. Haluttu geeni voidaan liittää erityisillä restriktioentsyymeillä plasmidiin. Plasmidin siirtäminen bakteerisoluun suoritetaan yleensä transformaatiolla, jossa bakteerisolun seinämä on tehty 10 plasmidia läpäiseväksi. Eukaryoottisoluissa käytetään yhdistelmä-DNA-vektoreita, jotka sisältävät prokaryoottista, virusperäistä ja eukaryoottisolun DNA:ta sopivasti yhdistetynä samassa vektorissa. Eukaryoottisoluihin saadaan yhdistelmä-DNA-vektoreja siirrettyä esimerkiksi elektroporaatiolla 15 ja Ca-saostustekniikalla.

Yhdistelmä-DNA-plasmideja, joissa vieraan, rekombinantti-proteiinin tuotto on asetettu voimakkaan promoottorin kontrollin alaiseksi, on viime vuosina kehitetty erittäin paljon. 20 Kaikissa tapauksissa pyrkimyksenä on ollut saada aikaan mahdollisimman suuri vieraan proteiinin tuotto uusissa tuottajaorganismeissa kuten E. colissa. Näissä tapauksissa haluttua proteiinia voidaan tuottaa jopa 25 % bakteerin koko proteiinimäärästä (Caulcott & Rhodes, 1986, 25 Trends in Biotech., June, 142-146). Tuotettaessa näin suuria määriä vierasta proteiinia on hyvinkin todennäköistä, että tämä tuotto on haitallista bakteerille ja sen aineenvaihdunnalle. Haitallisuuden kannalta onkin kehitetty plasmideja, joissa vieraan proteiinin tuotto on asetettu 30 säädeltävissä olevan promoottorin kontrollin alaiseksi. Tällöin proteiinin tuotto voidaan kytkeä päälle halutussa mikrobin kasvuvaiheessa. Näissä tapauksissa kasvatus suoritetaan mikrobia stressaamattomissa olosuhteissa riittävän kauan, jolloin mikrobikasvusto ehtii saavuttaa sopivan 35 solutiheyden. Tämän jälkeen kytketään päälle halutun proteiinin tuotto esimerkiksi lisäämällä kasvuliemeen kemiallinen kytkentämolekyyli tai suoritetaan kytkentä fysikaalisin keinoin, kuten lämpötilan kohottamisella. Kuvassa 6

on esitetty plasmidi pCSS108 (Korpela & Karp, Biotechnol. Lett., 10(6), 1988, 383-388), jota käyttäen bakteerilüsiferaasin tuotto saadaan aikaan lisäämällä IPTG-niminen kemikaali, joka kytkee ko. proteiinin tuoton päälle kloonatussa E. colissa.

Käytetyissä plasmideissa kussakin on tietty resistenssitekijä, jonka avulla voidaan valita vain plasmidin sisältämä solukanta hyvinkin suuresta solupopulaatiosta. Resistenssitekijä auttaa solua selviytymään olosuhteissa, jotka ovat muille soluille myrkylliset. Myrkyllinen tekijä lisätään kasvuympäristöön muiden kuin halutun solun kasvun ehkäisemiseksi. Resistenssitekijä voi olla tietty geeni, jonka koodaama proteiini hajottaa tai inaktivoi muuten kasvuympäristössä olevan myrkyllisen tekijän, kuten esimerkiksi antibiootin. Eri antibiooteille tuovan resistenssin geenejä tunnetaan useita, yleisimmin on käytetty β -laktamaasia koodittavaa geeniä. Tämän geenin toiminnan tuloksena solu hajottaa kasvuympäristössään olevan penisilliinin, tai sen johdannaisen, β -laktamirenkaan, jolloin ko. antibiootti menettää toimintakykynsä. Muita yleisesti käytettyjä geenejä ovat kloramfenikoliasetyylitransфераasia, kanamysiiniasetyyylitransфераasia ja tetrahydrofolaattireduktaasia koodittavat geenit. Riippuen solutyypistä voidaan käyttää myös geenejä, jotka tuovat solulle kyvyn kasvaa esimerkiksi tetrasykliinin, erytromysiinin, spektinomysiinin, streptomysiinin, sulfonamidien, neomysiinin, tiostreptonin, viomysiinin ja kolisiinien läsnäollessa. Tunnetaan myös resistenssitekijöitä, jotka muuttavat tai poistavat kasvuympäristössä olevan raskasmetallin. Valintapaine plasmidillisten solujen eduksi voidaan myös luoda siirtämällä plasmidiin geeni, jonka tuote korvaa solun kromosomista puuttuvan ominaisuuden. Tällaisia geenejä ovat esimerkiksi aminohappojen biosynteesiteihin osallistuvat tekijät. Näissä tapauksissa solun kasvuympäristöstä puuttuu tietty elintärkeä aminohappo ja solu ei muutoin pysty toimimaan ellei plasmidissa sijaitsevan geenin tuote syntetisoi ko. aminohappoa tai sen biosynteesin välivaihetta. Myös muut solulle elin-

tärkeät toiminnot aiheuttavat plasmidilliselle solulle edun verrattaessa plasmidittomiin soluihin. Plasmidissa voi olla esimerkiksi tietty geeni, jonka tuote osallistuu solukalvon tai solun perimän rakennusaineiden tuottoon.

5

Eri plasmidien kopioluku solussa on useinkin hyvin erilainen vaihdellen yhdestä useaan sataan, jopa tuhanteen. Yleisimmin käytetyn plasmidin pBR322 kopioluku on noin 60, kun taas sen johdannaisen pUC8:n kopioluku on noin 500. Näin suuren kopioluvun muutoksen kahden sukulaisplasmidin välillä on osoitettu johtuvan yhden emäksen muutoksesta plasmidin ns. ori-alueella (Chambers et al., 1988, GENE, 68, 139-149). Vaikuttamalla plasmidin replikaation aloitukseen asettamalla tämä ori-alue voimakkaan ja säädeltävissä olevan promootorin kontrollin alaiseksi, voidaan keinotekoisesti kasvat-
15 taa plasmidin kopiolukua halutulla tavalla sopivasti valittuna ajankohtana. Tällä hetkellä tunnetaan useita plasmideja, joiden kopiolukua voidaan muuttaa mikrobien kasvun kuluessa. Näitä plasmideja käytetään lähinnä teollisissa
20 prosesseissa tuottamaan vieraita rekombinanttiproteiineja huomattavia määriä. Näin ollen tähänastinen käyttö ei sulje pois tässä keksinnössä kuvattuja menetelmiä käyttää kopio-
luvun muutosta erilaisten soluun vaikuttavien tekijöiden mittaamiseksi. Tässä keksinnössä käytetään esimerkkeinä
25 kolmea ns. runaway-plasmidia, joissa kopioluvun muutos on mahdollinen. Eniten tutkittuja ja käytettyjä plasmideja vieraiden proteiinien tuottamiseksi ovat ns. pOU-sarjan plasmidit, joissa plasmidin replikaation aloituskohtaa säätelevät tekijät on asetettu voimakkaan ja säädeltävän
30 lambda-faagin p_R -promootorin kontrollin alaiseksi (Larsen et al., 1984, GENE, 28, 45-54). Lambda- p_R -promootoria säätelee repressoriproteiini cI857, joka on tuhottavissa +42°C:n lämpökäsittelyllä. Repressoriproteiinin tuotto voi tapahtua lysogeenisestä faagista, faagista, joka on kon-
35 jugoitu isäntäorganismien kromosomiin, plasmidista, johon ko. proteiinia koodittava sekvenssi on siirretty tai eri inkombatibiliteettiluokkaan kuuluvasta toisesta plasmidista. Eri inkombatibiliteettiluokkien plasmideilla tarkoitetaan

tässä tapauksessa plasmideja, jotka kykenevät monistumaan ja jakautumaan itsenäisesti toisen plasmidin läsnäolosta huolimatta samassa solussa. Kun repressoriproteiini on tuhottu, p_R -promoottori kytkeytyy päälle ja alkaa tuottaa
5 kontrolloimattomasti matalan kopioluvun R_1 -plasmidista peräisin olevia $copB$ - ja $repA$ -proteiineja sekä näiden ja $copA$ -geenejä vastaavia transkriptiotuotteita. Nämä tekijät ja erityisesti voimakas $repA$ -proteiinin ylituottaminen aikaansaavat lisääntyneen ja jopa kontrolloimattoman pOU -
10 pohjaisen plasmidin tuoton E. coli -bakteereissa.

Hiivat kuten bakteeritkin ovat yksisoluisia, mutta hiivat eroavat bakteereista siinä, että ne ovat eukaryoottisoluja. Verrattuna korkeampiin eukaryoottisoluihin hiivat ovat
15 geneettisiltä ominaisuuksiltaan paljon paremmin tunnettuja. Saccharomyces cerevisiae ja Schizosaccharomyces pombe geneettinen kartta tunnetaan jo yksityiskohdittain (Petes, 1980, Molecular Genetics of Yeast, Ann. Rev. Biochem., 49, 845-876). Myös hiivojen kloonausmenetelmät tunnetaan hyvin
20 ja ne ovat erittäin tehokkaita. Hiivasolut ovatkin erittäin yleisesti käytettyjä kloonausisäntiä.

Hiivoilla on erotettu neljä erilaista yhdistelmä-DNA-vektortyyppiä: integroituvat plasmidit (YI_p), episomaaliset
25 plasmidit (YE_p), replikoituvat plasmidit (YR_p) ja keinotekoiset kromosomit. Hiivan integroituvat plasmidit voivat sisältää bakteeriperäistä DNA:ta ja hiivan geeni(e)n osan/osia. Tämä plasmidityyppi sitoutuu tarkasti tiettyyn kohtaan hiivasolun kromosomaalisessa DNA:ssa. Replikoituvat
30 hiivan plasmidit sisältävät DNA:ta bakteereista, hiivan geenin osan ja erityisen alueen hiivan kromosomaalisesta DNA:sta, joka sisältää ko. plasmidin replikoitumisen aloituskohdan. Tämä replikoitumista ohjaava alue sallii plasmidin jakautumisen kromosomin ulkopuolisena DNA-molekyylinä
35 hiivasolussa. Hiivan episomaaliset plasmidit sisältävät bakteeriperäisen DNA-jakson, hiivasolun geenin ja kokonaisen tai osan hiivan nk. 2 mikronin plasmidia (Hollenberg, 1982, Current Topics in Microbiology and Immunology, 96, 119-144).

Keinotekoiset kromosomit ovat lineaarisia DNA-vektoreita. Nämä vektorit eivät sovellu hyvin proteiinien ekspressiovektoreiksi.

- 5 Hiivalle on kuvailtu plasmidirakennelma, jonka kopiolukua voidaan säädellä. Hiivan sentromeerit ovat alueita, jotka vaaditaan hiivan kromosomin jakautumisessa mitoosin ja meioosin aikana. Sentromeeri-DNA (CEN3) on eristetty ja se on siirretty glukosilla repressoituvan alkoholidehydro-
- 10 genaasipromoottorin (ADH2) säätelyn alaiseksi. Näin saadun plasmidin CEN3 toimintaa voidaan säädellä käytetyn hiililähteen avulla hiivassa. Käytettäessä glukosia hiililähteenä ADH2-promoottori on repressoitunut ja tällöin CEN3 toimii normaalisti tasapainottaen mitoosissa käytetyn plas-
- 15 midirakenteen (YR_P). Jos hiililähde vaihdetaan kasvulie-
messä YR_P -plasmidia alkaa kerääntyä soluun, jolloin kopio-
luku saattaa nousta jopa sataan (Chlebowicz-Slediewska, E.
& Sledziewska, A., 1985, GENE, 39, 25-31).
- 20 Hiivoissa käytettävänä ekspressiovektoreina ovat seuraavat
säädeltävät promoottorit osoittautuneet erittäin käyttökeli-
poisiksi: alkoholi-isoentsyymi I:n (ADHI) geenin promoot-
tori, fosfoglyserolikinaasin (PGK) promoottori, repressoit-
uvan happaman fosfataasin (PHO5) promoottori ja alfa-fak-
torin promoottori. ADHI on hiivan sytoplasminen entsyymi,
25 joka tuottaa etanolia asetaldehydistä ja tarvitsee tähän
synteesiin myös NADH:ta. Kun hiivasoluja kasvatetaan glu-
koosin läsnäollessa niin ADHI:tä on vähintään 1 % hiivasolun
kokonaisproteiinimäärästä. PGK:n promoottorin toimintaa
30 taas voidaan säädellä hiivan hiililähteen (esim. glukosin)
avulla, joka aktivoi promoottorin alaisen entsyymin ekspres-
siota. PHO5:n ekspressio voidaan estää epäorgaanisen fos-
faatin avulla; tämän promoottorin toiminta aktivoidaan
poistamalla epäorgaaninen fosfaatti hiivasolujen kasvatus-
35 liuoksesta. PHO5:n säätely tapahtuu erityisen säätelykom-
pleksin avulla, joka muodostuu PHO2, PHO4, PHO80 ja PHO85
geenituotteista (Bosfiana, K.A., 1980, Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 77, 6541-6545). Myös eräitä mutantteja (PHO4:ssä

ja PH080:ssä) tunnetaan, jotka ovat aktivoitavissa yksinkertaisella lämpötilan muutoksella. Nämä mutanttihiivasolut kasvavat +35°C:ssa, mutta eivät tuota hapan fosfataasi - entsyymiä edes fosfaatin puuttuessa kasvatusliuoksesta.

- 5 Kun lämpötilaa lasketaan +23°C:een, hapan fosfataasia tuotetaan hiivasoluissa runsaasti kasvatusliuokseen fosfataasin läsnäollessa tai ilman sitä. Tällaisella lämpötilan muutoksella säädeltäviä mutanttikantoja on käytetty tuottamaan esim. interferonia, kun interferonia koodaava DNA-jakso on
- 10 hiivan replikoituvassa plasmidissa säädeltävän repressoituvan hapan fosfataasi PH05:n alaisuudessa (Kramer, R.A., DeChiara, T.M., Schaber, M.D. ja Hilliker, S., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 367-370). Lämpötilan muutoksella saatiin tarkasti säädeltäviä interferonin ekspressiota hiivasolussa.
- 15

- Korkeampien eukaryoottisolujen käyttäminen yhdistelmä-DNA-vektorien isäntäsoluina haluttaessa tuottaa proteiineja on nopeasti kehittyvä alue. Yleinen periaate kehitettäessä
- 20 ekspressiosysteemejä on se, että niillä voitaisiin tuottaa haluttuja eukaryoottiproteiineja suuressa mittakaavassa. Optimaalisella ekspressiosysteemillä olisi mahdollista tuottaa proteiineja useissa eri solutyypeissä. Täysin säädeltävissä oleva proteiinien ekspressiosysteemi olisi
- 25 ihanteellinen ratkaisu. Yleisimpien säädeltävien promoottorien käyttö on rajoittunut suhteellisen harvoihin isäntäsoluihin. Usein myös promoottorien säädeltävyys on puutteellista tai ekspressiovektorit on rakennettu tuumoreita aiheuttavien virusten DNA:sta, jolloin niiden käytöllä on
- 30 olemassa riskitekijänsä.

- Eukaryoottisoluissa geenien ekspressiota on mahdollista säädellä muun muassa seuraavilla tavoilla: Simian virus 40 (SV40) T-antigeenin, metallotioneiini-geenien, heat-shock -
- 35 geenien, glukokortikoidisten hormonien, DNA:n metylaation ja anti-sense RNA:n avulla. SV40:n tuottama antigeeni säätelee omaa transkriptiotaan. T-antigeenia tuotetaan runsaasti välittömästi viruksen infektoitua kohdesolunsa ja

myöhemmin T-antigeeni sitoutuu omaan promoottorialueeseen-
sa ja estää transkription. Käytettäessä SV40-vektoreita
kloonauksiin tämä T-antigeenin välittämä säätelyfunktio
voidaan estää käyttämällä sopivaa lämpöherkkää T-antigeeni
5 -mutanttia. Tällaiset lämpöherkät T-antigeeni -mutantit
tuottavat normaalisti T-antigeenia korkeissa inkubointi-
lämpötiloissa, kun taas huoneenlämpötilassa T-antigeenin
tuotto on estynyt (Rio, D.C., Clark, S.G. & Tjian, R.,
1985, Science, 227, 23-28).

