

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

197352

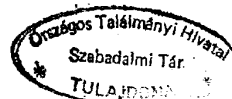
Bejelentés napja: (22) 1985.08.08. (21) (3068/85)

Elsőbbsége: (32) 1984.08.10.
(31) (639.566)
(33) US

Közzététel napja: (41) (42) 1986.05.28.

Megjelent: (45) 1990.01.10.

Nemzetközi
osztályozás:
(51) NSZ04
C 12 N 15/00



Feltalálók: (72)

Hershberger Charles Lee, New Palestine, Indiana,
Larson Jeffrey Lynn, Indianapolis, Indiana,
US

Szabadalmas: (73)

Eli Lilly and Company, Lilly
Corporate Center, Indianapolis,
Indiana, US

**(54) ELJÁRÁS pJL 210 PLAZMID ÉS MÁS, EZZEL
ÖSSZEFÜGGŐ KÉTFUNKCIÓS KLÓNOZÓ VEKTOROK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA, STREPTOMYCETESBEN VALÓ
ALKALMAZÁSHOZ**

1

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás mérsékeltén nagy kópiaszámú rekombináns DNS klónozó vektor előállítására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy a.) pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó restrikciós fragmensének egy mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I kiindulását és b.) egy vagy több olyan DNS szegmenst, amely legalább egy antibiotikumra ad át rezisztenciát, amikor érzékeny, restrikció nélküli gazdasejtre visszük át, egyesítünk.

197352

A jelen találmány tárgyai kiválasztható új, mérsékelten nagy kópiaszámú rekombináns DNS klónozó vektorok, amelyek pJL 129 plazmid replikációt tartalmazó restrikciós fragmensének mintegy 2,5 kb méretű KpnI eredőjét és egy vagy több olyan DNS szegmenst tartalmaznak, amelyek rezisztenciát visznek át legalább egy antibiotikumra, amikor transzformálják ezeket érzékeny, restrikció nélküli gazdasejtbe. A vektorok tartalmaznak egy mutáns Streptomyces replikont, amely növeli a mutáns replikont tartalmazó plazmidok kópiaszámát a pJL 192-ben levő vad típusú replikont tartalmazó plazmidokhoz képest. A találmány tárgyai továbbá azok a transzformánsok is, amelyek a fentebb említett vektorokat tartalmazzák.

A kiválasztható és mérsékelten nagy kópiaszámú plazmidok (kb. 50 kópia sejtenként) Streptomycesben és rokon gazdasejtben alkalmazhatók. Eddig a rekombináns DNS technika fejlődése és kimunkálása Streptomycesben gátolt volt és különleges nehézségeket okozott a mérsékelten nagy kópiaszámú vektorok általános hiánya miatt. Korábban nagyon nagy, több száz kópia/sejt kópiaszámú vektorok és kis, 1-5 kópia/sejt kópiaszámú vektorok álltak rendelkezésre. A mérsékelten nagy kópiaszámú plazmidok megjelenése olyan eszközt ad, amelynek segítségével az ezeken a mérsékelten nagy kópiaszámú plazmidokon hordozott gének által kódolt fehérjék kitermelése megnövekedett, amikor összehasonlítjuk a kis kópiaszámú plazmidokon hordozott génekből való kifejeződés szintjével. Így a mérsékelten nagy kópiaszámú plazmidok előnyösek gyengén átitrt vagy átfordított Streptomycesbe klónozott gének kifejeződésének nyeresésében a halálos kifejeződés problémái nélkül, amelyek előfordulhatnak nagyon nagy kópiaszámú plazmidokkal. A jelen találmány szerinti vektorok mérsékelten nagy kópiaszámúban léteznek, és működőképesek és kiválaszthatók mind Streptomycesben, mind más gazdasejtben és ezért jelentős előnyt mutatnak a technika eddigi állásához képest.

Ezek a vektorok különösen hasznosak, mivel ezek viszonylag kicsik, sokoldalúak és képesek transzformálni és kiválasztódni bármely Streptomyces sejtben, amely olyan antibiotikumra érzékeny, amelyhez a rezisztencia átvihető és ahol a mutáns replikon kielégítő információt nyújt az önreplikációhoz. Mivel a természetben előforduló antibiotikumok több, mint 70 százalékát Streptomyces törzsek termelik, kívánatos kifejleszteni olyan klónozó rendszert és vektorokat, amelyek alkalmazhatók ehhez az iparilag fontos csoporthoz. A jelen találmány ilyen vektorokat nyújt és így lehetővé teszi gének klónozását Streptomycesbe mind az ismert antibiotikumok kitermelésének növelése, mind új antibiotikumok és antibiotikum-származékok termelése érdekében.

A vektorok hordozókat is nyújtanak a DNS klónozásához Streptomyces gazdasejtbe és lehetővé teszik a transzformánsok kényelmes kiválasztását. Mivel a transzformáció nagyon kis gyakoriságú esemény, egy ilyen működési vizsgálat gyakorlati szükségesség annak meghatározásában, mely sejtek a sejtek billiói közül fogadták be a plazmid DNS-t. Ez fontos, mivel a DNS szekvenciák, amelyek önmagukban nem szelektálhatók, beiktathatók a vektorokba, és a vektort és különösen a szóban forgó DNS szekvenciát tartalmazó sejteket transzformáció esetén megfelelő fenotípusos szelekcióval izolálni lehet.

A jelen találmány céljaira, ahogyan ezt a leírás későbbi részében és az igénypontokban használjuk, a következő kifejezéseket határozzuk meg.

- Rekombináns DNS klónozó vektor - bármilyen függetlenül replikálódó ágens (beleértve a plazmidokat is, de nemcsak ezekre korlátozva), amely egy olyan DNS molekulát tartalmaz, amelyhez egy vagy több további DNS szegmenst lehet hozzáadni vagy adtak hozzá.

- Transzformálás - DNS bevezetése egy befogadó gazdasejtbe, amely DNS megváltoztatja a genotípust és az következőképpen változásokat okoz a befogadó sejtben.

- Transzformáns-befogadó gazdasejt, amely a transzformálásnak alá volt vetve.

- Érzékeny gazdasejt - olyan gazdasejt, amely nem nő egy adott antibiotikum jelenlétében egy olyan DNS nélkül, amely átruhazza neki a rezisztenciát.

- Restrikciós fragmens - bármilyen lineáris DNS, amely egy vagy több restrikciós enzim működése révén alakult ki.

- Beiktatási izomer - a két vagy több lehetséges rekombináns DNS molekula egyike, amely molekulák akkor keletkeznek, amikor egy DNS fragmens van beiktatva a befogadó DNS-en levő két vagy több versengő hely egyikébe, vagy amikor egy DNS fragmens van beiktatva a két reciprok irány egyikébe, amely lehetséges a befogadó DNS egy helyénél.

- Replikon - olyan DNS szekvencia, amely szabályozza és lehetővé teszi a DNS replikációját.

- Replikáció (replikon) E. coli eredetű - olyan DNS szekvencia, amely szabályozza és lehetővé teszi egy plazmid vagy más vektor replikációját E. coliban.

- Replikáció (replikon) Streptomyces eredetű - olyan DNS szekvencia, amely szabályozza és lehetővé teszi egy plazmid vagy más vektor replikációját Streptomycesben.

- Ap^R - az ampicillin-rezisztens fenotípus.

- Tc^S - a tetraciklin-érzékeny fenotípus.

- Nm^R - a neomicin-rezisztens fenotípus

- Ts^R - a tiosztrepton-rezisztens fenotípus
- kb - kilobázis, vagyis 1000 nukleotid-pár

A továbbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A mérsékelt nagy kópiaszámú rekombináns DNS klónozó vektor a következőkből áll.

a.) a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó restriktív fragmensének mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I kiindulásából;

b.) egy vagy több DNS szegmensből, amelyek egy vagy több antibiotikumra való ellenállást szállítanak, amikor transzformálják ezeket az érzékeny, restriktív nélküli gazdaszövetbe.

A találmány továbbá magában foglalja a fentebb említett vektorok transzformánsait is.

A jelen találmány szerinti vektorokat úgy alkotjuk meg, hogy egy vagy több antibiotikum-rezisztenciát átruházó DNS szegmenst ligálunk (vagyis összekapcsolunk) a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó restriktív fragmensének mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I kiindulásával. Az így létrejött vektort lehet azután ligálni egy *E. coli* plazmid egy replikációt tartalmazó és antibiotikum-rezisztenciát átruházó funkcionális kiindulásával, olyan önreplikáló kétfunkciós vektorokat állítva elő, amelyek kiválaszthatók mind *E. coli*-ban, mind *Streptomyces*-ben.