10 Metallotioneiinit ovat proteiineja, jotka sitovat itseensä
raskasmetalleja. Monet eukaryoottisolut alkavat tuottaa
näitä proteiineja raskasmetallien läsnäollessa. Metallo-
tioneiinien tuotannossa on todettu 50-kertainen kasvu, kun
15 kadmiumia lisättiin solujen kasvatusliuokseen 4×10^{-6} -mo-
laariseksi pitoisuudeksi (Hamer, D.H. & Walling, M.J.,
1982, J. Mol. Appl. Genet., 1, 273-288). Edellä mainittua
kadmiumin indusoimaa proteiinien tuotantoa on mahdollista
vielä nostaa käyttämällä kasvuliukuksia, jotka sisältävät
20 mahdollisimman vähän raskasmetalleja.

Useat niin kutsuttujen heat-shock -geenien promoottorit ovat
osoittautuneet olevan toimivia ja tarkasti säädeltävissä
useissa eri solutyypeissä. Näiden geenien promoottorien
25 säätteleminen tapahtuu yksinkertaisesti lämpötilaa muuttamal-
la. Heat-shock -geenit esiintyvät erittäin yleisesti euka-
ryoottisoluissa. Nämä geenit aktivoituvat tuottamaan prote-
iineja korkeassa lämpötilassa kun taas normaalissa kasvatus-
lämpötilassa proteiinien tuotto on vähäistä tai sitä ei ta-
30 pah-du lainkaan. Parhaiten tutkittu heat-shock -systeemi on
banaanikärpäsen eli *Drosophila melanogasterin*, jossa lämpö-
tilan kohottaminen $+25^{\circ}\text{C}$:sta $+37^{\circ}\text{C}$:een aiheuttaa nopean
normaalien proteiinien biosynteesin pysähtymisen ja heat-
shock -proteiinien tuottamisen. Yleisin ja tunnetuin heat-
35 shock -proteiini on hsp70. Näiden proteiinien ekspression
säätelymekanismia ei vielä tunneta tarkasti. Näitä pro-
moottoreja käyttämällä (*Drosophilian* hsp70-promoottori)
on voitu kasvattaa hGH:n (humaani kasvuhormoni) tuottoa

jopa 1200-kertaiseksi aktivoimattomiin soluihin verrattuna (Dreano, M., Myers, A., Cheng-Meyer, C., Rungger, D., Voellmy, R. ja Bromley, P., 1986, GENE, 49 1-8).

- 5 Esillä olevassa keksinnössä käytetään hyväksi yhdistelmä-DNA-tekniikalla valmistettuja eukaryootti- ja bakteerisoluja, jotka ovat sopivasti valittuja kantoja tai linjoja ja sisältävät tarkoituksenmukaiset yhdistelmä-DNA-vektorikon-
- 10 struktiot. Kytkemällä päälle DNA:n, RNA:n ja proteiinien synteesi hallitusti voidaan kaikki tekijät, jotka vaikuttavat edellä mainittuihin synteesikoneistoihin suoraan tai epäsuorasti, mitata. Mittausperustana voidaan käyttää valittua yhdistelmä-DNA-vektorin geenituotetta, markkeri-
- 15 proteiinia, sen aktiivisuutta tai yleisen aineenvaihdunnan tilan mittaamista. Aktivoimalla yhdistelmä-DNA-vektorin replikaatio hallitusti voidaan näin muodostunutta DNA:ta mitata suoraan esimerkiksi radioaktiivisia leimoja tai virtaussytometriaa hyväksikäyttämällä.
- 20 Tutkittavien yhdisteiden määrittämiseksi voidaan valmistaa sopivat yhdistelmä-DNA-vektorit riippuen siitä, mihin määritettävän yhdisteen vaikutus kohdistuu. Esimerkiksi DNA-synteesin (nukleotidien) ja DNA:n replikaation estävien yhdisteiden sekä DNA:han sitoutuvien yhdisteiden kuten
- 25 useiden syöpälääkkeiden määrittäminen on mahdollista ns. runaway replication -tyyppisillä plasmideilla E. coli -bakteereilla. Kyseisessä plasmidissa on plasmidin jakautumis-
- 30 alue kontrolloitu lämpöherkällä, indusoitavalla lambdan P_{RE} -promoottorilla. Näin DNA-synteesi ja replikaatio voidaan aloittaa haluttuna ajankohtana ja mitattavien yhdisteiden vaikutus nivoutuu kiinteästi tähän solunjakautumisesta riippumattomaan DNA:n hallittuun ja voimakkaaseen biosyn-
- 35 teesiin. Jos DNA:n synteesi tai replikaatio on estynyt, ilmenee tämä plasmidin kopiolumun pysymisenä samana tai jopa vähentymisenä. Kontrollisoluissa, joiden DNA-synteesi ei ole estynyt, plasmidien kopiolumu kasvaa. Plasmidien kopiolumussa tapahtuvat muutokset voidaan määrittää suoraan DNA:ta mittaamalla sekä määrittämällä plasmidin geenituot-

- teiden määrää tai aktiivisuutta. Tällaisella plasmidilla on mahdollisuus määrittää vaikutuksiltaan hyvinkin erilaisten yhdisteiden vaikutusta, koska kyseiseen plasmidiin voidaan liittää myös sopivan markkeriproteiinin tuotosta vastaava
- 5 geenipala voimakkaan ja säädeltävissä olevan promoottorin alaisuuteen, jonka markkerin ilmentymistä testissä mitataan. Tällöin kaikki DNA:han, RNA:han, proteiineihin, näiden biosynteesiteihin tavalla tai toisella vaikuttavat yhdisteet voidaan määrittää. Haluttaessa kehittää mahdollisimman
- 10 kattava testi soluseinämiin, nukleiinihappoihin, proteiineihin ja metaboliaan vaikuttavien tekijöiden määrittämiseksi on tällainen runaway replication -plasmidi ihanteellinen. Tällöin solun annetaan jakautua ja tämän jälkeen aktivoidaan solussa olevan yhdistelmä-DNA-plasmidin replikaatiota säätelevä promoottori ja markkeriproteiinin ilmentymisestä vas-
- 15 taava promoottori samanaikaisesti tai tietyn ajan kuluttua. Ominaisuuksiltaan samanlainen yhdistelmä-DNA-vektori on valmistettavissa myös eukaryoottisoluille.
- 20 Toisenlainen lähestymistapa on käyttää plasmideja, joiden replikoituminen on sidoksissa solujakautumiseen. Yhdistelmä-DNA-plasmideja, jotka ovat solussa erittäin monena kopiona ja jotka sisältävät markkeriproteiinin voimakkaan ja säädeltävän promoottorin alaisuudessa, voidaan käyttää
- 25 solukalvoihin, nukleiinihappoihin, proteiineihin ja aineenvaihduntaan vaikuttavien tekijöiden määrittämiseksi. Sekä DNA:han ja solukalvoihin vaikuttavat tekijät voidaan määrittää tällaisella testisysteemillä käytettäessä aktiivisesti jakautuvia soluja. Tällöin erittäin monena kopiona oleva
- 30 yhdistelmä-DNA-plasmidi syntetisoituu tytärsoluille ja systeemi on näin ollen erittäin herkkä DNA:han vaikuttaville tekijöille. Aktiivisesti jakautuvat solut ovat herkkiä myös solukalvoihin vaikuttaville tekijöille. Soluissa olevan yhdistelmä-DNA-plasmidin markkeriproteiinin ilmentymistä
- 35 säätelevä promoottori aktivoidaan, jolloin alkaa voimakas proteiinisynteesi ja systeemi on herkkä myös proteiinisynteesiin vaikuttaville tekijöille.

Mutageenisten aineiden vaikutusta solun perimään eli DNA:han voidaan havainnoida keksinnössä kuvatulla periaatteella seuraamalla vajavaisen geenin (ja siten geeniä vastaavan proteiinituotteen) revertoitumista aktiiviseksi proteiiniksi. Menetelmällä voidaan seurata ko. tekijöiden vaikutusta käyttämällä joko aktiivisesti jakautuvia soluja tai jos on tarve voidaan myös hyödyntää nopeaa testiä käyttämällä keksinnössä kuvattua runaway replication -pohjaista systeemiä.

10

Erityisenä sovellutuksena, käytettäessä lusiferaasigeenejä plasmidissa, on solun energiametaboliaan vaikuttavien yhdisteiden määrittäminen. Tämä on mahdollista, koska lusiferaasientsyymin katalysoima reaktio vaatii solun aineenvaihdunnan energiarikkaita yhdisteitä. Tekijät, jotka voivat vaikuttaa solun energiametaboliaan millä tahansa biosynteesitasolla (replikaatio, transkriptio, translaatio) tai aineenvaihdunnassa, voidaan määrittää bioluminesenssin eli valonmuodostuksen avulla.

20

Toisaalta solun energiametaboliaan vaikuttavien tekijöiden vaikutus voidaan määrittää kuvaamallamme testiperiaatteella, koska DNA:n ja RNA:n synteetit vaativat runsaasti energiaa ja ovat näin ollen mitattavissa. Erityistapauksena voidaan pitää bakteerilusiferaasi-proteiinia, joka käyttää solun keskeisiä aineenvaihduntatuotteita, NAD(P) ja FMNH₂, hyväkseen. Tällöin saadaan myös solun aineenvaihdunta kytkettyä plasmidiin siirretyn proteiinituotteen määrän tai aktiivisuuden määrittämiseen.

30

Keksinnön luonne tekee mahdolliseksi hyvin erilaiset mitaustavat, esimerkiksi spektrofotometriset, luminometriset, ja silmämääräiset määritykset. Spektrofotometriset määritykset voivat tulla kyseeseen silloin, kun plasmidissa on geeni, jonka tuotteen aktiivisuus voidaan mitata väriä muuttavan substraatin avulla, esimerkkinä voivat toimia beetta-galaktosidaasi, alkalinen fosfataasi, amylaasit tai peroksidaasi-entsyymit. Luminometrinen määritys suorite-

35

taan esimerkiksi bakteerilusiferaasigeenin sisältämän plasmidin avulla. Lusiferaasin mittauksessa on hyvänä puolena valon mittauksen herkkyys verrattuna esimerkiksi spektrofotometrisiin määrityksiin. Yksinkertaisen väri-indikaattorin käyttäminen taas on perusteltua tapauksissa, joissa herkkyys ei ole tärkein kriteeri, vaan menetelmän yksinkertaisuus ja nopeus. Mitattaessa solun aineenvaihdunnassa tapahtuvia muutoksia voidaan käyttää esimerkiksi tetrazoliumsuoloja, jotka muodostavat pelkistyessään vaikeasti liukenevan formazan-punaväriin. Myös immunologiset määritysmenetelmät (vasta-aineet) liitettynä herkkiin mittaussysteemeihin (RIA, FIA) ovat mahdollisia. Samoin radioaktiivisten leimojen ja virtaussytometrian käyttäminen testin lopputuloksen toteamisessa on mahdollista.

15

Yhdistelmä-DNA-vektorin kopiolumun muutokseen perustuva menetelmä:

Solu rakentaa perimäaineksensa eli DNA:n deoksiribonukleotiditrifosfaateista. Solussa voi esiintyä myös kromosomin ulkopuolista eli episomaalista DNA:ta, joka sijaitsee plasmideissa. Plasmidien monistuminen ei ole riippuvainen solun jakautumisesta, vaan kullakin plasmidilla on oma menetelmä monistua ja jakautua tytärsoluihin solunjakautumisen yhteydessä. Plasmidi käyttää kuitenkin solun DNA:n monistus- eli replikaatiokoneistoa omaan replikaatioonsa.

Kuvassa 1 on esitetty kaaviokuva kopiolumun muuttamiseen perustuvasta menetelmästä, jossa solun sisältämä erityisplasmidi (esim. runaway replication -plasmidi (pCSS123)) saadaan hallitusti sopivana ajankohtana monistumaan voimakkaasti. Alkutilanteessa solu sisältää kuvattua plasmidia harvoina kopioina. Tutkittavan tekijän annetaan vaikuttaa riittävän pitkän ajan soluihin, jotka sisältävät ko. erityisplasmidin. Tämän jälkeen plasmidin monistuminen kytetään päälle ja plasmidi monistuu niin voimakkaasti kuin se on mahdollista tutkittavan tekijän läsnäollessa. Plasmidin monistuminen saadaan aikaan lisäämällä kasvuliemeen esimer-

- kiksi kemiallinen kytkentämolekyyli tai suorittamalla kyt-
kentä fysikaalisin keinoin kuten kohottamalla lämpötila
+42°C:een. Samanaikaisesti tai sen jälkeen, kun plasmidin
monistuminen on kytketty päälle, voidaan aktivoida myös
5 halutun geenin ilmentyminen samasta erityisplasmidista.
Tällöin plasmidin monistumisen aste voidaan suoraan määrit-
tää mittaamalla tuotetun markkeriproteiinin määrää tai sen
aktiivisuutta, joka on riippuvainen plasmidin kopioluvusta
solussa. Kuvassa 1 tämä on esitetty plasmidista tuotetun
10 proteiinin entsyymiaktiivisuuden määrittämisenä soluista.
Tämä mahdollistaa myös RNA:n synteesiin, translaatioon,
vaikuttavien tekijöiden tutkimisen kuvatulla plasmidin
monistumiseen perustuvalla menetelmällä. Plasmidin monis-
tumiseen perustuvaa menetelmää voidaan näin ollen käyttää
15 hyväksi määritettäessä tai tutkittaessa muun muassa seuraa-
viin kohteisiin vaikuttavia tekijöitä: DNA:n synteesi,
replikoituminen, RNA:n synteesi, transkriptio, translaatio,
soluseinämät sekä spesifiset metaboliatiet että entsyymiak-
tiivisuudet.
- 20
- Kuvassa 2 on esitetty ylimalkaisesti plasmidin kopioluvun
muutokseen perustuvan menetelmän mahdollisuuksia määrittää
solun eri synteesikoneistoihin ja reaktioihin vaikuttavia
tekijöitä. DNA:n, RNA:n ja proteiinin biosynteesit ovat
25 monivaiheisia ja ne vaativat usean eri tekijän keskinäistä
vuorovaikutusta. Kullakin vaiheella on sekä luontaisia
että keinotekoisia vaikuttajayhdisteitä, jotka joko akti-
voivat tai estävät toiminnan. Nalidiksiinihappo esimerkiksi
vaikuttaa DNA:n replikaatioon, estäen DNA-polymeraasin
30 toiminnan.
- Huomionarvoinen seikka on se, että menetelmässä lähdetään
liikkeelle muutamista säädeltävissä olevista DNA-molekyy-
leistä, jotka voidaan saada monistumaan haluttuna ajankoh-
35 tana ilman, että se olisi mitenkään riippuvainen itse solun
jakautumisesta. Tämä mahdollistaa jakautumattomienkin
solujen käyttämisen erilaisten tekijöiden testaukseen, jol-
loin määrittelyyn kuluva aika ei rajoita solujen hidas

jakautuminen. Tämän menetelmän keksinnöllisyys perustuu plasmidin DNA:n, perimäaineksen, hallittuun monistumiseen ja tämän mahdollistamaan erittäin laajojen yhdisteryhmien ja tekijöiden tutkimiseen.

5

Keksinnössä käytetään hyväksi säädeltävissä olevia promootoreita ja näiden promoottorien säätelemiä toimintoja, kuten esimerkiksi yhdistelmä-DNA-vektorin kopiolumun kasvattamista ja/tai valittujen markkeriproteiinien tuottamista soluissa halutulla hetkellä. Promoottorit sisältävät alueen, johon RNA-polymeraasi-entsyymi voi sitoutua, sekä erityisen säätelyproteiinin tai muun molekyylin kiinnittymiseen tarkoitettua aluetta. Promoottoreilla tarkoitetaan yksinkertaisesti DNA:ssa olevaa yksikköä, joka kontrolloi sen vieressä tai lähistöllä sijaitsevan geenin ekspressiota. Kytkeytyviä promoottoreita E. coli -bakteerilla ovat esimerkiksi lac-, trp-, hybridipromoottori tac ja lambda-faagin p_L - ja p_R -promoottorit. Nämä promoottorit eroavat toisistaan muun muassa voimakkuudessa ja kytkentätavassa. lac- ja trp-promoottorit voidaan kytkeä päälle kemiallisilla yhdisteillä, kun taas p_L -promoottorin kytkeminen päälle voidaan suorittaa yksinkertaisesti lämpötilaa kohottamalla.

25

Toksisten aineiden määrittäminen menetelmällä, jossa käytetään hyväksi hallitusti aktivoitua valkuaisaineen biosynteesiä yhdistelmä-DNA-plasmidissa olevalla säädeltävällä promoottorilla:

30

Solun toinen perimäaines DNA:n ohella on RNA, erityisesti ns. lähetti-RNA (mRNA). Lähetti-RNA:ta syntetisoidaan solussa, ribonukleotiditrifosfaateista, joita on solussa varastoituneena. Lähetti-RNA:ta syntetisoidaan DNA-molekyylin kunkin geenin mukaiseksi erityisessä transkriptiokoneistossa, johon osallistuu tästä toiminnasta vastaavia molekyylejä. Valkuaisainetta eli proteiinia valmistetaan lähetti-RNA-molekyylien toimiessa malleina yleisesti tunnettujen hypoteesien mukaisesti. RNA:n synteesi on mahdollista kytkeä päälle hyvin nopeasti, kuten myös RNA:n koodittaman

35

- proteiinin synteesi. Keksinnössä käytetään hyväksi erityisiä yhdistelmä-DNA-plasmideja, jotka on valmistettu niin, että ne voidaan saada tuottamaan haluttaessa erittäin paljon sopivasti valikoituja proteiineja. Tässä tapauksessa erityisplasmidi on rakennettu niin, että plasmidin kopioklukua ei voida säädellä, vaan se on käytetyille plasmidille ominainen käytettävässä mikrobissa. Pyrkimyksenä on käyttää tässä tapauksessa sellaisia plasmideja, joiden kopiokluku on mikrobissa erittäin suuri, jolloin proteiinin tuotto on erittäin suurta. Kun tällaisiin erityisplasmideja sisältäviin soluihin vaikutetaan RNA:n tai proteiinien tuottoa inhiboivilla tekijöillä, kuten esimerkiksi antibiooteilla, ennen erityisplasmidin proteiinituotannon indusoimista, voidaan indusoinnin jälkeisestä muuttuneesta proteiinin tuotosta arvioida antibiootin määrää, vaikutusmekanismia tai ylipäättään antibiootin mukanaoloa systeemissä. Keksinnön ideaa sovelletaan tässä tapauksessa altistamalla mikrobi tekijöille, jotka vaikuttavat sellaisiin biosynteesiteihin, jotka käynnistetään spesifisesti ja tarkasti säädellysti vaikuttavien tekijöiden läsnäollessa. Tällöin, kun käytetään keksinnössä kuvatun kaltaisia yhdistelmä-DNA-plasmideja, saadaan sopivasti valitun proteiinin tuotto vaikuttavista tekijöistä riippuvaiseksi.
- 25 Merkille pantavaa on samaten se, että tällaisella yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämällä mikrobilla voidaan myös määrittää DNA:han ja solukalvoihin vaikuttavia tekijöitä. Tämä on mahdollista siten, että mikrobin jakautuessa se joutuu syntetisoimaan näitä erittäin monena kopiona olevia erityisplasmideja ja tällöin erityisplasmidit ovat alttiina DNA:han vaikuttaville tekijöille. Aktiivisesti jakautuvat solut ovat erityisen alttiita myös soluseinämiin ja niiden biosynteesiin vaikuttaville tekijöille.
- 30
- 35 Kuvassa 3 on esitetty edellä kuvatun keksinnön soveltaminen käytännössä, jolloin erityisplasmidi on hyvin monena kopiona mikrobissa. Mikrobi saatetaan kuvan tapauksessa alttiiksi biosynteesijä inhiboivalle tekijälle ja riittävän pitkän

vaikutusajan jälkeen erityisplasmidit hallitusti aktivoidaan tuottamaan proteiinia, joka tässä tapauksessa on entsyymi. Kuvassa esitetyt nuolen paksuudet ovat verrannollisia lähet-

5 vaikuttavien tekijöiden efektiivisyydelle. Tapauksessa, jossa inhiboivaa tekijää on ollut mukana, entsyymin tuotto on jäänyt alhaiseksi. Vertaamalla tulosta tapaukseen, jossa vaikuttavaa tekijää on ollut tunnettuja määriä ja/tai ei

10 lainkaan mukana, voidaan määrittäminen suorittaa joko kvantitatiivisesti tai kvalitatiivisesti. Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaistetusti ne kohdat biosynteesiteistä, joihin vaikuttavia tekijöitä voidaan määrittää edellä kuvatun

15 kaltaista yhdistelmä-DNA-plasmidia käyttäen, kun ei käytetä aktiivisesti jakautuvia soluja. Jos käytetään aktiivisesti jakautuvia soluja määrittämisessä, on mahdollista tutkia myös DNA:han vaikuttavia tekijöitä kuten kuvassa 2 on esitetty.

20 Erona kuvassa 1 esitettyyn menetelmään on siis se, että tässä tapauksessa ei käytetä vain muutamina kopsina olevaa yhdistelmä-DNA-plasmidia, jonka kopioklukua voidaan halutaessa kasvattaa runsaasti aktiivisesti jakautumattomassa solussa.

On siis olemassa erilaisia promootoreja, jotka voidaan kytkeä päälle sopivasti käsittelemällä. Promootoreiden

25 voimakkuuksissa on huomattavia eroja, ja kaikki tässä keksinnössä mainitut promoottorit ovat suhteellisen voimakkaita. Kuitenkin voidaan sanoa, että *p_L*-promoottori on huomattavasti voimakkaampi kuin *lac*- ja *trp*-promoottorit.

30 Lambda-faagin *p_L*-promoottori on myös huomattavasti edellisistä promoottoreita nopeampi eli kytkennän vaikutus näkyy selvästi nopeammin verrattuna mainittuihin kahteen muuhun. Osaksi mainittu nopeus voidaan selittää kytkentämolekyylin hitaalla kulkeutumisella solukalvon lävitse *lac*- ja *trp*-promoottorien tapauksessa ja edelleen kulkeutumisella solun

35 sisällä vaikutuskohtaansa (esimerkkinä voidaan mainita *lac*-promoottorin kytkentämolekyyli IPTG). Myös käytetyn plasmidin kopioklukku selittää osaltaan kytkennän suhteellisia eroja. Plasmidin pCSS112 (ks. kuva 7) kopioklukku *E. coli*'ssa

on noin 60, kun taas plasmidin pCSS108 (ks. kuva 8) kopioluku on noin kymmenkertainen. Kummassakin plasmidissa lusiferaasin tuottoa säätelee suhteellisen voimakas, repressoituva promoottori, edellisessä tapauksessa lambda-faagin p_L-promoottori ja jälkimmäisessä tapauksessa E. coli'n laktoosioperonin lac-promoottori. Kumpaakin promoottoria säätelevät tietyt repressoriproteiinit, joita tuotetaan rajoitettuja määriä. Koska edellisessä tapauksessa käytetyn plasmidin kopioluku on huomattavasti pienempi kuin jälkimmäisessä tapauksessa, on lusiferaasiproteiinin tuotto edellisessä tapauksessa paremmin kytketty pois päältä eli de-repressoitunut. Näin ollen jälkimmäisessä tapauksessa lac-promoottori "vuotaa" repressoriproteiinin suhteellisen määrän vähäisyydestä johtuen, jolloin määritettävän aineen tai aktiivisuuden perustaso on jo valmiiksi korkealla. Toksisten tekijöiden vaikutus saadaan havainnollistettua tehokkaammin käytettäessä voimakasta ja nopeasti kytkeytyvää promoottoria, joka ohjaa tiettyä geeniä tai toimintaa yhdistelmä-DNA-vektorissa.

20

Mutageenisten aineiden määrittäminen yhdistelmä-DNA-vektorin hallittuun kopioluvun muutokseen tai vakioiseen kopiolukuun perustuvalla menetelmällä:

25 Mutageenisia aineita on perinteisesti määritetty ns. Ames'in testeillä, joissa käytetään hyväksi Salmonellan mutanttikantoja. Mutanttikannoissa on histidiini-aminohapon biosynteesitie puutteellinen siten, että biosynteesitietä kooditavassa kromosomaalisissa DNA-jaksoissa esiintyy yksittäisiä
30 pistemutaatioita tai ns. lukukehysmutaatioita. Kasvatettaessa näitä kantoja minimaljoilla, joilta puuttuu histidiini, ei periaatteessa voi tapahtua kasvua. Jos kuitenkin kantoja käsitellään mutagenisoivilla aineilla, jotka korjaavat kyseiset muutokset kromosomaalisessa DNA:ssa
35 takaisin villityypin sekvenssiksi tai muutoin toimivaksi proteiiniksi, siten että solulle palautuu kyky syntetisoida histidiiniä, saadaankin aikaan kasvavia bakteeripesäkkeitä, joiden määrä on verrannollinen käytetyn mutageenisen aineen

määrään. Menetelmässä on käytetty erilaisia Salmonella-kantoja, joilla pystytään arvioimaan usean eri vaikutusmekanismin omaavia mutageenisia aineita, eli menetelmä on hyvinkin spesifinen. Menetelmän haittapuolena on pitkä kasvatusaika minimaljoilla (2 vrk) ja suuritöisyys. Menetelmää ei voida automatisoida.

10 Mutageenisten aineiden havainnointi ja määrittäminen voidaan suorittaa kehittämällämme yhdistelmä-DNA-vektorin kopiolumun muutokseen perustuvalla tai nk. vakioisen kopiolumun menetelmällä. Edellisessä tapauksessa määrittäminen tehdään aktiivomalla kohdeplasmidi monistumaan mutageenisen tekijän vaikutettua, jolloin mahdollinen vaikutus moninkertaistuu ja lopputulos voidaan määrittää nopeasti ja herkästi. Tässä 15 tapauksessa ei aktiivinen solunjakautuminen ole välttämätöntä, koska keksimässämme menetelmässä käytetään isäntäsolun jakautumisesta riippumattomia, säädeltävästi monistuvia plasmideja. Tässä systeemissä on myös edullista, että valkuaisaineen tuotto on erittäin vahvan promoottorin säätelyn alaisena. Jälkimmäisessä tapauksessa, jossa käytetään 20 vakioisen kopiolumun omaavia soluja, tarvitaan useimmissa tapauksissa mutageenisten aineiden määrittämiseksi aktiivisesti jakautuvia soluja. Määrittämisessä lopputuloksen esim. mutageenisen aineen aikaansaama aktiivisen entsyymin 25 muodostuminen aktivoidaan erityisillä säädettävillä promoottoreilla erityisissä yhdistelmä-DNA-plasmideissa. Tällainen keino nopeuttaa määrittäystä myös merkittävästi ja lisää määrittäksen herkkyyttä.

30 Esimerkkinä tässä keksinnössä lusiferaasia koodittaviin geeneihin on yhdistelmä-DNA-tekniisin keinoin aikaansaatu pistemutaatioita siten, että tuotettava proteiini ei ole funktionaalinen eikä näin ollen tuota valoa. Käsiteltäessä näitä uusia mikrobikantoja mutageenisilla aineilla voidaan 35 valontuottokyky palauttaa, jolloin saadaan selvä korrelaatio mutageenisen aineen määrälle ja valontuotolle. Edelleen, mutaatiot lusiferaasigeeneissä voidaan valita siten, että menetelmällä havaitaan eri mutageenisten aineiden luokat.

Keksinnössä käytetyt solukannat, plasmidit ja niiden rakentaminen sekä menetelmät:

- 5 E. coli JM103 (Δ lac-pro, thi, strA, supE, endA, sbsB15, hsdR4 (F'traD34, proAB, lacI^qZ Δ M15) (Messing et al., Nucl. Acids Res., 9, 1981, 309-321), MC1061 (cI⁺) (Casadaban & Cohen, J. Mol. Biol, 138, 1980, 179-207) ja K-12 (M72 Sm^R-lacZam Δ bio-uvrB trpEA2 (Nam7Nam53c1857 Δ H1) (Remaut et al., 10 1981, Gene, 15, 81-93) käytettiin geeninsiirtoisäntinä ja toksisuuskokeissa. Solut kasvatettiin asianmukaisilla minimaljoilla ja maljoja säilytettiin korkeintaan 1 kuukausi +4°C:ssa, minkä jälkeen vedettiin uudet maljat. Kantoja säilytettiin myös -70°C:ssa 15 % glyserolissa, josta 15 tarpeen vaatiessa aloitettiin kasvatus minimaljan kautta. Plasmidien eristystä varten soluja kasvatettiin ensin 5 ml:n tilavuudessa (2xTY-mediumia, kuvattu jäljempänä) 10 tuntia 30°C:ssa ravistellen, ja alkukasvatus siirrettiin isompaan tilavuuteen samaa mediumia 10 tunniksi.
- 20 Kuvissa 5a ja 5b on esitetty yhdistelmä-DNA-plasmidin pCSS123 (tallennettu DSM-numerolla 5119) rakentaminen ja valmistus. Plasmidi pWH102 pilkottiin restriktioentsyymeillä SalI ja PvuII. Katkaistu plasmidi pWH102 ajettiin agarosi-geeli-elektroforeesilla. Tämän jälkeen erotettiin 2300 25 emäsparin mittainen pala matalassa lämpötilassa sulavalta geeliltä leikkaamalla se ultraviolettivalossa. Saatu pala sulatettiin 65°C:ssa ja se liitettiin ligaasiensyymien avulla samoilla restriktioentsyymeillä katkaistuun plasmidiin pEMBL19 (-) (Dente et al., 1983, Nucleic Acids Res., 30 11, 1645-1655). Saatu rakennelma siirrettiin myöhemmin kuvatulla tavalla E. coli JM103 -bakteerikantaan. Tehtiin yhdistelmä-DNA-plasmidien eristys pienessä mittakaavassa, kuten on kuvattu (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning: 35 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor), ja todettiin restriktioentsyymikatkaisuin oikea plasmidirakennelma. Plasmidieristys suuremmassa mittakaavassa tehtiin saman kirjan ohjeiden mukaisesti.