A pJL 192 plazmidot hagyományosan izolálhatjuk *E. coli* K12 C 600R_k-M₁-/pJL törzsből, amely törzs letétbe van helyezve a Northern Regional Research Laboratory-ban (NRL) (Peoria, Illinois 61604). A törzs a köz rendelkezésére áll, mint a plazmid előnyös forrása és tárolója, az NRL B-15 040 letéti számon. A pJL 192 plazmid restriktív helyeinek térképét a mellékelt rajzokból az 1. ábra mutatja be. A jelen bejelentés céljait az 1. ábra és az összes további rajzok nem mérethelyesen vannak ábrázolva.

Bár a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó fragmenseinek több különböző *Streptomyces*-kiindulását lehet megalkotni, az itt bemutatás céljából példákba szedett fragmenseket azzal a ténnyel lehet jellemezni, hogy mind tartalmazza a mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I restriktív fragmenst. Ez a mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I restriktív fragmens a pJL 192 plazmid teljes *Kpn* I enzim emésztése során keletkezik, és erről úgy találtuk, hogy mérsékelt nagy kópiaszámú (40-50 kópia sejtenként) plazmid-származékot alkot. A pJL 192 plazmid egy mintegy 5,9 kb-s *EcoRI*/*SaI* I replikon fragmenst tartalmaz az SCP2* *Streptomyces*-plazmidból, amely plazmidról ismeretes, hogy kis kópiaszámmal rendelkezik, azaz egy-öt kópia/sejt számmal. Úgy véljük, hogy az SCP2* kópiaszámot ellenőrző, szabályozó szekvencia jelentős mutációt szenvedett a replikációt tartalmazó mintegy

5,9 kb-s *EcoRI*-*SaI* I fragmens SCP2* kiindulásának a mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I restriktív fragmenshez való, jelen találmány szerinti hozzányesése során.

A *Streptomyces*-hez való kívánatos klónozó vektoroknak tartalmaznia kell olyan plazmid replikációs funkciókat, amelyek *Streptomyces*-ben kifejeződnek, valamint két antibiotikum-rezisztencia markert, előnyösen egy restriktív enzim számára egyedi felismerési hellyel minden egyes rezisztencia-markerban. Abból a célból, hogy ideális klónozó vektort alkossunk meg, a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I kiindulását külön-külön egy vagy több antibiotikum-rezisztenciát átadó DNS fragmensekhez ligáljuk (itt bemutatás céljából a pLR2 plazmid tiosztrepton-rezisztencia átadó, mintegy 1,6 kb-s *Bam*HI restriktív fragmensét és a pLR4 plazmid neomicin-rezisztencia átadó, mintegy 3,4 kb-s *Bam*HI restriktív fragmensét adjuk meg), a jelen találmányhoz bemutatásra alkalmas vektorokat képezve. A pLR2 és pLR4 plazmidokat, amelyek a tiosztrepton-, illetve a neomicin-rezisztencia átadó fragmensek forrásai, a 4 416 994 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárgyát képező eljárással alkothatjuk meg. Mind a pLR2, mind a pLR4 plazmidok funkcióképesek *E. coli*-ban, ezért sokszorozhatók és izolálhatók kényelmesen az ezt követő műveletekhez.

A megalkotás kényelmessége és megkönnyítése érdekében a tiosztrepton-rezisztenciát átadó mintegy 1,6 kb-s *Bam*HI fragmenst és a neomicin-rezisztenciát átadó mintegy 3,4 kb-s *Bam*HI fragmenst a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó fragmensének mintegy 2,5 kb-s *Kpn*I kiindulásához ligáljuk, a jelen találmányhoz bemutatásul szolgáló plazmidokat állítva elő. A kívánt rekombináns plazmidokból két orientációjú jöhet létre a beiktatott DNS fragmens orientációjától függően. Így pl. a pLR2 plazmid mintegy 1,6 kb-s fragmensének beiktatása a pJL 192 plazmid mintegy 2,5 kb-s *Kpn*I restriktív fragmensébe a bemutatott pHJL 2200 és pHJL 2201 plazmidokat eredményezi; hasonlóképpen a mintegy 3,4 kb-s *Bam*HI fragmens beiktatása a pHJL 2200-ba a bemutatott pHJL 2202 és pHJL 2203 plazmidokat eredményezi.

Bár az itt példákba szedett tiosztrepton- és neomicin antibiotikum rezisztencia átadó DNS szegmensek a pLR2 illetve pLR4 mintegy 1,6 kb-s, illetve mintegy 3,4 kb-s *Bam*HI restriktív fragmensei, azok, akik a szakterületen jártasak, alkothatnak és használhatnak vagy egyedül, vagy kombinációban további DNS szegmenseket is, amelyek szintén adnak át tiosztreptonre és neomicinre való rezisztenciát. A pLR2 további tiosztreptonátadó DNS szegmensei lehetnek pl. a mintegy 13 kb-s *Pst*II restriktív fragmens, valamint a mintegy 1 kb-s *Bcl*II restriktív fragmens is. A pLR4 plazmid további neomicin-

rezisztencia átadó DNS szegmensei lehetnek pl. a mintegy 3,5 kb-s *Pst* restriktions fragmens és a mintegy 3,4 kb-s *BamHI* restriktions fragmens nagyobbik *SacII-KpnI* fragmens is. Még más DNS szegmensek is alkothatók és alkalmazhatók, amelyek rezisztenciát adnak át azonos vagy különböző antibiotikumokra, mint pl. klóramfenikolra, higromicinre, viomicinre, tilozinra, eritromicinre és hasonlókra. Ezen túl a fentebb leírt antibiotikum-rezisztencia átadó DNS szegmensek különböző működőképes származékai is megalkothatók bizonyos nukleotidok hozzáadásával, elhagyásával vagy helyettesítésével. Ezeknek a származékoknak vagy más antibiotikum rezisztencia átadó DNS szegmenseknek a ligálása az itt példákba szedett antibiotikum rezisztencia átadó DNS szegmensek helyett a mintegy 2,5 kb-s *KpnI* restriktions fragmenshez olyan plazmidokat eredményez, amelyek szintén a jelen találmány oltalmi körén belül vannak.

A jelen *Streptomyces*-ben működő vektorokat, mint pl. a pHJL 2200 és pHJL 2202 plazmidokat ligálni lehet többféle *E. coli* plazmid replikációt tartalmazó és antibiotikum-rezisztencia hordozó restriktions fragmensének működőképes kiindulásához (ilyen *E. coli* plazmidok pl. a pBR322, pBR325 pBR328 és hasonló), ön-replikáció kétfunkciós vektorokat állítva elő, amelyek kiválaszthatók mind *E. coli*-ban, mind *Streptomyces*-ben. Ezek a kétfunkciós konstrukciók a pJL 192 plazmid replikációt tartalmazó fragmensének mintegy 2,5 kb-s *Kpn I* kiindulásából, egy vagy több olyan DNS szegmensből, amely antibiotikum rezisztenciát ad át *Streptomyces*-ben, egy replikonból, amely működőképes *E. coli*-ban, valamint egy olyan DNS szegmensből, amely antibiotikum-rezisztenciát ad át *Streptomyces*-ben, állnak. A jelen találmány bemutatja a pHJL 201 plazmidot, egy kis, mintegy 9,9 kb-s kétfunkciós plazmidot, amely nagyon kevés olyan többlétszerekvenciát tartalmaz, amely nem vesz részt ennek klónozó vektorként való hasznosításában. A pHJL 201 plazmid kívánatos klónozó vektor viszonylag kis méretét, működési konstrukcióját és *BamHI* restriktions helyeinek jelenlétét tekintve, amelyek egyike rendelkezésre áll egy további antibiotikum rezisztencia marker vagy heterológ DNS beiktatásához. Azok, akik a szakterületen jártasak, méltányolni tudják, hogy a pHJL 201 plazmid könnyen kialakítható a pJL 192 plazmid emésztésével.

Ezen kívül az itt példaként felhozott pHJL 201, pHJL 210 és pHJL 211 plazmidok, mint kétfunkciós konstrukciók különösen előnyösek, mivel a plazmidok sokszorozását és manipulálását sokkal gyorsabban és kényelmesebben el lehet végezni *E. coli*-ban, mint *Streptomyces*-ben. Így, miután a kívánt rekombináns DNS eljárásokat *E. coli* gazdaszervezet-rendszeren belül elvégezték, a plazmidokat transzformálni lehet egy *Streptomyces*-

tes gazdasajtbe. Egy másik változat szerint a szóban forgó *Streptomyces* DNS-t el lehet távolítani, újból meg lehet alkotni plazmidformára (ha szükséges), majd egy *Streptomyces* vagy rokon gazdasajtbe lehet transzformálni. Mivel a jelen vektorok teljesen kiválaszthatók *Streptomyces*-ben, a rekombináns klónok azonosítását hatásosan el lehet végezni.