- Saatu plasmidirakennelma pCSS111 (kuva 5a) katkaistiin restriktioentsyymillä PvuII ja 2400 emäsparin mittainen DNA-pala erotettiin, kuten edellä on kuvattu. Tämä pala liitettiin edellä kuvatulla tavalla restriktio-entsyymillä BamHI-katkaistuun plasmidiin pOU61 (Larsen *et al.*, 1984, Gene, 28, 45-54) sen jälkeen, kun DNA-palan päät oli tasattu DNA-polymeraasientsyymillä avulla asianmukaisessa puskuriseoksessa. Ligaatioseos siirrettiin myöhemmin kuvatulla tavalla *E. coli* JM101 -bakteerikantaan ja oikean plasmidirakennelman sisältävät bakteeripesäkkeet valittiin transformaatiomallajoilta pimeähuoneessa pipetoimalla maljan kanteen 5 µl 10 % dekanaalia, joka höyrystyessään aiheutti lusiferaasi-geenit sisältävien pesäkkeiden valoa tuottavan ominaisuuden.
- Käytetyt symbolit ja lyhenteet: amp^r = β-laktamaasigeeni, ori = plasmidirakennelman monistumisen aloituskohta, lux A ja B = lusiferaasiproteiinia koodittavat geenit, lacP = *E. coli*'n laktoosioperonin promoottori, F1(IG) = faagin F1 intergeeninen alue, MCS = monelle restriktioentsyymille soveltuva DNA:n katkaisualue, joka on peräisin yhdistelmä-DNA-plasmidista pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985, Gene, 33, 103-109), kb = tuhat emäsparia, *repA*, *copA* ja *copB* = geenit, joiden proteiinituotteet vastaavat plasmidin kopioluvusta ja jakautumisesta tytärsoluihin, cI857 = lambda-faagin lämpöherkkä repressor, p_λ = lambda-faagin oikeanpuoleinen promoottori. Restriktioentsyymien lyhenteet: R = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI, S = SalI, P = PvuII, Sa = SacI, K = KpnI, Sm = SmaI, X = XbaI, Ps = PstI, Sp = SphI. B/P = liittämiskohta BamHI, tasatut päät, PvuII.
- Kuvassa 6 on esitetty plasmidi pCSS108 (Korpela & Karp, Biotechnol. Lett., 10(6), 1988, 383-388), jota käyttäen bakteerilusiferaasin tuotto saadaan aikaan lisäämällä IPTG-niminen kemikaali, joka kytkee ko. proteiinin tuoton päälle sitoutumalla *lac*-repressoriproteiiniin.

Kuva 6. Yhdistelmä-DNA-plasmidin pCSS108 rakenne.

Vibrio harveyi -bakteerin lusiferaasigeeni siirrettiin plasmidirakennelmasta pWH102 (Gupta *et al.*, 1985, Arch. Microbiol., 143, 325-329) katkaisemalla ko. plasmidi restriktioentsyymillä BamHI. Saadut kaksi DNA-palaa käsiteltiin entsyymillä alkalinen fosfataasi (CIP) pääte-fosfaattiryhmien poistamiseksi, jotta palat eivät pääse uudelleen liittymään toisiinsa. Palat erotettiin toisistaan ajamalla matalassa lämpötilassa sulava agarosigeelielektroforeesilaitteistossa. 5000 emäsparin mittainen pala leikattiin irti (suurempi pala), ja geeli sulatettiin kuumentamalla 65°C:ssa 15 minuuttia. Sulassa tilassa oleva DNA laimennettiin puskurilla ja osa tästä lisättiin restriktioentsyymillä BamHI katkaistun yhdistelmä-DNA-plasmidin pEMBL 18 (+) (Dente *et al.*, 1983, Nucleic Acids Res., 11, 1645-1655) joukkoon. Ligaasientsyymillä liitettiin saadut DNA-palat toisiinsa ympyrämuotoiseksi rakennelmaksi ja ne siirrettiin myöhemmin kuvatulla tavalla E. coli JM103 -bakteerikantaan. Valoa tuottavat pesäkkeet havainnoitiin pimeähuoneessa silmävaraisesti levittämällä 5 µl 10 % n-dekanaalia kasvumaljan kanteen. Käytetyt symbolit: kuten kuvassa 5.

Plasmidin pCSS112 (tallennettu DSM-numerolla 5120) rakenne ja valmistus on esitetty kuvassa 7. Kyseisessä plasmidissa lusiferaasigeenit on asetettu lambda-faagin p_L-promoottorin toiminnan alaiseksi. Sopivassa isännässä, kuten K-12ΔHIΔtrp (cI857), ko. promoottorin toimintaa säätelee lämpökäsittelyllä tuhoutuva lambda-faagin repressoriproteiini cI857. Plasmidi pWH102 katkaistiin restriktioentsyymeillä Sali ja BamHI. Plasmidi pPLcAT110 (Stanssens *et al.*, 1985 Gene, 36, 211-233, osaksi julkaisematon) katkaistiin restriktioentsyymeillä Sali ja BglII. Saadut DNA-palat erotettiin geelielektroforeesilla siten, että katkaistusta plasmidista pWH102 eristettiin noin 4000 emäsparin mittainen DNA-pala ja plasmidista pPLcAT110 eristettiin noin 2900 emäsparin mittainen pala. Saadut DNA-palat liitettiin toisiinsa ligaasientsyymillä avulla ja siirrettiin E. coli MC1061 (cI⁺) -bakteerikantaan. Haluttu plasmidirakenne etsittiin kuten edellä on kuvattu ja siirrettiin E. coli K-12ΔtrpΔHI

(cI857) -bakteerikantaan. Käytetyt symbolit ja lyhenteet: kuten kuvassa 5, lisäksi p_L = faagin lambda vasemmanpuoleinen promoottori, P_v = P_{vuI} .

5 Yhdistelmä-DNA-plasmidien siirto E. coli -kantoihin:

Yhdistelmä-DNA-plasmidit siirrettiin ns. $CaCl_2$ -käsitellyihin soluihin siten, että yli yön kasvatetuista bakteereista siirrettiin 5 ml:n kasvusto 2xTY:ssä (NaCl 8 g, hiivaekstrakti 8 g, tryptoni 16 g, H_2O ad 1 l, pH 7,4) 100 ml:aan samaa kasvatusliuosta. Bakteereja kasvatettiin noin 2 tuntia, kunnes absorbanssi mitattuna 600 nm:ssä oli 0,8. Solut jäädytettiin jäähauteella ja sentrifugoitiin 4000xg:ssä 5 min. Solupelletti suspendoitiin 50 ml:aan 50 mM $CaCl_2$:a
10 jäähauteella, minkä jälkeen sentrifugoitiin alas 3000xg, 5 min 0°:ssa. Solut suspendoitiin 4 ml:aan 50 mM $CaCl_2$:a, johon oli lisätty glyserolia 15 %:ksi. Nämä ns. kompetentit solut jaettiin 1 ml:n eriin ja jäädytettiin nopeasti nestemäisessä työssä ja säilytettiin -70°:ssa myöhempää käyttöä
15 varten.
20

E. coli-kantojen transformointi yhdistelmä DNA-plasmideilla:

250 μ l kompetentteja soluja lisättiin jäähauteella kylmen-
25 nettyihin putkiin, joissa oli puhdasta plasmidi-DNA:ta tai ns. ligaatioseosta 1-10 l ja 26 l 10xTMC (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM $CaCl_2$). Putkia sekoitettiin varovaisesti ja pidettiin jäähauteella 10 min. Tämän jälkeen soluja ravisteltiin +42°C:ssa 2 min. Tämän
30 jälkeen lisättiin 1 ml 2xTY-kasvatusliuosta ja ravisteltiin 1 tunti +30°C:ssa. Ligaatioseoksilla transformoidut solut sentrifugoitiin alas 3 min 8000xg:ssä ja suspendoitiin noin 100 μ l:aan sentrifugoitua supernatanttia ja levitettiin
antibioottiselektio-maljoille. Transformoidut solut levi-
35 tettiin antibioottimaljoille.

Kaksinauhaisen DNA:n emäsjärjestyksen määrittäminen:

Noin 4 μg kaksinauhaista standardimenetelmillä puhdistettua DNA:ta (esimerkiksi CsCl-gradientti) lisätään 2 μl :aan 2 M NaOH:ta. Annetaan seistä 5 min huoneenlämpötilassa ja lisätään 3 μl 3 M Na-asettaattia, pH 4,5 ja 2 μl H_2O . DNA saostetaan lisäämällä 75 μl absoluuttista etanolia ja seosta seisotetaan 30 min -70°C :ssa. Saostunut DNA sentrifugoidaan pohjaan Eppendorf-mikrosentrifugissa (12000 rpm, 5 min) ja sakka pestään kertaalleen 70-%:lla etanolilla. Sentrifugoinnin jälkeen sakkaa kuivataan 5 min vakuumieksikkaatorissa ja kuivauksen jälkeen sakka liuotetaan 4 μl :aan vettä. Samanaikaisesti lisätään 5 pmol spesifistä aluketta ja 1 μl 10xKlenow-puskuria (koostumus kuvailtu kaupallisessa sekventointiopaskirjassa, Amersham, Ltd.). Liuotuksesta alkaen toimenpiteet suoritetaan 37°C :ssa. Putkia seisotetaan 15 min, minkä jälkeen lisätään 1 yksikkö Klenow-entsyymiä, 4 μl ^{35}S -leimattua deoksi-ATP:a ($<500 \mu\text{Ci/ml}$) ja sekoitetaan sentrifugoimalla. Edellistä seosta otetaan 3,5 μl kuhunkin dideoksinukleotidireaktioputkeen (deoksi- ja dideoksinukleotidien suhteet on kuvattu opaskirjassa) ja annetaan seistä 15 min. Kuhunkin neljään putkeen lisätään 1,5 μl Chase-liuosta, joissa kunkin deoksinukleotidin loppupitoisuus on 1,0 mM. Putkia seisotetaan 15 min, minkä jälkeen liuokset siirretään polyakryyliamidigeelille. Geeliä ajetaan riittävästi, jonka jälkeen geeli kiinnitetään, kuivatetaan ja valotetaan röntgenfilmillä yleisten periaatteiden mukaisesti.

Esimerkki 1:

Plasmidin kopioluvun muutos käsiteltäessä soluja nalidiksiinihapolla:

Keksinnössä kuvattu plasmidi pCSS123 on ns. runaway replication -plasmidi, jossa kopioluvun muutos saadaan aikaan lämpötilaa muuttamalla. Kuvassa 8 tämä on havainnollistettu tutkimalla lämpökäsiteltyjen *E. coli*-solujen, jotka sisältävät kyseisen plasmidin, DNA:n määrää ja laatua. Kuvassa on tutkittu tunnetun DNA:n replikaation estävän aineen,

nalidiksiinihapon, vaikutusta solujen DNA:han ja erityisesti tässä hakemuksessa käytetyn plasmidi pCSS123:n määrään.

E. coli pCSS123/JM103 -soluja kasvatettiin 20 ml:ssa 2xTY-kasvatusliuosta +30°C:ssa neljässä eri erlenmeyer-pullossa, kunnes absorbanssi mitattuna 600 nm:ssä oli 0,3. Pulloihin lisättiin nalidiksiinihappoa, jonka tiedetään estävän solun DNA:n replikaation, loppupitoisuuteen 0, 1, 10 ja 100 µg/ml. Jokaisesta pullosta otettiin välittömästi 2x1,5 ml:n näytteet 15 ml:n putkiin, joita pidettiin +30°C:ssa 20 min. Putket siirrettiin +42°C:een 1 tunniksi; pullot jätettiin +30°C:een. Tämän jälkeen putkia ja pulloja pidettiin vielä yksi tunti +30°C:ssa ravistelussa, minkä jälkeen eristettiin totaali-DNA 1,5 ml:sta kasvustoa. Solut sentrifugoitiin 15 alas ja suspendoitiin sakat 500 µl:aan 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA. Soluja pidettiin jäähäuteella 30 min, jonka jälkeen lisättiin lysotsyymiä 50 µl (10 mg/ml) ja pidettiin jäissä 45 min. Tämän jälkeen lisättiin 100 µl STEP-liuosta (0,5 % SDS, 50 mM TRIS-HCl pH 7,5 ja 0,4 M 20 EDTA) ja pidettiin 60 min +50°C:ssa. Lisättiin 600 µl fenolia, ravisteltiin 5 min kevyesti ja sentrifugoitiin 10 min 12000xg. Supernatantti otettiin talteen ja sille suoritettiin DNA:n saostus lisäämällä 2 tilavuutta 99,5 % etanolia ja kaliumasetaattia, pH 6,0, 0,3 M:ksi. Pidettiin -70°C:ssa 25 30 min ja sentrifugoitiin 10 min 12000xg. Sakka pestiin 1x500 µl:lla 70 % etanolia, sentrifugoitiin kuten edellä ja sakka kuivattiin vakuumeiksi kaattorissa 5 min. Kuivunut sakka liuotettiin 50 µl 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 100 µg/ml RNAaasi A-liuosta ja pidettiin 20 min +65°C:ssa 30 sekä analysoitiin. Kuvassa on esitetty agarosigeelielektroforeesiajo soluista eristetyistä DNA:ista. Kuvasta havaitaan, että lämpökäsittelimättömien näytteiden DNA-määrät ja laatu pysyvät suhteellisen muuttumattomina. Edelleen käsiteltäessä soluja suurimmalla nalidiksiinihappopitoisuudella (100 µg/ml) DNA:n määrä ja laatu ovat kuten käsittelemättömien kontrollinäytteiden määrä ja laatu. Lämpökäsitelty solut, joita ei oltu käsitelty nalidiksiinihapolla, antoivat geelielektroforeesissa huomattavan plasmidi-

DNA:n määrän lisäyksen (kuvattu nuolella). Plasmidi-DNA:n määrä väheni käsiteltäessä soluja pienillä pitoisuuksilla (1 ja 10 µg/ml) nalidiksiinihappoa.

5 Esimerkki 2:

Plasmidin kopioluvun muutokseen perustuva toksisten aineiden määrittäminen mitattuna valonmuodostuksen avulla:

- Yön yli kasvaneita pCSS123/JM103-soluja laimennettiin
- 10 1:1 000. Tämän jälkeen otettiin 0,5 ml laimennettuja soluja 2xTY:ssä ja lisättiin eri määriä antibiootteja tai muita toksisia aineita liuokseen ja inkuboitiin 20 min +30°C:ssa. Putket siirrettiin +42°C:een 60 min:ksi lämpökäsittelyä varten. Tämän jälkeen kaikki putket temperoitiin
- 15 +30°C:een 5 min:n aikana vesihauteella ja samalla lisättiin IPTG (isopropyyli-β-D-tiogalaktopyranosidi) 1 mM:ksi ja n-dekanaali 0,01 %:ksi. Putket siirrettiin automaattiseen valoa keräävään mittauslaitteistoon eli luminometriin (LKB-Wallac 1251, Turku), jonka mittauskaruselli oli temperoitu
- 20 +30°C:een. Mittaus suoritettiin automode-ohjelmalla siten, että jokaista putkea mitattiin kerran kahdessa minuutissa valontuoton suhteen. Tulokset kerättiin luminometriä ohjaavan mikrotietokoneen muistiin myöhempiä analyysia varten. Kuvassa 9 on esitetty nalidiksiinihapon toteaminen määrittä-
- 25 liuoksesta käyttämällä E. coli-soluja, joihin on kloonattu plasmidi pCSS123. Kuvasta havaitaan, että jo kahden µg:n pitoisuus nalidiksiinihappoa määrittäsolosuhteissa voidaan havaita käytetyllä menetelmällä erittäin nopeasti.