A pJL 192, pBR 322, pBR 325 és hasonló plazmidok különböző replikon restriktions fragmenseit, valamint a különböző antibiotikum rezisztencia átadó DNS szegmenseket módosítani lehet a ligálás megkönnyítésére. Így pl. molekuláris kapcsolókat (linker) lehet szolgáltatni a mintegy 2,5 kb-s *KpnI* replikon fragmenshez, valamint a szóban forgó rezisztencia-átadó DNS szegmensekhez, fajlagos helyeket fejlesztve ki az ezt követő ligáláshoz. Ezen kívül a replikációt tartalmazó restriktions fragmensek kiindulását szintén lehet módosítani bizonyos nukleotidok hozzáadásával, eltávolításával vagy helyettesítésével, hogy megváltoztassuk jellemzőket és a DNS ligálásához restriktions helyek változatosságát nyújtjuk. Azok, akik a szakterületen jártasak, és értik a nukleotid kémiát és a genetikai kódot, tudják, melyik nukleotidok cserélhetők, és milyen DNS módosítások szükségesek egy kívánt célhoz.

A jelen találmány szerinti DNS klónozó vektorok nem korlátozódnak a *Streptomyces* csupán egy fajában vagy törzsében való alkalmazásra. Eppen ellenkezőleg, a vektorok széles körben alkalmazhatók és több *Streptomyces* faj gazdasajtjeibe transzformálhatók, különösen olyan gazdaságilag fontos faj restriktions nélküli törzseibe, amelyek antibiotikumokat termelnek, pl. aminoglükozidokat, makrolidokat, β -laktámokat, polietereket, glikopeptid-antibiotikumokat és hasonlókat. Az ilyen restriktions nélküli törzsek könnyen kiválaszthatók és izolálhatók *Streptomyces* fajokból, a szakterületen jól ismert hagyományos módszerekkel [Lomovskaya és munkatársai: *Microbiological Reviews*, 44, 206 (1980)]. A restriktions nélküli törzsek gazdasajtjeinek nincsenek restriktions enzimeik és ennél fogva nem hasítják el vagy roncsolják el a plazmid DNS-t a transzformálás során. A jelen alkalmazás céljaihoz azokat a gazdasajtjeiket, amelyek olyan restriktions enzimeket tartalmaznak, amelyek nem hasítják a jelen vektorok restriktions helyeinek egyikét sem, szintén restriktions nélkülieknek tekintjük.

A *Streptomyces* fajok restriktions nélküli törzseinek javasolt gazdasajtjei azok, amelyek aminoglükozid antibiotikumokat termelnek és amelyekben a jelen vektorok különösen hasznosak és transzformálhatók. Ilyen restriktions nélküli sejtek lehetnek pl a következő fajokból: *Streptomyces kanamyceticus* (kanamicin), *S. chrestomyces* (aminosidin), *S. griseoflavus* (MA 1267 antibiotikum), *S. microsporeus* (SF-767 antibiotikum), *S. ri-*

bosidificus (SF-733 antibiotikum), *S. flavo-*
persicus (spektinomycin), *S. spectabilis* (akti-
 nospektacin), *S. rimosus*, *paromomycinus* for-
 ma (paramomicinek, katenulin), *S. fradiae*
 var. *italicus* (aminosidin), *S. bluensis* var.
bluensis (bluensomicin), *S. catenulae* (ka-
 tenulin), *S. olivoreticuli* var. *cellulophilus*
 (desztomicin A), *S. tenebrarius* (tobramicin,
 apramicin), *S. lavendulae* (neomicin), *S.*
albogriseolus (neomicinek), *S. albus* var. *me-*
tamycinus (metamicin), *S. hygrosopicus* var.
sagamiensis (spektinomycin), *S. bikiniensis*
 (sztreptomicin), *S. griseus* (sztreptomicin), *S.*
erithrochromogenes var. *narutoensis* (sztrep-
 tomicin), *S. pooliensis* (sztreptomicin), *S. gal-*
bus (sztreptomicin), *S. rameus* (sztreptomi-
 cin), *S. olivaceus* (sztreptomicin), *S.*
mashuensis (sztreptomicin), *S. hygrosopicus*
 var. *limoneus* (validamicinek), *S. rimofaciens*
 (desztomicinek), *S. hygrosopicus*, *glebosus*
 forma (glebomicin), *S. fradiae* (hibrimicinek,
 neomicinek), *S. eurocidicus* (A 16316-C anti-
 biotikum), *S. aquacanus* (N-metil higromicin
 B), *S. crystallinus* (higromicin A), *S. nobori-*
toensis (higromicin), *S. hygrosopicus* (hig-
 romicinek), *S. atrofaciens* (higromicin), *S.*
kasugaspinus (kasugamicinek), *S. kasugaen-*
sis (kasugamicinek), *S. netropsis* (LL-AM 31
 antibiotikum), *S. lividus* (lividomicinek), *S.*
hofuensis (seldomicin komplex), és *S. canus*
 (ribosil-paromamin).

Szintén előnyös gazdasejtek és Strepto-
 mycetes fajok restrikció nélküli törzseiből
 azok, amelyek makrolid antibiotikumokat ter-
 melnek és amelyekben a jelen vektorok külö-
 nösen hasznosak és transzformálhatók. Ilyen
 restrikció nélküli sejtek lehetnek pl. a kö-
 vetkező fajokból: *Streptomyces caelestis* (M-
 188 antibiotikum), *S. platenensis* (platenomicin),
S. rochei var. *volubilis* (T-2636 antibiotikum),
S. venezuelae (metimicinek), *S. griseofuscus*
 (bundlin), *S. narbonensis* (joszamicin),
narbomicin, *S. fungicidicus* (NA-181 antibio-
 tikum), *S. griseofaciens* (PA-133 A, B antibio-
 tikumok), *S. roseocitreus* (albociklin), *S.*
bruneogriseus (albociklin), *S. roseochromo-*
genes (albociklin), *S. cinerochromogenes*
 (cineromicin B), *S. albus* (albomicetin), *S.*
felleus (agromicin, pikromicin), *S. rochei*
 (lankacidin, borrelidin), *S. violaceoniger*
 (lankacidin), *S. griseus* (borrelidin), *S. mai-*
zeus (ingramicin), *S. albus* var. *coilmyceticus*
 (koleimicin), *S. mycazofaciens* (acetil-leukomi-
 cin, espinomicin), *S. hygrosopicus* (turimi-
 cin, relomicin, maridomicin, tilozin, karbomi-
 cin), *S. griseospiralis* (relomicin), *S. laven-*
dulae (aldgamicin), *S. rimosus* (neutramicin),
S. deltae (deltamicinek), *S. fungicidicus* var.
espinomyceticus (espinomicinek), *S. furdicidi-*
cus (midekamicin), *S. ambofaciens* (foromaci-
 din D), *S. eurocidicus* (metimicin), *S. griseo-*
lus (griseomicin), *S. flavochromogenes* (ama-
 romicin, sinkomicinek), *S. fimbriatus* (amaro-
 micin), *S. fasciculus* (amaromicin), *S. eryth-*
reus (eritromicinek), *S. antibioticus* (oleando-

6

micin, *S. olivochromogenes* (oleandromicin),
S. spinichromogenes var. *suragaensis* (kuji-
 micinek), *S. kitasatoensis* (leukomicinek), *S.*
narbonensis var. *josamyceticus* (leukomicin A
 3, joszamicin), *S. albogriseolus* (mikonomicin),
S. bikiniensis (kalkomicin), *S. cirratus*
 (cirramicin), *S. djakartensis* (niddamicin), *S.*
eurythermus (angolamicin), *S. fradiae* (tilo-
 zin, laktencin, makrocin), *S. goshikiensis*
 (bandamicin), *S. griseoflavus* (akumicin), *S.*
halstedii (karbomicin), *S. tendae* (karbomi-
 cin), *S. macrosporeus* (karbomicin), *S. ther-*
motolerans (karbomicin) és *S. albireticuli*
 (karbomicin).