Esimerkki 3:

Antibiootin määrittäminen menetelmällä, jossa käytetään hyväksi yhdistelmä-DNA-plasmidia missä replikaation aloitus ei ole säädeltävissä:

5

Esimerkissä on verrattu antibiootin vaikutusta käytettäessä plasmideja, joissa bakteerilusiferaasigeenin ekspressiota ohjaa lac-(hidas) tai p_L-promoottori (nopea). E. coli -klooneja pCSS112/K-12ΔHIΔtrp(cI857) kasvatettiin yli yön 2xTY-kasvatusliuoksessa, jossa oli 100 µg/ml ampisilliiniä. Tämän jälkeen tehtiin sopiva laimennus HBSS-puskuriin tai maitoon ja lisättiin tätä 500 µl 3 ml:n luminometriputkiin. Putkia temperoitiin +30°C:ssa ja lisättiin eri määriä erilaisia toksisia aineita putkiin. Putkia seisotettiin 20 min 30°C:ssa. Tämän jälkeen nostettiin lämpötila +42°C:een 10 minuutiksi, jonka jälkeen putket siirrettiin +30°C:een temperoituun luminometriin mitattaviksi. Vertailuna käytettiin kloonina pCSS108/JM103, jolle tehtiin samanlaiset käsittelyt sillä erotuksella, että solut pidettiin koko ajan +30°C:ssa ja mRNA- ja proteiinisynteesit käynnistettiin lusiferaasigeenien edessä olevasta lac-promoottorista IPTG-kemikaalilla (loppupitoisuus 1 mM). Kuvasta 10 havaitaan, että käytettäessä plasmidirakennelmaa, jossa p_L-promoottori ohjaa määritettävän proteiinin tuottoa, saadaan toksisen aineen vaikutus esille huomattavasti pienemmissä pitoisuuksissa kuin käytettäessä hidasta ja heikompaa lac-promoottoria. Kloramfenikolin tapauksessa valontuoton kinetiikka on esitetty kuvassa 11 käytettäessä plasmidia pCSS112 E. coli -kannassa K12ΔHIΔtrp(cI857). Kuvasta havaitaan, että erot mitatussa aktiivisuudessa (valontuotossa) ovat näkyvissä mittauksen alusta saakka jopa 0,1 µg:n pitoisuuksilla määrittämisvetissä.

35

Esimerkki 4:

Toksisten aineiden määrittäminen menetelmällä, jossa käytetään hyväksi E. colissa vakioisena määränä olevaa yhdistelmä-DNA-plasmidia ja säädeltävää lambda-faagin p_L-promoottoria bakteerilusiferaasin biosynteesin aktivoinnissa:

Seuraavassa on esimerkkejä muihin solujen biosynteesikoneis-
toihin ja aineenvaihduntaan vaikuttavien tekijöiden määri-
tyksestä kuvaamallamme menetelmällä. Testit on suoritettu
5 samalla tavoin kuin aiemmissa esimerkeissä on kuvattu eli
tarkoituksena on ollut kehittää mahdollisimman nopeasti
suoritettava testi, joka kuitenkin olisi riittävän herkkä.
Testeissä käytettiin plasmidia pCSS112 edellä mainitussa
bakteerikannassa.

10

Seuraavat kuvat esittävät kunkin testatun aineen vaikutusta
mitattuna valonmuodostuksen avulla. Kuten aiemmissakin
määrityksissä inhiboivien tekijöiden vaikutus näkyy alen-
tuneena bioluminesenssin tuottona verrattuna tapaukseen,
15 jossa inhiboivaa tekijää ei ole ollut mukana. Kuvassa 12
on esitetty transkription eli lähetti-RNA:n muodostuksen
estävän antibiootin, rifampisiinin, määrittäminen kehittämällä
menetelmällä. Jo yksi mikrogramma rifampisiinia voidaan
todeta tällä erittäin nopeasti suoritettavalla testillä.
20 Oksitetrasykliinin, joka sitoutuu 30S ribosomaaliseen alayk-
sikköön, vaikutus kehittämäämme mittausjärjestelmään erittäin
nopealla määrittäytävällä on esitetty kuvassa 13. Kuten
rifampisiini oli myös tämän antibiootin vaikutus voimakas
ja selvästi todettavissa. Kuvassa 14 on esitetty yleisen
25 aineenvaihdunnan estäjän, sulfiitin, jota käytetään elintar-
viketeollisuudessa, vaikutus testisysteemissämme. Tämä
tulos osoittaa selvästi kehittämämme testisysteemin mahdol-
listavan myös solun yleiseen aineenvaihduntaan vaikuttavien
tekijöiden määrittämisen erittäin nopeasti.

30

Esimerkki 5:

Toksisen aineen määrittäminen menetelmällä, jossa käytetään
hyväksi lambda-faagin p_r-promootoria beta-galaktosidaasin
biosynteesikoneiston aktivointiin:

35

Edellisissä esimerkeissä käytettiin mittausperusteena bak-
terin tuottamaa valoa, joka aiheutui lusiferaasia koodit-
tavista geeneistä. Valkuaisaineena voidaan käyttää mitä

tahansa proteiinia tai peptidiä, jolle on olemassa määrittämenetelmä. Tässä esimerkissä lusiferaasia koodittava geeni vaihdettiin beta-galaktosidaasi-geeniin. Käytetty plasmidi pPLCAT14 on kuvattu aikaisemmin (Stanssens, P., Remaut, E. & Fiers, W., 1985, GENE, 36, 211-223).

E. coli -klooneja pPlcAT14/ Δ K12 Δ HITrp kasvatettiin yön yli 2xTY-kasvuliuksessa, jossa oli 100 μ g/ml ampicilliiniä. Tämän jälkeen bakteereista tehtiin sopiva laimennos HBSS-puskuriin ja lisättiin tehtyä laimennosta 80 μ l lasiputkiin. Kloramfenikolia lisättiin 20 μ l:ssa eri määriä edellä mainittuihin putkiin ja inkuboitiin huoneenlämmössä seisottaen 15 min. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin p_L-promootorin aktivointi siirtämällä putket +42°C:een 30 min:ksi. Tämän seurauksena solun biosynteesikoneisto aktivoituu tuottamaan pPLCAT14-plasmidin beta-galaktosidaasi-geenin koodittamaa vastaavaa entsyymiä. Induktion jälkeen putkiin lisätään tolueenia 10 %:ksi, jonka tarkoituksena oli tehdä bakteerien soluseinästä ONPG-kemikaalia läpäiseväksi. Beta-galaktosidaasi-entsyymi muodostaa ONPG-kemikaalin kanssa reagoidessaan aallonpituudella 420 nm mitattavan keltaisen värin. Tämän jälkeen putket sentrifugoitiin ja mitattiin liuoksen absorbanssi 420 nm:ssä. Kuvassa 15 on esitetty kloramfenikolin vaikutus menetelmässämme, kun määritettävänä proteiinina oli beta-galaktosidaasi ja sen substraatin tuottama värillinen lopputuote.

Taulukko 1

Yleisesti käytettyjä antibiootteja ja niiden vaikutuskohdat:

30

<u>Soluseinät</u>	<u>Proteiinisynteesi</u>	<u>Nukleiinihapposynteesi</u>
Penisilliinit	Kloramfenikoli	Nalidiksiinihappo
Kefalosporiinit	Tetrasykliinit	Nobobiosiini
Basitراسيini	Aminoglykosidit	Rifamysiinit
35 Vankomysiini	Makrolidit	Phleomysiini
Polymyksiinit	Erytromysiini	Mithramysiini
Gramisidiinit	Linkomysiini	Aktinomysiini
Valinomysiini	Puromysiini	Kinolonit

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä yksisoluiiseen organismiin, kuten esimerkiksi mikrobi- tai hiivasoluun, vaikuttavan tekijän määrittämiseksi, joka tekijä vaikuttaa suoraan tai epäsuorasti solun
5 DNA:han, RNA:han ja/tai proteiineihin tai näiden synteetikoneistoihin, tunnettu siitä, että

a) soluun siirretään yhdistelmä-DNA-plasmidi, jonka replikaatiosta vastaavan monistuskoneiston aloituskohta tai -kohdat ovat säädeltävissä olevan promoottorin alaisuudessa,
10 jota voidaan kontrolloida joko positiivisella tai negatiivisella palautteella;

b) yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämä solu saatetaan kosketukseen vaikuttavan tekijän kanssa, esimerkiksi inkubamalla näitä yhdessä;

c) vaikuttavan tekijän annetaan vaikuttaa yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämään soluun sopivan ajan, minkä jälkeen
20 yhdistelmä-DNA-plasmidin replikaatiosta vastaavan monistuskoneiston aloituskohtaa säätelevä promoottori aktivoidaan, jolloin plasmidin kopioluku alkaa kasvaa solussa, mikäli vaikuttava tekijä ei ole vaikuttanut plasmidin replikoitumista estävästi;

25 d) yhdistelmä-DNA-plasmidin kopioluvun muutos solussa määritetään suoraan tai epäsuorasti;

e) kopiolukua verrataan vertailukokeeseen, jossa vaikuttavaa tekijää ei ollut läsnä ja/tai sitä oli tunnettu määrä reaktiossa, jolloin vaikuttavan tekijän läsnäolo ja/tai määrä saadaan määritettyä.
30

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidi sisältää DNA-jakson, joka
35 koodaa yhtä tai useampaa valikoitua viruksen, prokaryoottisolun tai eukaryoottisolun valkuaisainetta tai sen biologisen aktiivisuuden kannalta olennaista osaa ja plasmidissa

voi olla yksi tai useampia DNA-jaksoja, jotka tekevät solun vastustuskykyiseksi antibiootteja, raskasmetalleja ja/tai toksiineja vastaan.

5 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valkuaisainetta koodaava DNA-jakso on säädeltävissä olevan promoottorin alaisuudessa, joka on kontrolloitu positiivisella tai negatiivisella palautteella ja on säädeltävissä käytettävässä mikrobisolussa sekä aktivoidaan samankaltaisesti tai haluttuna hetkenä sen jälkeen, kun plasmidin replikaation aloituskohtaa säätelevä promoottori aktivoidaan.

15 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määritettävä tekijä on yhdistelmä-DNA-plasmidin DNA:n biosynteesiin tai replikaatioon, RNA:n biosynteesiin, transkriptioon, translaatioon, solukalvoihin, metaboliaan tai entsyymiaktiivisuuteen vaikuttava tekijä kuten esimerkiksi aflatoksiinit, raskasmetallit, etidiumbromidi, nalidiksiinihappo, trimetopriimi, fluorokinolonit, aminoglykosidit, penisilliinit, kefalosporiinit, rifampisiini, kloramfenikoli, tetrasykliinit, sulfonamidit ja käytettävä solu on määritettäville antibiooteille herkkä.

25 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että solu on Escherichia coli ja bakteerin sisältämän yhdistelmä-DNA-plasmidin replikaatiosta vastaavaa monistuskoneistoa voidaan tarkasti säädellä voimakkaan promoottorin avulla, kuten esimerkiksi lambda P_L- ja lac-promoottorit.

30

6. Menetelmä soluun vaikuttavan tekijän määrittämiseksi, joka tekijä vaikuttaa suoraan tai epäsuorasti solun DNA:han, RNA:han ja/tai proteiineihin tai näiden synteesikoneistoihin, tunnettu siitä, että

35

a) soluun siirretään yhdistelmä-DNA-plasmidi, joka on solussa useana kopiona ja plasmidi sisältää markkeriproteiinin viruksen, prokaryoottisolun tai eukaryoottisolun valkuais-

ainetta tai sen biologisen aktiivisuuden kannalta olennaista osaa koodaavan DNA-jakson, jonka ilmentyminen on säädeltävissä olevan promoottorin alaisuudessa ja on kontrolloitu joko negatiivisella tai positiivisella palautteella;

5

b) yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämä solu saatetaan kosketukseen vaikuttavan tekijän kanssa, esimerkiksi inkuboimalla näitä yhdessä;

- 10 c) vaikuttavan tekijän annetaan vaikuttaa yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämään soluun sopivan ajan, jonka jälkeen yhdistelmä-DNA-plasmidin markkeriproteiinin ilmentymistä kontrolloiva säädeltävä promoottori aktivoidaan, jolloin markkeriproteiinin määrä solussa alkaa kasvaa, mikäli vai-
- 15 kuttava tekijä ei ole vaikuttanut suoraan tai välillisesti proteiinisynteesiin;

d) yhdistelmä-DNA-plasmidin sisältämän markkeriproteiinin muutos mitataan;

20

e) markkeriproteiinin määrää verrataan vertailukokeeseen, jossa vaikuttavaa tekijää ei ollut läsnä ja/tai sitä oli tunnettu määrä reaktiossa, jolloin vaikuttavan tekijän läsnäolo ja/tai määrä saadaan määritettyä.

25

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että solu on gramnegatiivinen tai grampositiivinen bakteeri kuuluen ryhmään Enterobacteriaceae, edullisesti Escherichia coli tai ryhmään Bacillus, edullisesti Bacillus

30 subtilis.

30

8. Patenttivaatimusten 1-3, 6 tai 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että promoottorin säätelytekijöitä tuotetaan joko isäntäsolun kromosomaalisesta DNA:sta, solussa olevasta

35 toisesta eri inkombatibiliteettiluokkaan kuuluvasta plasmidista, samasta plasmidista, lyyttisestä tai lysogeenisestä faagista tai viruksesta tai säätelytekijöitä lisätään solu-

35

jen ulkopuolelta kuten esimerkiksi kemiallisia yhdisteitä lisäämällä, lämpötilaa muuttamalla tai säteilyttämällä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidissa voi olla yksi tai useampia DNA-jaksoja, jotka tekevät solun vastustuskykyiseksi antibiootteja, raskasmetalleja ja toksineja vastaan.

10. Patenttivaatimuksen 1 tai 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että tutkittava näyte on nestemäisessä tai kiinteässä muodossa tai näyte sisältää radioaktiivista säteilyä tai ultraviolettisäteilyä.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solut ovat kylmäkuivattuja ja ne rehydroidaan ennen määrittystä sopivalla puskurilla tai kasvatusliuoksella.

12. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaikuttava tekijä on yhdistelmä-DNA-plasmidin DNA:n biosynteesiin, RNA:n biosynteesiin, transkriptioon, translaatioon, solukalvoihin tai metaboliaan vaikuttava tekijä kuten mutageenit, antibiootit, raskasmetallit tai toksinit.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solu on *Bacillus subtilis*.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidissa oleva markkeriproteiini on säädeltävissä olevan vahvan promoottorin, kuten $\phi 105:n$, alaisuudessa sekä markkeriproteiini on alfa-amylaasi, alkalinen fosfataasi tai lusiferaasi.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että solu on *Escherichia coli*.

16. Patenttivaatimuksen 5 tai 15 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidi sisältää DNA-jakson, joka koodaa viruksen, prokaryoottisolun tai eukaryoottisolun valkuaisainetta tai sen biologisen aktiivisuuden kannalta olennaista osaa siitä ja proteiinin ilmentymistä voidaan kontrolloida säädeltävän promoottorin, kuten esimerkiksi lac tai lambda P_L, avulla.
17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valkuaisaine on lusiferaasi, beta-galaktosidaasi, alkalinen fosfataasi, peroksidaasi tai T4-lysotsyymi.
18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidi koodaa Vibrio harveyin lusiferaasia tai muuta bakteerilusiferaasia.
19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että yhdistelmä-DNA-plasmidi on plasmidi pCSS112.
20. Jonkin patenttivaatimuksen 17-19 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että aldehydiä lisätään reaktioon mitattaessa ekspressoituneen lusiferaasientsyymin määrää bakteerissa.
21. Patenttivaatimuksen 4 tai 12 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että määrittäminen tehdään maidosta, seerumista tai vesistä.

Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av en faktor, som inverkar på en encellig organism, såsom till exempel en mikrob- eller jästcell, vilken faktor inverkar direkt eller indirekt på cellens DNA, RNA och/eller proteiner eller deras syntesmekanismer, **kännetecknat** av att

a) intill cellen införs en rekombinant-DNA-plasmid, vars initiationsställe eller -ställena av dupliceringsmekanism ansvarig för replikationen är avhängiga av en reglerbar promotor, som kan kontrolleras antingen med en positiv eller en negativ feedback;

b) cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden bringas i kontakt med en effektiv faktor, till exempel genom att inkubera dem tillsammans;

c) den effektiva faktorn får inverka på cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden för en lämplig tid, varefter promotorn, som reglerar initiationsstället av dupliceringsmekanismen ansvarig för rekombinant-DNA-plasmidens replikation aktiveras, varvid plasmidens kopital börjar öka i cellen, om den effektiva faktorn inte har inverkat på ett hindrande sätt på plasmidens replikation;

d) ändring av rekombinant-DNA-plasmidens kopital i cellen bestäms direkt eller indirekt;

e) kopitalet jämförs med ett kontrollprov, vari ingen effektiv faktor var närvarande och/eller den fanns i en känd mängd i reaktionen, varvid närvaron och/eller mängden av den effektiva faktorn kan bestämmas.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att rekombinant-DNA-plasmiden innehåller en DNA-sekvens, som kodar en eller flera selektiva proteiner eller en för biologisk aktivitet väsentlig del därav av en virus, prokariotcell eller eukariotcell och plasmiden kan innehålla en eller

flera DNA-sekvenser, som gör cellen resistent mot antibiotika, tungmetaller och/eller toxiner.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** av att
5 DNA-sekvensen som kodar proteinet är avhängig av en reglerbar promotor, som kontrolleras antingen med en positiv eller en negativ feedback och är reglerbar i använda mikrobcellen samt aktiveras samtidigt eller på önskad tidpunkt efter aktiveringen av promotorn som reglerar initiationsstället av
10 replikationen.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** av att faktoren som skall bestämmas är en faktor som inverkar på rekombinant-DNA-plasmidens DNA biosyntes eller replikation,
15 RNA-biosyntes, transkription, translation, cellmembraner, metabolism eller enzymaktivitet, såsom till exempel aflatoxiner, tungmetaller, etidiumbromid, nalidixinsyra, trimetoprim, fluorokinoloner, aminoglykosider, penicilliner, kefalosporiner, rifampicin, kloramfenikol, tetracykliner, sulfonamider och den använda cellen är sensitiv mot de bestämda antibiotika.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, **kännetecknat** av att cellen är Escherichia coli och dupliceringsmekanismen ansvarig för rekombinant-DNA-plasmidens replikation i bakterie
25 kan strängt regleras med en kraftig promotor, såsom lambda P_L- och lac-promotorer.

6. Förfarande för bestämning av en faktor som inverkar på
30 en cell, vilken faktor inverkar direkt eller indirekt på cellens DNA, RNA och/eller proteiner eller deras syntesmekanismer, **kännetecknat** av att

a) intill cellen införs en rekombinant-DNA-plasmid, som
35 finns i cellen på flera kopior och plasmiden innehåller som markerprotein en DNA-sekvens, som kodar ett protein eller en för biologisk aktivitet väsentlig del därav av en virus, prokariotcell eller eukariotcell, vilken DNA-sekvens är av-

hångiga av en reglerbar promotor och är kontrollerad antingen med en positiv eller en negativ feedback;

5 b) cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden bringas i kontakt med en effektiv faktor, till exempel genom att inkubera dem tillsammans;

10 c) den effektiva faktorn får inverka på cellen innehållande rekombinant-DNA-plasmiden för en lämplig tid, varefter den reglerbara promotorn, som kontrollerar expression av rekombinant-DNA-plasmidens markerprotein aktiveras, varvid markerproteinets mängd börjar öka i cellen, om den effektiva faktorn inte har inverkat direkt eller indirekt på proteinsyntesen;

15 d) ändring av markerproteinet i rekombinant-DNA-plasmiden mäts;

20 e) markerproteinets mängd jämförs med ett kontrollprov, varingen effektiv faktor var närvarande och/eller den fanns i en känd mängd i reaktionen, varvid närvaron och/eller mängden av den effektiva faktorn kan bestämmas.

25 7. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 6, **kännetecknat** av att cellen är en gramnegativ eller grampositiv bakterie som hör till gruppen Enterobacteriaceae, företrädesvis Escherichia coli eller till gruppen Bacillus, företrädesvis Bacillus subtilis.

30 8. Förfarande enligt patentkraven 1-3, 6 eller 7, **kännetecknat** av att promotorns regleringsfaktorer produceras utav värdcellens kromosomala DNA, utav en andra till en annan inkompatibilitetsklass hörande plasmid i cellen, utav densamma plasmiden, utav en lytisk eller lysogenisk fag eller virus eller regleringsfaktorer tillsätts utifrån celler
35 såsom till exempel genom tillsättning av kemiska föreningar, förändring av temperaturen eller genom strålning.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, **kännetecknat** av att rekombinant-DNA-plasmiden kan innehålla en eller flera DNA-sekvenser, som gör cellen resistent mot antibiotika, tungmetaller och/eller toxiner.

5

10. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 6, **kännetecknat** av att provet som skall undersökas är i en flytande eller fast form eller provet innehåller radioaktiv strålning eller ultraviolettstrålning.

10

11. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 6, **kännetecknat** av att cellerna är lyofiliserade och de rehydreras före bestämningen med en lämplig buffert eller odlingslösning.

15

12. Förfarande enligt patentkravet 6, **kännetecknat** av att den effektiva faktorn är en faktor som inverkar på rekombinant-DNA-plasmidens DNA-biosyntes, RNA-biosyntes, transkription, translation, cellmembraner eller metabolism, såsom mutagener, antibiotika, tungmetaller eller toxiner.

20

13. Förfarande enligt patentkravet 12, **kännetecknat** av att cellen är *Bacillus subtilis*.

25

14. Förfarande enligt patentkravet 13, **kännetecknat** av att markerproteinet i rekombinant-DNA-plasmiden är avhängig av en reglerbar stark promotor, såsom ϕ_{105} , och markerproteinet är en alfa-amylas, alkalisk fosfatas eller luciferas.

30

15. Förfarande enligt patentkravet 12, **kännetecknat** av att cellen är *Escherichia coli*.

35

16. Förfarande enligt patentkravet 5 eller 15, **kännetecknat** av att rekombinant-DNA-plasmiden innehåller en DNA-sekvens, som kodar ett protein eller en för biologisk aktivitet väsentlig del därav av en virus, prokariotcell eller eukariotcell, och proteinets expression kan kontrolleras med en reglerbar promotor, såsom till exempel lac eller lambda P_L .

17. Förfarande enligt patentkravet 16, **kännetecknat** av att proteinet är luciferas, beta-galaktosidas, alkalisk fosfat, peroksidas eller T4-lysozym.

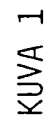
5 18. Förfarande enligt patentkravet 17, **kännetecknat** av att rekombinant-DNA-plasmiden kodar luciferas av Vibrio harvey eller en annan bakterieluciferas.

10 19. Förfarande enligt patentkravet 18, **kännetecknat** av att rekombinant-DNA-plasmiden är plasmiden pCSS112.

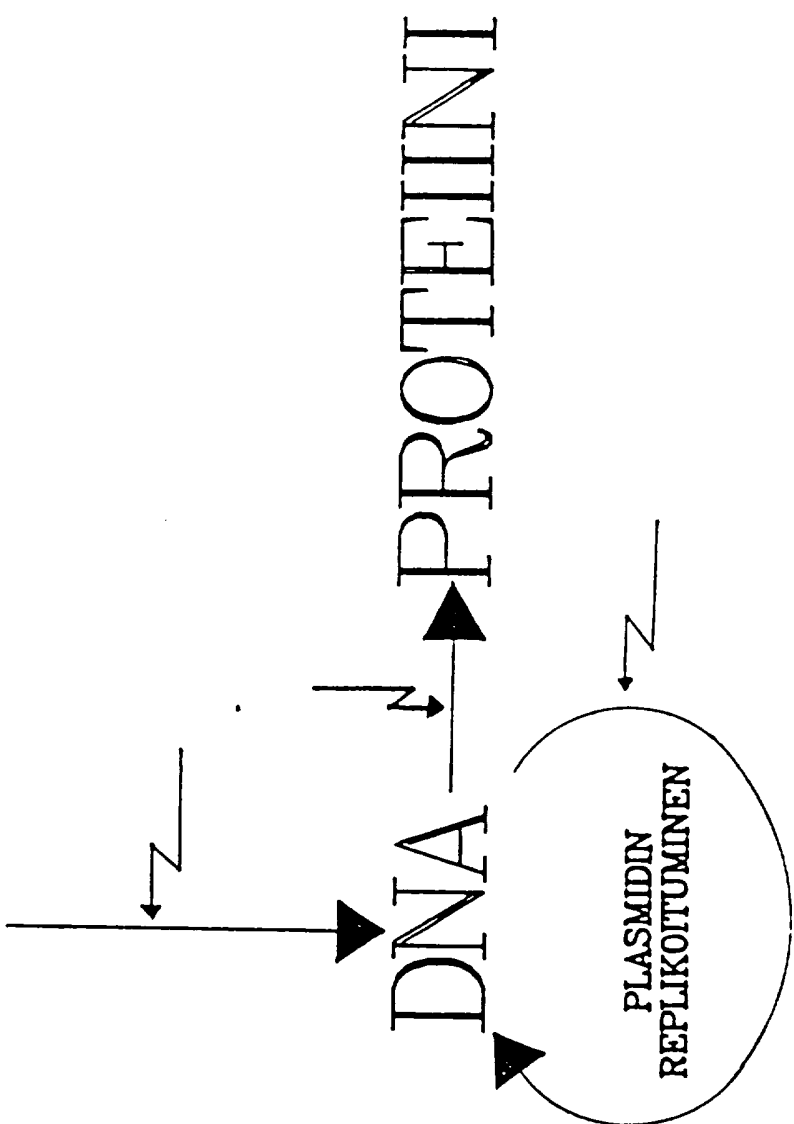
20. Förfarande enligt något av patentkraven 17-19, **kännetecknad** av att aldehyd tillsätts till reaktionen när mängden av det uttryckta luciferasenzymet i bakterien mäts.

15

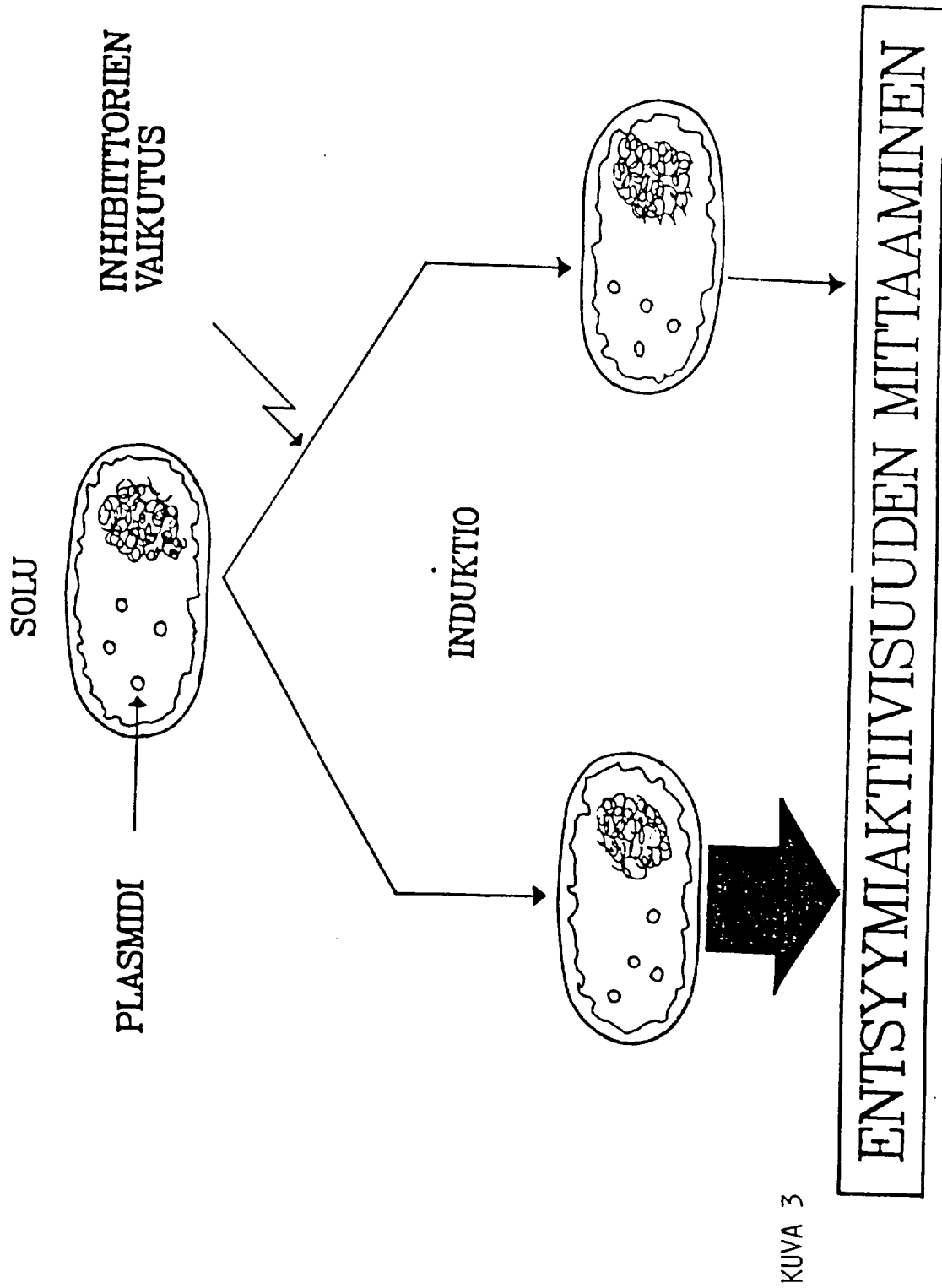
21. Förfarande enligt patentkravet 4 eller 12, **kännetecknat** av att bestämningen görs utav mjölk, serum eller vatten.