Szintén előnyös gazdasejtek a Strepto-
 mycetes fajok restrikció nélküli törzseiből
 azok, amelyek β -laktám antibiotikumokat ter-
 melnek és amelyekben a jelen vektorok külö-
 nösen hasznosak és transzformálhatók. Ilyen
 restrikció nélküli sejtek lehetnek pl. a kö-
 vetkező fajokból: *Streptomyces lipmanii* (A-
 16 884, MM-4550, MM-13 902), *S. clavuligerus*
 (A-16 886 B, klavulánsav), *S. lactamdurans*
 (cefamicin C), *S. griseus* (cefamicin A, B), *S.*
hygrosopicus (deacetoxi-cefalosporin C), *S.*
wadayamensis (WS-3442-D), *S. chartreusis*
 (SF-1623), *S. heteromorphus* és *S. panayen-*
sis (C-2081X); *S. cinnamomensis*, *S. fimbria-*
tus, *S. halstedii*, *S. rochei* és *S. viridochro-*
mogenes (cefamicin A, B); *S. cattleya* (tien-
 micin); és *S. olivaceus*, *S. flavovirens*, *S. flav-*
us, *S. fulvoviridis*, *S. argenteolus* és *S.*
sioyaensis (MM-4550 és MM 13 902).

Szintén előnyös gazdasejtek a Strepto-
 mycetes fajok restrikció nélküli törzseiből
 azok, amelyek poliéter antibiotikumokat ter-
 melnek és amelyekben a jelen vektorok külö-
 nösen hasznosak és transzformálhatók. Ilyen
 restrikció nélküli sejtek lehetnek pl. a kö-
 vetkező fajokból: *Streptomyces albus* (A-204,
 A-28 695A és B, szalinomicin), *S. hygrosopi-*
cus (A-218, emericid, DE-3936, A-120, A-
 28 695A és B, eteromicin, dianemicin), *S.*
griseus (griszorixin), *S. conglobatus* (ionomi-
 cin), *S. eurocidicus* var. *asterocidicus* (laid-
 lomycin), *S. lasaliensis* (laszalcid), *S. ribosi-*
dificus (lonomicin), *S. cacaol* var. *asoensis*
 (lisocellin), *S. cinnamomensis* (monensin), *S.*
aureofaciens (naraszin), *S. gallinarium* (RP-
 -30 504), *S. longwoodensis* (lisocellin), *S. fla-*
veolus (CP-38 936), *S. mutabilis* (S-11 743 a),
 és *S. violaceoniger* (nigericin).

A Streptomycetes gazdasejtek fentebb
 leírt reprezentatív példáin kívül a jelen vek-
 torok alkalmazhatók és transzformálhatók *E.*
coliban is. Így a jelen találmány szerinti
 vektorok széles körű alkalmazást nyerhetnek,
 és organizmusok széles választékából gazda-
 sejteket képesek transzformálni, és azokban
 hasznos tevékenységet végezni.

Bár a jelen találmány minden kiviteli
 módja alkalmazható, a jelen rekombináns DNS
 klónozó vektorból és transzformánsokból né-
 hány előnyös. Előnyös plazmidok a követke-
 zők: pHJL2200, pHJL2202, pHJL201, pHJL210

és pHJL211; és előnyös transzformánsok: *Streptomyces griseofuscus* (pHJL2200, *S. griseofuscus*) pHJL2202, *S. lividans* (pHJL201, *S. lividans*) pHJL210, *S. lividans* (pHJL211, *S. griseofuscus*) pHJL210, *S. griseofuscus* (pHJL210, *S. griseofuscus*) pHJL211, *S. fradiae* (pHJL201, *S. fradiae*) pHJL210, *S. fradiae* (pHJL211, *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-) pHJL201, *E. coli* K 12 C600R_k-M_k- (pHJL210, és *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-) pHJL211. Ebből az előnyös csoportból a legelőnyösebbek a pHJL201, pHJL210 és pHJL211 plazmidok és a *S. griseofuscus* (pHJL201, *S. griseofuscus*) pHJL 210, *S. griseofuscus* (pHJL211, *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-) pHJL201, *E. coli* K 12 C600R_k-M_k- (pHJL210 és *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-) pHJL211 transzformánsok.

A jelen találmány szerinti vektorok magukban foglalnak replikációs kiindulást, amely működőképes *E. coliban* és *Streptomycesben* egyaránt és ezáltal nagy rugalmasságot enged meg a gazdaszervezet kiválasztásában. Következésképpen a klónozott DNS szekvenciákat át lehet vinni *E. coli*-ba új plazmidok képzésére, fizikai analízisre és a restriktív helyek feltérképezésére, majd vissza lehet vinni *Streptomyces*-be működési elemzésre és a törzs feljavítására. Ez különösen előnyös, mivel a plazmidok sokszorozását és manipulálását gyorsabban és kényelmesebben lehet elvégezni *E. coliban*, mint *Streptomycesben*. Így pl. a jelen vektorokat hagyományosan lehet sokszorozni *E. coli* K 12-ben spektinomycinrel vagy klóramfenikollal való növesztéssel. Ez nem lehetséges a *Streptomyces* gazdaszervezet-rendszerben. Ezen túl, mivel minden plazmid vektor tartalmaz rezisztencia markereket, amelyek kifejeződnek *E. coli* K 12-ben, rekombinánsokat könnyen ki lehet választani. Ennél fogva nagy mennyiségű plazmid DNS-t lehet izolálni kényelmesen és rövidebb idő alatt, mint amennyi szükséges lenne hasonló művelethez *Streptomyces*-hez.

A jelen találmány szerinti rekombináns DNS klónozó vektorok és transzformánsok széles körű alkalmazást nyerhetnek és segíthetnek kielégíteni az igényt megfelelő klónozó hordozókra *Streptomycesben* és rokon organizmusokban való felhasználáshoz. Ezen felül a jelen vektoroknak az a képessége, hogy antibiotikumokra való rezisztenciát adnak át, szintén működési segítséget nyújt a transzformánsok kiválasztásához. Ez fontos az olyan sejtek meghatározásához és kiválasztásához való gyakorlati szükségszerűség miatt, amely sejtek befogadják a vektor DNS-t. További DNS szegmensek, amelyek jelenlétében hiányzanak a működési vizsgálatok, szintén beiktathatók a jelen vektorokba és ez után a nem-kiválasztható DNS-t tartalmazó transzformánsok is izolálhatók a megfelelő antibiotikum-szelekcióval. Ilyen nem-kiválasztható DNS szegmensek beiktathatók bármilyen helyre, kivéve a plazmid működésé-

hez, fenntartásához és replikációjához szükséges területeken belül, beleértve (de nem korlátozva ezekre) azokat a géneket, amelyek megszabják az antibiotikum-módosító enzimeket, az antibiotikum-rezisztenciát és az antibiotikum-szintézist, valamint a szabályozó gének összes típusát.

Még részletesebben, egy olyan nem-kiválasztható DNS szegmens, amely egy gént tartalmaz, iktatható be egy plazmidba, pl. a bemutatott pHJL210 plazmidba, az egyedi *Bam*HI restriktív helynél. Egy ilyen beiktatás inaktíválja a neomicin rezisztencia génjét és így lehetővé teszi a rekombináns plazmidot tartalmazó transzformánsok könnyű azonosítását. Ezt el lehet végezni először a tiosztrepton-rezisztens transzformánsok kiválasztásával, majd az olyan tiosztrepton-rezisztens transzformánsok azonosításával, amelyek neomicinre nem rezisztensek. Hasonló módon egy szóban forgó DNS szegmens beiktatása pl. az egyedi *Cla*I restriktív helynél inaktíválja a tiosztrepton rezisztencia gént. Így azok a transzformánsok, amelyek ezt a rekombináns plazmidot hordozzák, szintén könnyen azonosíthatók először neomicin-rezisztenciára kiválasztva, majd azonosítva azokat a neomicin-rezisztens transzformánsokat, amelyek nem rezisztensek tiosztreptonra. Ennél fogva a képesség az antibiotikum-rezisztencia kiválasztására *Streptomycesben* és rokon sejtekben lehetővé teszi a különösen ritka olyan sejtek hatásos izolálását, amelyek a szóban forgó nem-kiválasztható DNS-t tartalmazták.

A fentebb itt leírt, antibiotikum-rezisztenciához való működési vizsgálatot alkalmazni lehet azoknak a DNS szegmenseknek a lokalizálásához, amelyek az antibiotikum rezisztencia gének szabályozójaként, vagy bioszintézis elemeként és közvetlen kifejezőjeként működnek. Az ilyen szegmensek, beleértve (de nem csak ezekre korlátozva) a promotorkat, gyengítőket (attenuátorokat), represzorokat, induktorokat, riboszomális kötőhelyeket és hasonlókat, alkalmazhatók a *Streptomyces* és rokon organizmusok sejteiben lévő más gének kifejeződésének szabályozásához.

A jelen találmány szerinti antibiotikum-rezisztencia átadó vektorok alkalmazhatók annak biztosítására, hogy a kapcsolt DNS szegmensek stabilan meg legyenek tartva a gazdasejtekben több generáción keresztül. Ezeket a géneket vagy DNS fragmenseket, amelyek kovalensen kötődtek egy antibiotikum rezisztencia átadó fragmenshez és vagy *Streptomycesben* vagy *E. coliban* szaporodnak, úgy tartják fenn, hogy a transzformánsokat olyan antibiotikum-szintnek tesszük ki, amely toxikus a nem transzformált sejtekre. Ennél fogva azok a transzformánsok, amelyek elvesztik a vektort és következésképpen mindenféle kovalensen kötött DNS-t, nem tudnak nőni és kiküszöbölődnek a tenyészet-

ból. Így a jelen találmány szerinti vektorok stabilizálhatják és fenntarthatják bármelyik szóban forgó DNS szekvenciát, hacsak a klónozott DNS vagy egy kifejezett termék nem halálos a gazdasejtre.

A jelen találmány szerinti klónozó vektorok és transzformánsok a gének klónozásához szolgálnak, hogy növeljék a különböző termékek kitermelését, amelyek a Streptomycesben és rokon sejtekben jelenleg termelődnek. Az ilyen termékekre példák (bár nem korlátozódnak csak ezekre) pl. a következők: sztreptomycin, tilozin, cefalosporinok, aktaplanin, avoparcin, narasin, monenzin, apramicin, tobramicin, eritromicin, tetraciklin, klóramfenikol, vankomicin, teikomycin, és hasonló. A jelen találmány kiválasztható vektorokat is nyújt, amelyek alkalmazhatók DNS szekvenciák klónozására, jellemzésére és újra helyreállítására, olyan DNS szekvenciáké, amelyek kereskedelmileg fontos fehérjéket kódolnak, mint pl. humán inzulin, humán proinzulin, glukagon, interferon, humán növekedési hormon, madár növekedési hormon, szarvasmarha növekedési hormon, sertés növekedési hormon, interleukin I, interleukin II, és hasonló; enzimes funkciókat kódolnak metabolikus utakon, amelyek kereskedelmileg fontos folyamatokhoz és vegyületekhez vezetnek; vagy szabályozó elemeket kódolnak, amelyek javítják a gén-kifejeződést. Ezek a kívánt DNS szekvenciák magukban foglalják (de nem korlátozódnak csak ezekre) azokat a DNS-eket, amelyek olyan enzimeket kódolnak, amelyek katalizálják a leszármaztatott antibiotikumok szintézisét, pl. a sztreptomycin, cefalosporin, tilozin, aktaplanin, avoparcin, narasin, monenzin, apramicin, tobramicin, tetraciklin, klóramfenikol, eritromicin, teikomycin, és vankomicin származékok szintézisét, vagy olyan enzimeket, amelyek közvetítik és növelik az antibiotikumok vagy más termékek bioprodukcóját.

A fentebb említett DNS szegmenések beiktatási, stabilizálási és áthelyeződési képessége Streptomycesbe és *E. coli*-ba lehetővé teszi a könnyű rekombináns genetikai manipulációt a Streptomyces által termelt antibiotikumok kitermelésének és hozzáférhetőségének növeléséhez. Ezen kívül mivel a pJL192 plazmid replikációt tartalmazó fragmensének mintegy 2,5 kb-s KpnI kiindulása nagy kópiaszámú plazmidot állít elő, csaknem minden olyan DNS szekvenciát, amely gyengén van átirva vagy átfordítva, könnyen klónozni lehet a jelen vektorokba és áthelyezni a Streptomyces és az *E. coli* között.

Az *Escherichia coli* K 12 C600R_k-M_k-/pJL192 (NRLL B-15040) törzset számtalan módon lehet tenyészteni, a számos különböző tápközeg bármelyikét alkalmazva. A tápközegben előnyös szénhidrát források lehetnek pl. a glükóz és a glicerin, és a nitrogénforrások lehetnek pl. az ammónium-sók, aminosav-keverékek, és peptonok. Tápközegként

szolgáló szervesen sókat szintén építünk be, amelyek a szokásos olyan sók lehetnek, amelyek képesek magnézium, nátrium, kálium, ammónium, kalcium, foszfát, klorid, szulfát és hasonló ionokat termelni. Amint ez más mikroorganizmusok növekedéséhez és kifejlődéséhez is szükséges, esszenciális nyomelemeket szintén kell adni. Az ilyen nyomelemek általában a más tápközeg-alkotórészek adásánál véletlenszerűen előforduló tisztátalanságok szolgáltatják.

Az *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-/pJL192-t aerob tenyésztési körülmények között lehet növeszteni viszonylag széles pH-tartományban, pH 6,5-7,5 között, kb. 25° és 42 °C közötti hőmérsékleten. A legnagyobb mennyiségű pJL192 plazmid előállításához azonban kívánatos, hogy a tenyésztő tápközegnél kb. pH 7,2-vel induljunk, és a tenyésztet hőmérsékletét 37 °C hőmérsékleten tartsuk fenn. Az *E. coli* sejteket a fentebb említett körülmények között tenyésztve a sejtek tárolóhelye jön létre, amelyekből a pJL192 plazmid a szakterületen ismert technikákkal izolálható.

Azt ábrák rövid leírása a következő:

Az 1. ábra a pJL192 plazmid restrikciós hely térképét mutatja be.

A 2. ábra a pHJL2200 és pHJL2201 plazmidok restrikciós hely- és működési térképe.

A 3. ábra a pHJL2202 és pHJL2203 plazmidok restrikciós hely- és működési térképe.

A 4. ábra a pHJL201 plazmid restrikciós hely- és működési térképe.

Az 5. ábra a pHJL200, pHJL202, pHJL203, pHJL204 és pHJL205 plazmidok restrikciós hely- és működési térképe.

A 6. ábra a pHJL210 és pHJL211 plazmidok restrikciós hely- és működési térképe.

A most következő példák tovább illusztrálják és részletezik az itt közölt találmányt. A találmány megalkotásához szükséges magyarázatokat és aktuális folyamatokat is leírjuk, ahol szükséges.

1. példa

Az *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-/pJL192 tenyésztése és a pJL 192 plazmid izolálása

E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pJL192 (NRLL B-15 040) egyedi baktérium-telepet inokulálunk LB tápközegbe, amely 1 liter vizes oldatban 10 g Bacto tripton, 5 g Bacto élesztőkivonatot, és 10 g NaCl-t tartalmaz (pH 7,5) 25 µg/ml ampicillinnel együtt, a hagyományos mikrobiológiai eljárások szerint. A tenyésztet 37 °C hőmérsékleten 1 éjszakán át inkubáljuk. A következő reggelen 500 ml M9 tápközeg [Miller és munkatársai: Experiments in Molecular Genetics (Kísérletek a molekuláris genetikában), Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1979], 1 mmól/liter MgSO₄-el, 0,2% glükózzal, 0,3-0,4% CAA-val (casamino acid, részben

hidrolizált tejfehérje, Difco), 2 µg/ml B₁ vitaminnal (tiamin-HCl, Sigma) és adalékokkal kiegészítve, inokulálunk 5 ml éjszakán át nőtt tenyészetrel. A tenyészetet élénk rázattal és mellett inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten egy éjszakán át, és a következő reggelen az éjszaka nőtt tenyészet mintáit inokuláljuk 1/10 és 1/50 közötti hígításokban a kiegészített M9 tápközegbe és inkubáljuk élénk rázattal közben 37 °C hőmérsékleten 2,5-3 órán át. A tenyészet turbiditása kék szűrővel mérve 300-400 Klett-egység. Klóramfenikolt (150-175 µg/ml) adunk a tenyészethez és az inkubálást élénk rázattal folytatjuk egy éjszakán át.

A baktériumsejteket centrifugálással nyerjük ki 7500 fordulat/percnel 5 percen át 4 °C hőmérsékleten, majd kétszer mossuk 200 ml SV-vel (0,15 mól/liter NaCl, 0,1 mól/liter EDTA-nátriumsó, pH 8,0). A szemcséket 10 ml/g nedves súly TS oldatban újra szuszpendáljuk (25% szacharóz, 50 mmól/liter Tris, pH 8) és jégbe helyezzük. Ehhez a szuszpenzióhoz 2 ml/g nedves súly lizozim-oldatot adunk (5 mg/ml 50 mmól/literes Tris-HCl-ben, pH 7,8) és hagyjuk a jégben lehűlni 5 percen át. Ezután 4 ml/g nedves súly 0,25 mól/liter EDTA-t (pH 8,0) adunk hozzá és további 5 percen át hűtjük. 16 ml/g nedves súly lizáló oldat hozzáadása után (0,4% dezoxikolát, 1% Brij 58, 50 mmól/liter Tris és 0,0625 mól/liter EDTA, pH 8) a keveréket 37 °C hőmérsékleten 15-30 percen át inkubáljuk. A DNS-t centrifugálással kinyerjük Sorvall SS34 rotorban 21 000 fordulat/percnel 15-30 percen át 4 °C hőmérsékleten. A felülúszót megőrizzük és 0,1 térfogat 3 mól/literes NaOAc oldatot és 0,64 térfogat izopropanolt adunk a felülúszóhoz. A DNS-t 10 000 fordulat/perccel 10 percen át 4 °C hőmérsékleten centrifugáljuk, majd ezután a szemcséket újra szuszpendáljuk 0,1 térfogat TE-ben (10 mmól/liter Tris, 1 mmól/liter EDTA, pH 8). A plazmid DNS-t centrifugálással tisztítjuk, propidium diodidot tartalmazó céziumklorid sűrűség-gradiensekben kiegyensúlyozva ismert technikák szerint.