DEOKSIRIBONUKLEOTIDI-
TRIFOSFAATTIEN
BIOSYNTHEESI



KUVA 2

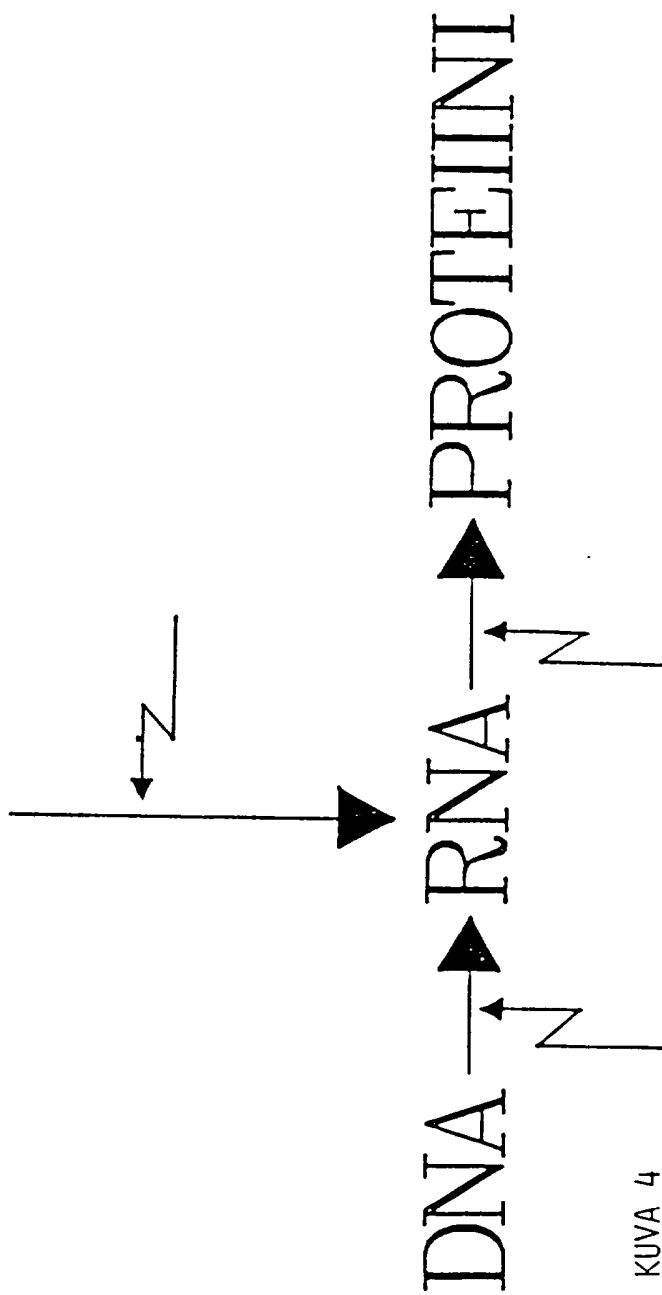


KUVA 3

000000 001000

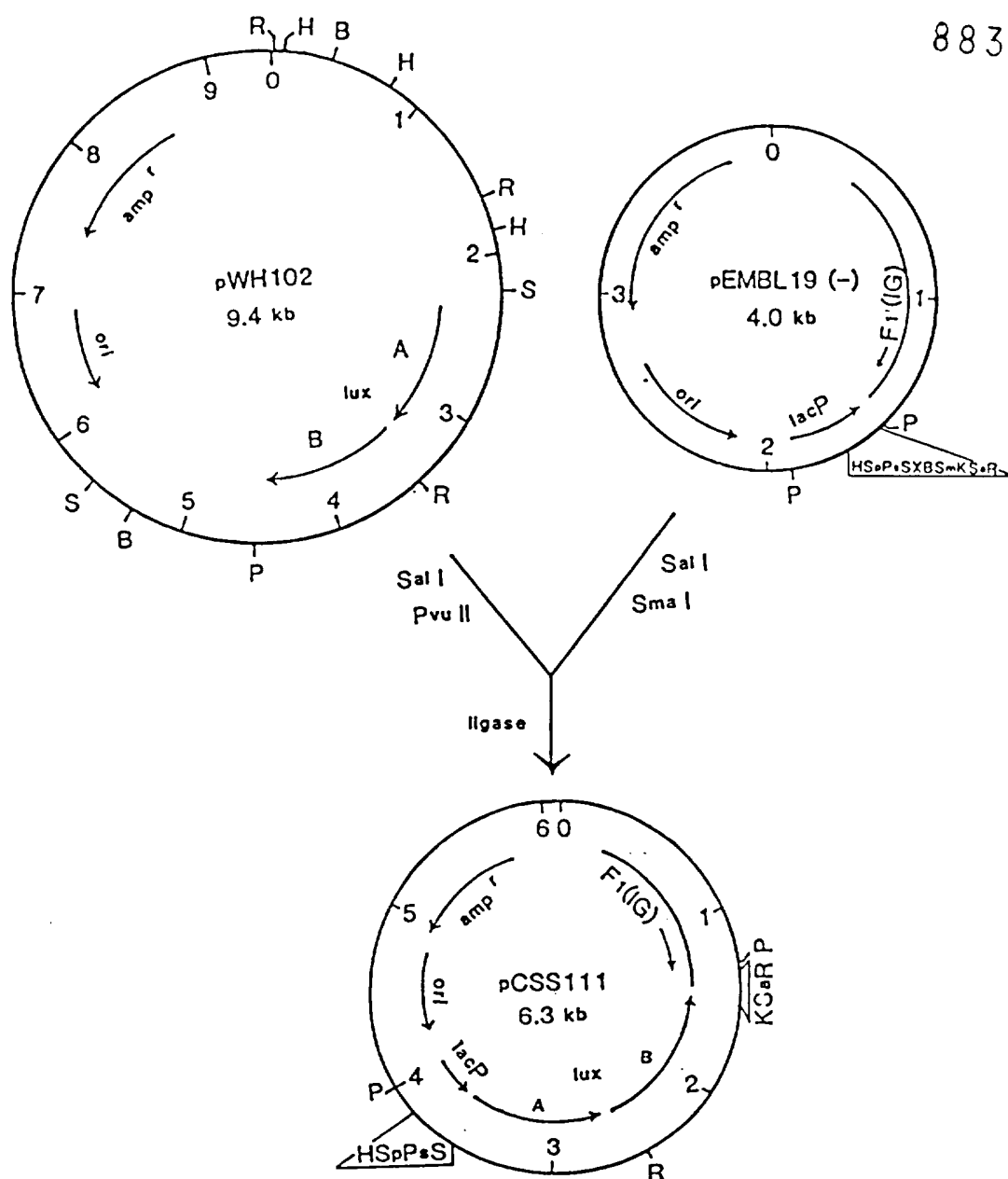
88309

RIBONUKLEOTIDI-
TRIFOSFAATTIEN
BIOSYNTTEESI



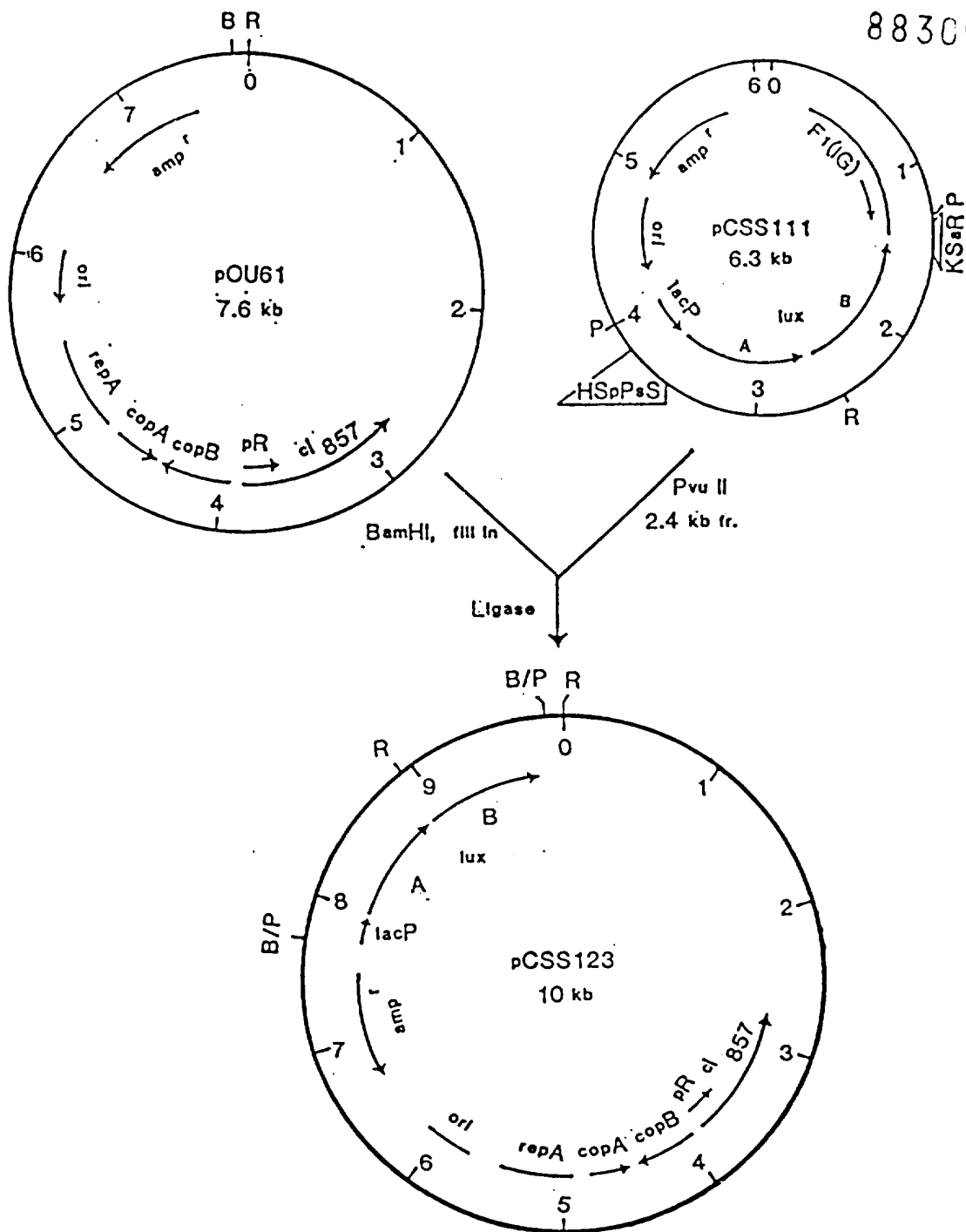
KUVA 4

88309



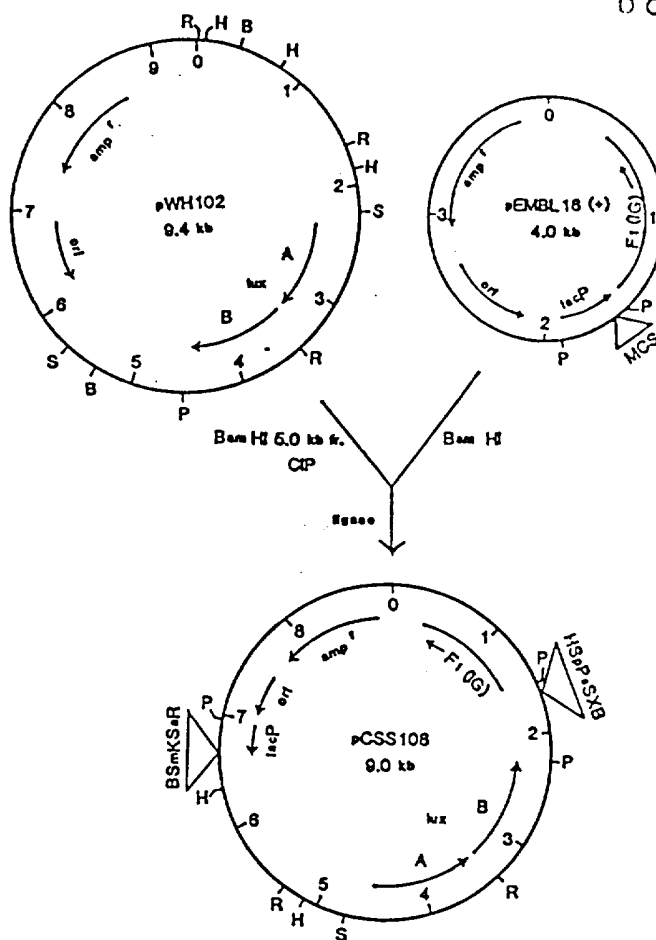
KUVA 5A

88309



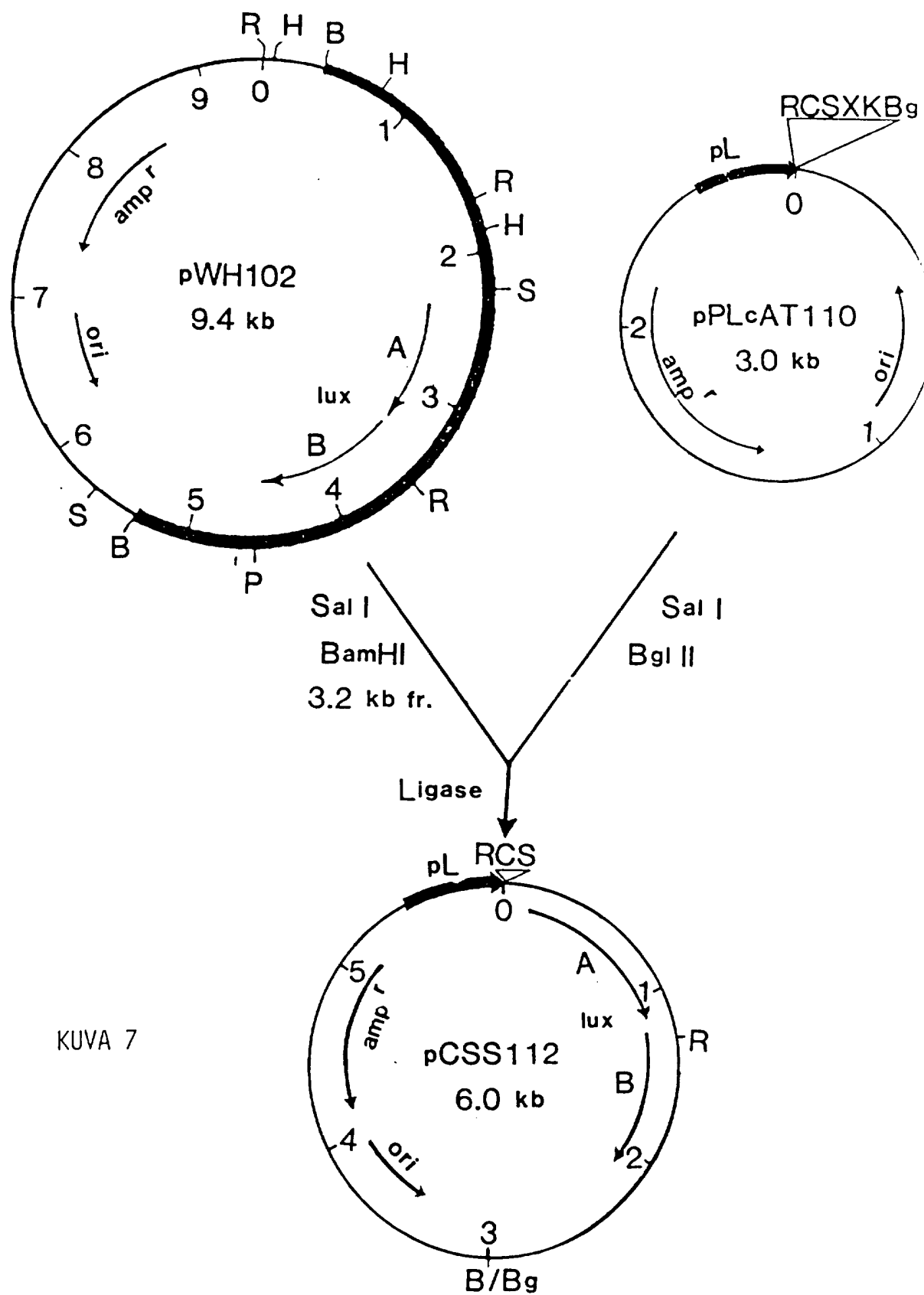
KUVA 5B

88309



KUVA 6

88309



KUVA 7

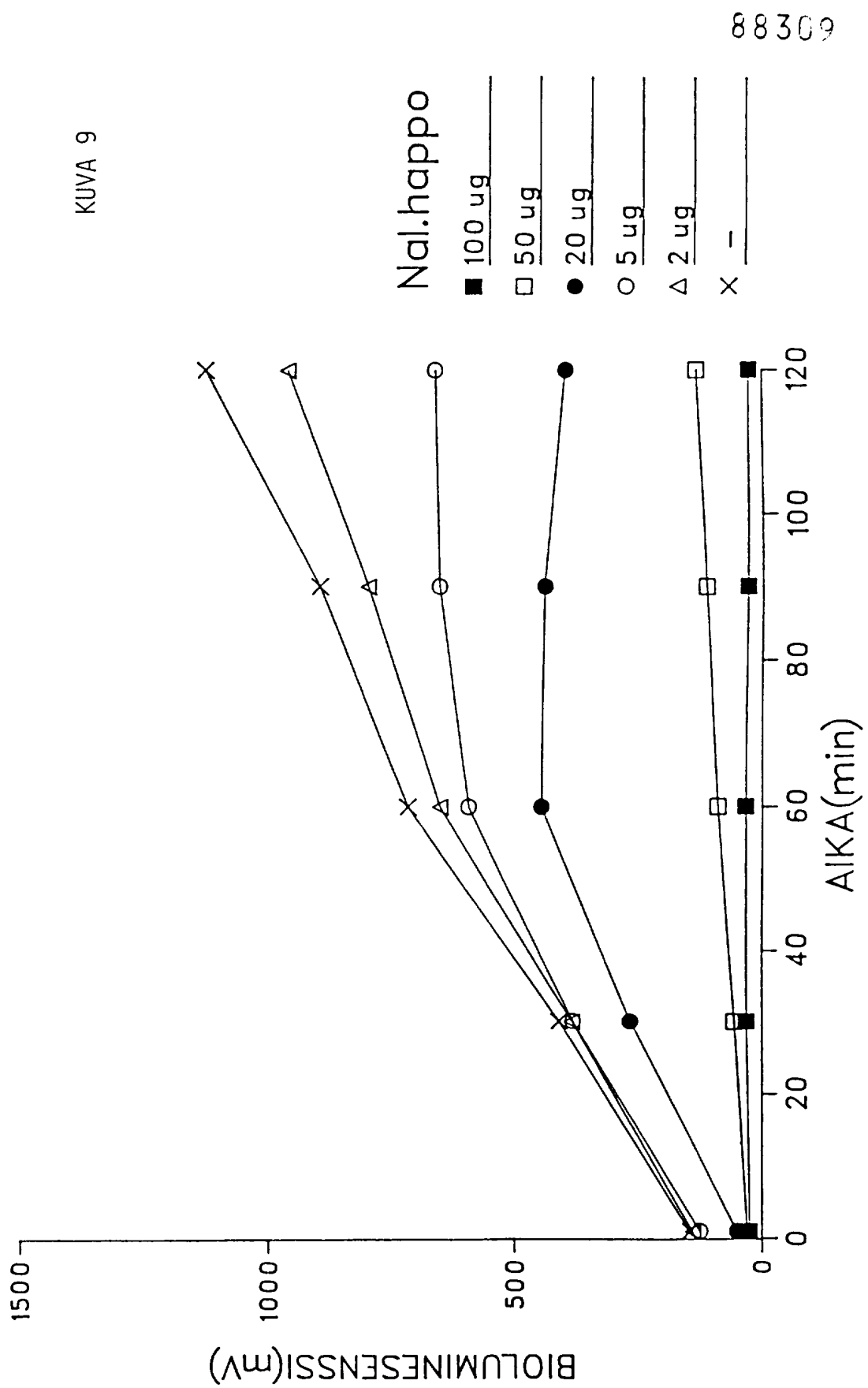
	ind	ind	ind	ind	ind	ind
K1	0	0	0	1	1	1
	ind	ind	ind	ind	ind	ind
K2	10	10	10	10	10	10
	ind	ind	ind	ind	ind	ind
K3	100	100	100	100	100	100
	ind	ind	ind	ind	ind	ind
K4	100	100	100	100	100	100



K1, kontrolliplasmidi pUC19	800 ng
K2	400 ng
K3	200 ng
K4	80 ng
O, kytkemätön pCSS123,	nalidiksiinihappo 0 ug ml:ssa
O ind, kytketty	
1, kytkemätön pCSS123,	nalidiksiinihappo 1 ug ml:ssa
1 ind, kytketty	
10, kytkemätön pCSS123,	nalidiksiinihappo 10 ug ml:ssa
10 ind, kytketty	
100, kytkemätön pCSS123,	nalidiksiinihappo 100 ug ml:ssa
100 ind, kytketty	

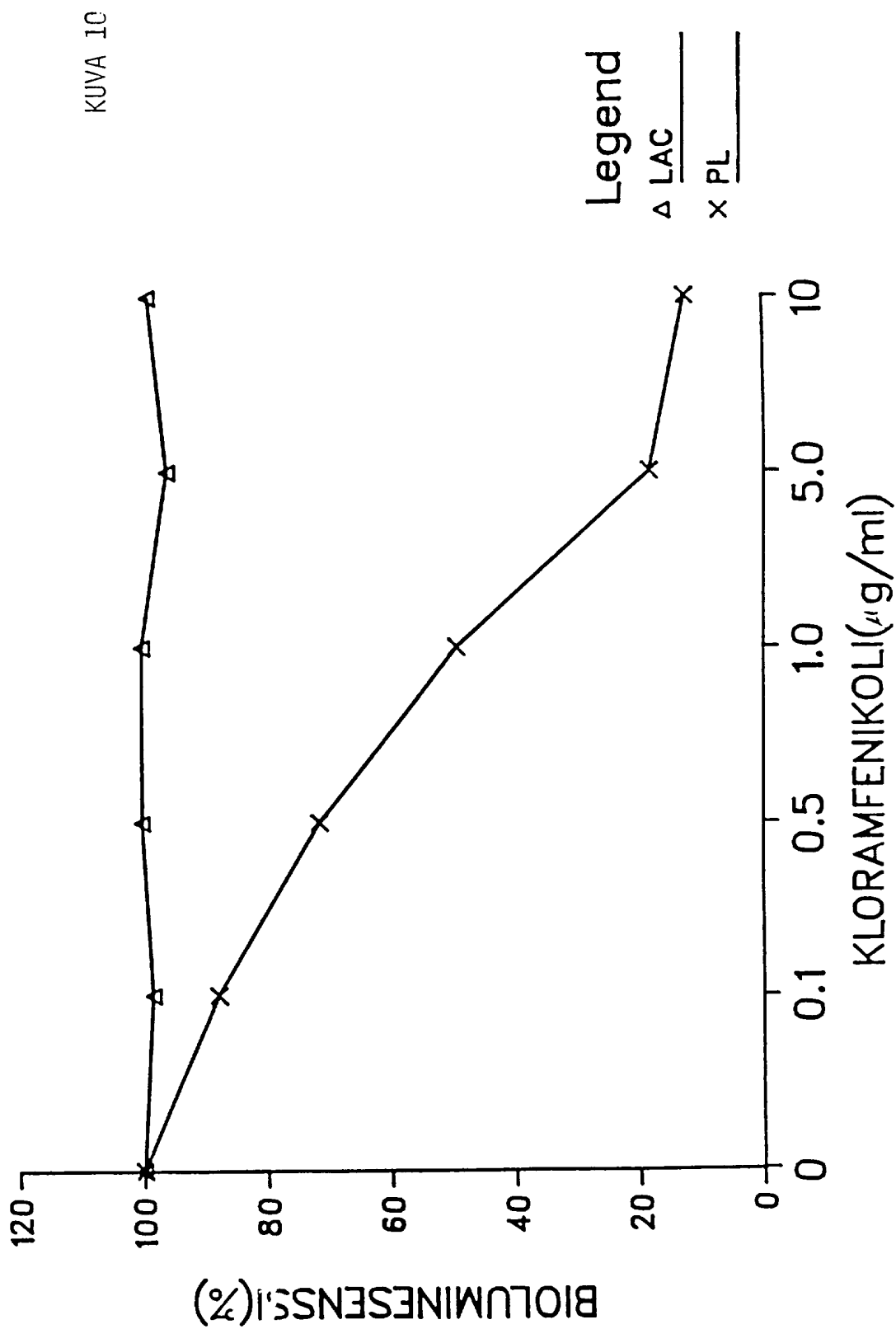
88309

2004-08 091809

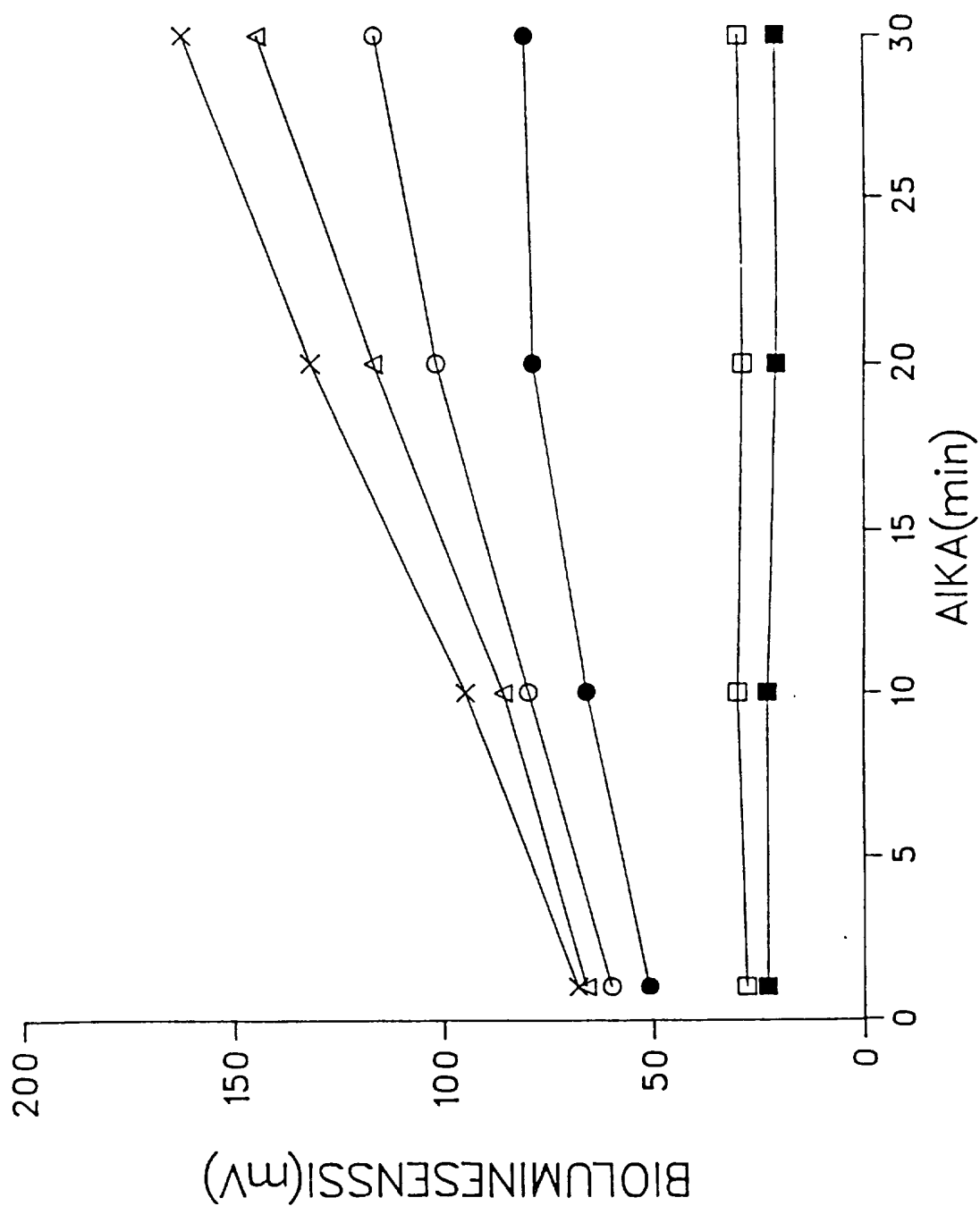