2. példa

A *Streptomyces*ben működő pJL2200, pJL2201, pJL2202 és pJL2203 plazmidok megalkotása

A. A pJL192 plazmid emésztése és a replikációt tartalmazó restriktions fragmens mintegy 2,5 kb-s kiindulásának izolálása

Mintegy 20 µl (20 µg) pJL192 plazmid DNS-t, 5 µl BSA-t (szarvasmarha szérum albumin, 1 mg/ml), 19 µl vizet, 1 µl (8 egység/ml) KpnI restriktions enzimet* és 5 µl reakciókeveréket** inkubálunk 37 °C hőmérsékleten 2 órán át, majd az inkubálást 70 °C

hőmérsékleten 10 percen át történő melegítéssel fejezzük be. A DNS-t 0,1 térfogat 3 mól/literes NaOAc oldattal (pH 8), majd két térfogat 100%-os etanollal csapjuk ki. A kicsapást végezhetjük vagy -20 °C hőmérsékleten egy éjszakán át, vagy -70 °C hőmérsékleten (száraz jégen) legalább 15 percen át. A DNS csapadékot egyszer hideg 70%-os etanollal mossuk, majd megszáritjuk és újra szuszpendáljuk 50 ml TE-ben (10 mmól/liter Tris, 1 mmól/liter EDTA, pH 8,0). Az így létrejött DNS-t elektroforézisnek vetjük alá vízszintes agaróz gélben egyszeres TBE pufferben (89 mmól/liter Tris-HCl, pH 8,3, 89 mmól/liter bórsav, 2,5 mmól/liter EDTA) lényegileg összhangban Maniatis és munkatársainak kitanításával [Molecular Cloning (Molekuláris klónozás), Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, 1982].

* A restriktions enzimek és az útmutatások a következő forrásokból szerezhetők be:

New England Bio Labs., Inc., 32 Tozer Road Beverly, Massachusetts 01915, Amerikai Egyesült Államok.

Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive P. O. Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250, Amerikai Egyesült Államok.

Bethesda Research Laboratories Inc., 8717 Grovemont Circle, P. O. Box 577, Gaithersbury Maryland 20760, Amerikai Egyesült Államok.

** A KpnI restriktions enzimhez szolgáló reakciókeveréket a következő összeállításban készítjük el:

60 mmól/liter NaCl
60 mmól/liter Tris-HCl, pH 7,5
60 mmól/liter MgCl₂
60 mmól/liter 2-merkaptó-etanol

Az elkülönített fragmenseket lokalizáljuk a gélben etidium-bromiddal történő festéssel és a fluorescens csíkok láthatóvá tételével ultraibolya fényvel. A kívánt mintegy 2,5 kb-s csíkkal határosan egy szeletet készítünk és DEAE cellulóz (Whatman DE-81) papírt helyezünk el a hasítékban. A DNS-t addig vetjük alá elektroforézisnek, amíg a DNS teljesen rá nem kötődött a papírra. Az eltávolítás után a papírt 100 mmól/liter KCl-ből és 10 mmól/liter Tris-HCl-ből (pH 8) álló oldatban egyszer mossuk, és 5 ml elúciós pufferben (1 mól/liter NaCl és 10 mmól/liter Tris-HCl, pH 8) diszpergáljuk élénk keverés mellett. A papírt szűrővel eltávolítjuk szilikonozott Pyrex-üvegszöveten át és a DNS-t vagy közvetlenül kicsapjuk 2 térfogat etanollal, vagy hígítjuk 1 térfogat vízzel, és ezt követően végezzük el az etanolos kicsapást. A kicsapás bármelyik módszerét száraz jégen át lehet végrehajtani egy órán át, vagy egy más módszer szerint -20 °C hőmérsékleten

egy éjszakán át. A kicsapást követően a fragmenseket újra feloldjuk 100-500 ml TE pufferban az ezt követő összekapcsoláshoz (ligáláshoz).

B. A pLR2 plazmid emésztése és tiosztrep-ton-rezisztencia átadó fragmensének izolálása

Mintegy 20 µg pLR2 plazmid (amelyek megalkotását a 4 416 994 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárja fel, és amely ide referenciaként van beépítve) DNS-t emésztünk BamI* restriktív enzimmel, amely négy helyen hasítja el a plazmidot. A BamI-vel képzett végeket betöltjük Klenow polimeráz I-el, amint ezt Maniatis és munkatársai leírták (1982). Ezeket a tompa végű fragmenseket ezután egyesítjük Kpn I kapcsolókkal [amelyek a pCGGTACCG szekvencia önmagával komplementer oligonukleotidjából áll, és amely a Collaborative Research, Inc.-nél kapható (128 Spring Street, Lexington, Massachusetts 02173, Amerikai Egyesült Államok)], Kpn I hasítási helyet szolgáltatva a pJL192 plazmid replikációt tartalmazó fragmensének mintegy 2,5 kb-s Kpn I kiindulásához való ligálásához. A pLR2-ből nyert DNS fragmens 20 µg-ját 10 egység T4 DNS ligázzal** kezeljük 200 pikomól pCGGTACCG 5'-foszforilezett szintetikus oligonukleotid jelenlétében és 20 µl T4 DNS ligáz pufferban (20 mmól/liter Tris, pH 7,6 0,5 mmól/liter ATP, 10 mmól/liter MgCl₂, 5 mmól/liter ditiotreitolt) 20-22 °C hőmérsékleten egy éjszakán át. Az oldatot azután 10 percen át melegítjük 70 °C hőmérsékleten a ligálás megállítására. A kapcsolókat Kpn I emésztéssel elhasítjuk és a fragmenseket, most Kpn I végekkel, elkülönítjük 1%-os AGE-val (agaróz-gél elektroforézis). A mintegy 1,6 kb-s fragmenseket izoláljuk a gélről először megfestve etidium bromiddal, majd a fragmenseket ultrabolya fényel lokalizálva és papíron eluálva, amint ezt a 2 A példában korábban leírtuk.

* A BamHI restriktív enzimhez való reakciókeveréket a következő összeállításban készítjük el:

1,5 mól/liter NaCl
60 mmól/liter Tris-HCl, pH 7,9
60 mmól/liter MgCl₂

** A T4 DNS ligázt a következő forrásokból szerezhetjük be:

New England Bio Labs., Inc., 32 Tozer Road Beverly, Massachusetts 01915, Amerikai Egyesült Államok.

Bethesda Research Laboratories, P.O.Box 577 Gaithersburg, Maryland 20760, Amerikai Egyesült Államok.

Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive, P.O.Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250, Amerikai Egyesült Államok.

10

C. Ligálás a pHJL2200 és pHJL2201 plazmidok képzésére

Mintegy 20 µl, pJL192 plazmid DNS mintegy 2,5 kb-s Kpn I fragmenst, 20 µl, pLR2 plazmid DNS mintegy 1,6 kb-s BamHI fragmenst (2 B példa), 10 µl 5-szörös kináz/ligáz puffert (4 B példa), és 1 µl T4 DNS ligázt inkubálunk 16 °C hőmérsékleten 4 órán át. A ligálás termékét azután közvetlenül használjuk a Streptomyces transzformációjában. A pHJL2200 és pHJL2201 plazmidok restriktív hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 2. ábra mutatja be.

D. A pHJL 2200 plazmid részleges Bcl I emésztése

A kívánt emésztést lényegileg a 2 A példában található kitanítással összhangban végezzük el, kivéve, hogy pHJL 2200 plazmidot, Bcl I restriktív enzimet és reakciókeveréket* használunk a pJL192 plazmid, Kpn I restriktív enzim és reakciókeverék helyett. Ezen kívül a reakciót 50 °C hőmérsékleten hajtjuk végre, és a leállítást kétszeres fenolos extrakcióval, háromszoros éteres extrakcióval, és etanolos kicsapással végezzük, majd a csapadékot vízben újra szuszpendáljuk az ezt követő AGE kezeléshez.

* A Bcl I-hez való reakciókeveréket a következő összeállítás szerint készítjük el:

750 mmól/liter KCl,
60 mmól/liter Tris-HCl, pH 7,4 25 °C hőmérsékleten,
100 mmól/liter MgCl₂
10 mmól/liter ditiotreitolt

E. A pLR4 plazmid emésztése és mintegy 3,4 kb-s BamHI fragmensének izolálása

A kívánt emésztést lényegében a 2 A példában található kitanítással összhangban végezzük el azzal a kivétellel, hogy pLR4 plazmidot (amelynek megalkotását a 4 416 994 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás tárja fel, és amely ide referenciaként van beépítve) és BamHI restriktív enzimet alkalmazunk pJL192 plazmid és Kpn I restriktív enzim helyett.

F. Ligálás a pHJL2202 és pHJL2203 képzésére

A kívánt ligálást lényegileg a 2 C példában található kitanítás szerint hajtjuk végre. Négy orientációjú rekombináns plazmidokat a kívánt fenotípussal lehet előállítani, mivel a mintegy 3,4 kb-s BamHI neomicin rezisztencia átadó fragmenst bármilyen irányban lehet orientálni a két BamHI hely egyikenél a pHJL2200 plazmidban. A pHJL2202 és pHJL2203 plazmidok restriktív hely- és működési térképét a 3. ábra mutatja be a mellékelt rajzok közül.

3. példa

A Streptomyces griseofuscus (pHJL2200 és *S. griseofuscus*) pHJL2202 megalkotása

A. Tenyészetek növesztése protoplasztok előállításához

Hagyományos módon vegetatív inokulot állítunk elő *S. Griseofuscus* növesztésével, amely törzs el van helyezve az American Type Culture Collection (ATCC) állandó törzstenyészet-gyűjteményében (Rockville, Maryland 20852), amelynek részét képezi, és ahonnan rendelkezésre áll a közönség részére ATCC 23 916 letéti számon. A növesztést süllyesztett körülmények között végezzük 20 órán át 30 °C hőmérsékleten TSB-ben*, amely 0,4% glicinnel van kiegészítve. A *S. griseofuscus* protoplaszt-képzése időt rabló művelet, amelyet általában a következők szerint hajtunk végre. Leoltunk csíkokban *S. griseofuscus* egy YMX agart tartalmazó lemezre (0,3% élesztőkivonat, 0,2% glükóz és 2% agar). Mintegy 48 óra múlva egy egyedi baktériumtelepet inokulálunk 10 ml TSB-be*; homogenizálunk, majd inkubálunk 30 °C hőmérsékleten egy éjszakán át. Ezután 4 ml egy éjszakán át nőtt tenyészetet homogenizálunk, és hozzáadunk 100 ml 0,4% glicinnel kiegészített TSB-t, és egy éjszakán át inkubáljuk 30 °C hőmérsékleten. A következő délutánon ezt a műveletet megismételjük, friss, egy éjszakán át nőtt tenyészetet alkalmazva. A következő reggelen hozzáadunk 50 ml 50%-os (térf./-térf.) glicerint a tenyészethez, és 15 ml mintát lefagyaszttunk -20 °C hőmérsékleten. A fagyaszttott sejteket hat hónapon át tároljuk, és ezt használjuk a transzformációhoz. A fagyaszttott sejteket felengedtetjük a csövet szobahőmérsékleten egy vizes főzőpohárba helyezve. A sejteket asztali centrifugával kinyerjük és háromszor mossuk 10 ml 10,3%-os szacharózzal. A sejt-szemcséket újra szuszpendáljuk 10 ml P tápközeggel [Hopwood és Wright: *J. Molecular and General Genetics*, 162, 307 (1978)], amely lizozimmal (1 mg/ml) van kiegészítve, és 30 °C hőmérsékleten két órán át inkubáljuk. A protoplasztokat szemcsékké centrifugáljuk, és a szemcséket háromszor mossuk 10 ml P tápközegben olyan módon, hogy vortex-keverővel felkeverjük, és a szemcséket az oldatba pipettázzuk minden egyes mosásnál. A végső szemcséket 2 ml P tápközegben újra szuszpendáljuk az ezt követő transzformációhoz.

* A TSB-t (Triptikáz szója tápleves) a Difco Laboratories-től nyerjük (Detroit, Michigan), vagy a Baltimore Biological Laboratories-től (P.O.Box 243, Cockeysville, Maryland, 21 031).

B. Transzformálás

Mintegy 10 µl plazmid DNS-t ligáló pufferban és mintegy 150 µl *S. griseofuscus* protoplasztot keverünk enyhén egy kémcsőben. Ehhez a keverékhez hozzáadunk mintegy 101 µl 50%-os PEG 1000-t (polietilén-glikol, Sigma) P tápközegben, a keverékhez pipettázva. 1-2 perc várakozás után P tápközegzet adunk hozzá, 1 ml-re egészítve ki a keveréket. A transzformált sejteket R2 tápközegre helyezük és egy éjszakán át inkubáljuk 30 °C hőmérsékleten. A regenerálódó protoplasztokra rárétegezzük 3 ml R2 rárétegező közeget, amely 400 µg/ml tiosztrepton tartalmaz, és 30 °C hőmérsékleten inkubáljuk legalább 4 napon át. Az így létrejött *S. griseofuscus*/pHJL2200 tiosztrepton-rezisztens telepeket ismert módszerek szerint izolálhatjuk, majd tenyésztjük és hagyományos módon azonosítjuk a 3 C példában található kitanítással összhangban. A transzformáns tenyészeteket alkalmazhatjuk ez után az ezt követő plazmid DNS termeléshez és izoláláshoz.

A *S. griseofuscus*/pHJL2202 transzformánsokat tiosztrepton- és neomicin rezisztenciára úgy választhatjuk ki, hogy a regeneráló protoplasztokra 50 µg/ml neomicinnel és 400 µg/ml tiosztreptonnal kiegészített R2 rárétegező közeget rétegezzük. Az így létrejött *S. griseofuscus*/pHJL2202 tiosztrepton- és neomicin rezisztens telepeket ismert módszerek szerint izoláljuk, majd azonosítjuk a 3 C példában található kitanítással összhangban.

C. *A. S. griseofuscus* transzformánsok elemzése

Az így létrejött transzformánsokat YMX agaron tenyésztjük (0,3% élesztőkivonat, 0,3% maláta-kivonat, 0,2% glükóz és 2% agar), amely tiosztreptonnal van kiegészítve (40 µg/ml), olyan módon, hogy egyedi telepeket nyerünk. Ezeket a telepeket használjuk 10 ml-es, 40 µg/ml tiosztreptonnal kiegészített TSB tenyészetek inokulálására. A tenyészeteket homogenizáljuk és egy éjszakán át növesztjük 30 °C hőmérsékleten rázógépen.

A tenyészetet homogenizáljuk és hozzáadjuk 200 ml olyan TSB tenyészethez, amely 0,4% glicint és 40 µg/ml tiosztrepton is tartalmaz, és egy vagy két napig növesztjük 30 °C hőmérsékleten. A sejteket azután Sorvall GSA rotorban kinyerjük 10 000 fordulat/percnel 15 perc alatt. A sejteket ezután újra szuszpendáljuk 100 ml TE tápközegben, amely 25% szacharózt és 5 mg/ml lizozimot is tartalmaz. 37 °C hőmérsékleten 1 órán át végzett inkubálás után 50 ml 0,25 mól/liter EDTA oldatot (pH 8,0) adunk hozzá. 25 ml-es mintákat viszünk át 20%-os (súly/térf.) SDS (nátrium-dodecilszulfát) oldatot tartalmazó Sorvall csövekbe, és finoman keverjük szo-

bahőmérsékleten 20-30 percen át, hogy lizáljuk a sejteket. Ezután 8 ml 5 mól/literes NaCl oldatot adunk hozzá és enyhén keverjük szobahőmérsékleten 30 percen át, majd a sejteket 1 1/2 órára jégre helyezzük. A DNS-t centrifugálással nyerjük ki, Sorvall-rotorban 15 000 fordulat/percnel 20 percen át. A felülúszót összegyűjtjük és a DNS-t 0,64 térfogat izopropanollal kicsapjuk és 20 percen át 10 000 fordulat/percnel centrifugáljuk. A felülúszót elöntjük, és a szemcséket levegőn szárítjuk, majd 10 ml TE pufferban újra szuszpendáljuk. Ezt azután CsCl gradiens-kiegyensúlyozással lehet tisztítani, az 1. példában található kitanítás szerint.