0000408 881888

88309



0000488 091009



KUVA 11

88309

Figure 1 is a line graph showing the time course of bioluminescence (mV) versus ALKA (min) for various bacterial strains. The y-axis is logarithmic, ranging from 100 to 10,000 mV. The x-axis is linear, ranging from 0 to 40 minutes. Six data series are plotted: (●) *B. subtilis*, (○) *B. subtilis*, (□) *B. subtilis*, (■) *B. subtilis*, (△) *B. subtilis*, and (×) *B. subtilis*. All strains show a rapid increase in bioluminescence, reaching a plateau between 10 and 20 minutes.

ALKA (min)	(●) <i>B. subtilis</i> (mV)	(○) <i>B. subtilis</i> (mV)	(□) <i>B. subtilis</i> (mV)	(■) <i>B. subtilis</i> (mV)	(△) <i>B. subtilis</i> (mV)	(×) <i>B. subtilis</i> (mV)
0	100	100	100	100	100	100
10	1000	1000	1000	1000	1000	1000
20	10000	10000	10000	10000	10000	10000
30	10000	10000	10000	10000	10000	10000
40	10000	10000	10000	10000	10000	10000

Oksitetrasykliini

10 ug

595

199

0511

100

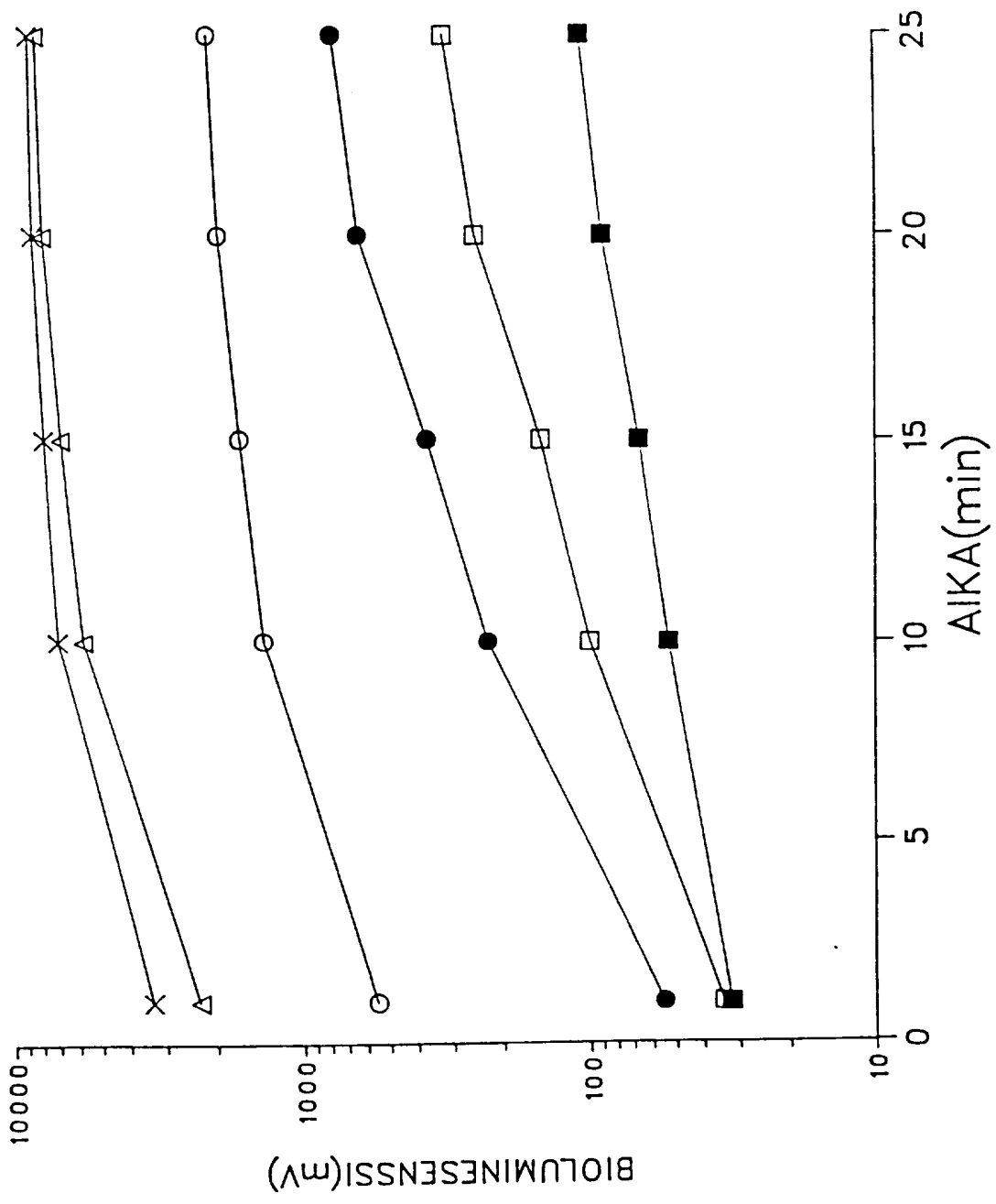
 $\Delta 0.10$
$$\frac{X}{0.050}$$

—

KUVA 14

Sulfiitti

- 8 mM
- 6 mM
- 4 mM
- 2 mM
- △ 1 mM
- X -



KIUVA 15