4. példa

(I) pHJL200, pHJL201, pHJL202, pHJL203, 20
pHJL204, és pHJL205, valamint (II) *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-transzformánsaik megalkotása

I. A plazmidok megalkotása

A. A pJL192 plazmid részleges *Kpn* I emésztése

A következő emésztést hajtjuk végre. 30
Mintegy 13 µl pJL192 DNS-t (kb. 3,25 µg) (az 1. példában található kitanítás szerint készítve), 25 µl vizet, 5 µl BSA-t, 5 µl 10-szeres *Kpn* I restrikciós puffert és 2 µl *Kpn* I enzimet összekeverünk és 37 °C hőmérsékleten 35
inkubálunk. A 15., 30., 60., 90. és 120. percben 10 µl-es alikvotokat veszünk, 40 µl vízzel keverjük ezeket, és 70 °C hőmérsékleten melegítjük 10 percen át. Ez a művelet az összes létező reakcióterméket létrehozza, at-
tól a molekulától kezdve, amelyet a *Kpn* I 40
restrikciós enzim nem hasított el, egészen addig, amelyet a *Kpn* I restrikciós enzim teljesen megemésztett. Ezeket az alikvotokat 45
1/10 térfogat 3 mól/literes NaCAC oldattal (pH 8) és 2 térfogat etanollal kicsapjuk és
-70 °C hőmérsékleten 1 órán át fagyasztjuk.

B. Ligálás

Az egyes csapadékokat összegyűjtjük, kétszer mossuk, levegőn szárítjuk, majd 20 µl vízben újra szuszpendáljuk. Minden szuszpenzióból 6 µl-t kiveszünk és olyan oldattal keverjük, amely 20 µl 5-szörös kináz/-
/ligáz puffert*, 40 µl 0,66 mól/literes ATP-t 55
(pH 7,4), 33 µl vizet és 1 µl T4 DNS ligázt (Boehringer Mannheim, ~1 egység (µl) tartalmaz, majd 15 °C hőmérsékleten 72 órán át inkubáljuk, hogy elősegítsük az ön-körbezá-
ródást. Inkubálás után minden szuszpenzióból 50 µl-t kiveszünk és a reakciót befejez-
zük, a hőmérsékletet 10 percre 70 °C hőmér-
sékletre emelve. Ezeket a szuszpenziókat a

fentiek szerint kicsapjuk, és 15 µl vízben újra szuszpendáljuk.

* Az 5-szörös kináz/ligáz puffert a követ-
5 kező összeállítás szerint készítjük el:
250 mmól/liter Tris-HCl, pH 7,8
25% glicerin
25 mmól/liter ditiotritol,
50 mmól/liter MgCl₂

5. példa

II. *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-/pHJL201,
E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL200,
E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL202,
E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL203,
E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL204,
E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL205 megal-
kotása.

A. A megfelelő fagyasztott *E. coli* K 12
C600R_k-M_k-előállítása

E. coli K 12 C600R_k-M_k-, egy széles
körben elterjedt és az ATCC-nél ATCC 33525
letéti számon elhelyezett törzs friss, egy éj-
szakán át nőtt tenyészetéből másod-tenyé-
szetet készítünk, 1:10 arányban oltva friss
L-tápközeget [amelynek összetételét ismerteti
Miller: Experiment in Molecular Genetics (Kí-
sérletek a molekuláris genetikában), Cold
Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor,
New York, /1972/] oltva, majd ezt 37 °C hő-
mérsékleten 1 órán át növesztjük. Összesen
660 Klett-egység sejtet nyerünk ki, 2,5 ml
100 mmól/literes NaCl oldattal mossuk, 2,5 ml
150 mmól/literes CaCl₂ oldatban szuszpendál-
juk, és szobahőmérsékleten inkubáljuk 20
percen át. A sejteket centrifugálással ki-
nyerjük, 0,5 ml 150 mmól/liter CaCl₂ -10%
glicerin oldatban újra szuszpendáljuk, jég-
ben hűtjük 3-5 percen át, majd fagyasztjuk.
A sejtek szuszpenzióját folyékony nitrogén-
ben tároljuk felhasználásig. A tartósítás és
tárolás nem befolyásolja károsan a kovalen-
s zárt cirkuláris DNS-el történő transzfor-
málás megvalósíthatóságát és gyakoriságát.

50 B. Transzformálás

A megfelelő sejteket jégfürdőben felme-
legedtetjük és 0,1 ml sejt 0,05 ml DNS-hez
arányban összekeverjük [a DNS: 12,5 µl a 4
B és 6 C példákban bemutatott mintából és
37,5 µl 0,1-szeres SSC (0,015 mól/liter NaCl,
0,0015 mól/liter nátrium-citrát, pH 7)]. A
transzformáló keveréket jégben hűtjük 20
percen át, hővel sokkoljuk 42 °C hőmérsék-
leten 1 percen át, majd jégen hűtjük 10
percen át. A mintákat ezután 0,85 ml L-táp-
közeggel hígítjuk, 37 °C hőmérsékleten 1,5
órán át inkubáljuk, 50 µg/ml ampicillint is
tartalmazó L-agarra szélesztjük és 18 órán
át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten az *E. coli*

K 12 C600R_k-M_k-/pHJL 201, E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL200, E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL202, E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL203, E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL204 és E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL205 transzformánsokat. Az ampicillin-rezisztens és tetraciklin-érzékeny telepeket ismert eljárások szerint izoláljuk, tenyésztjük, és a kovalensen zárt cirkuláris DNS tisztítására használjuk, amelyet azonban hagyományos módon azonosítunk restriktív enzimmel és az alkotó plazmidok AGE elemzésével. Az azonosított transzformánsokat használjuk azután a pHJL201, pHJL200, pHJL202, pHJL203, pHJL204, és pHJL205 plazmidok termelésére és izolálására az 1. példában található kitanítás szerint azzal a különbséggel, hogy a kivánt plazmidot tartalmazó törzseket alkalmazzuk az E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pJL192 helyett. A pHJL201 plazmid restriktív hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül a 4. ábra mutatja be. Az 5. ábra mutatja be a pHJL200, pHJL202, pHJL203, pHJL204, és pHJL205 plazmidok restriktív hely- és működési térképét.

6. példa

A pHJL210 és pHJL211 plazmidok megalkotása

A. A pHJL201 plazmid részleges BamHI emésztése

Mintegy 10 µl (10 µg) pHJL201 plazmidot (amelyet az 5. példában található kitanítás szerint készítünk el), 5 µl BSA-t (1 mg/ml), 29 µl vizet, 1 µl BamHI restriktív enzimet (vízzel 1:4 arányban hígítva) és 5 µl BamHI reakciókeveréket inkubálunk 37 °C hőmérsékleten 15 percen át. A reakciót 70 °C hőmérsékleten 10 percen át történő melegítéssel állítjuk le. A plazmid teljes hosszúságú lineáris molekulájának megfelelő részleges emésztési termékeket megtisztítjuk a kisebb, teljesen emésztett termékektől AGE-vel, az 1. példában található kitanítás szerint. A DNS-t lényegileg a 4. példában található kitanítás szerint kicsapjuk. Az így nyert DNS-csapatékat 20 µl vízben újra szuszpendáljuk az ezt követő ligáláshoz.

B. A pLR2 plazmid mintegy 1 kb-s Bcl I restriktív fragmensének izolálása

A legtöbb E. coli K 12 törzs metiláz bizonyos gyököket saját DNS-ében. Így pl. a *dam* gén által szabályozott metiláz a jelzett adenin N6 helyzeténél metiláz az 5'GA^mTC³ DNS szekvenciában. Erről a metilázról kimutatták, hogy megakadályoz néhány (de nem minden) restriktív endonukleáz által végzett DNS-hasítást, amely endonukleázok felismerő szekvenciái tartalmazzák vagy ma-

gukban foglalják a metiláz szekvenciákat. A jelen találmányban gyakran alkalmazott Bcl I restriktív enzim nem hasítja a Bcl I felismerő szekvenciát, az 5'TGATCA³-t, ha az metiláz van. Hogy elkerüljük ezt a problémát, a pLR2 plazmidot át kell vinni egy E. coli *dam* törzsbe, pl. GM48-ba, amely letétbe van helyezve a Northern Regional Research Laboratory-nál (NRRL) (Peoria, Illinois), és ennek a gyűjteménynek állandó részét képezi. A törzs a közönség rendelkezésére áll NRRL B-15 725 letéti számon.

A kivánt emésztést ez után lényegében a 2 B példában található kitanítás szerint hajtjuk végre azzal a kivétellel, hogy Bcl I restriktív enzimet alkalmazunk BamHI restriktív enzim helyett. A mintegy 1 kb-s Bcl I restriktív fragmenst AGE-vel tisztítjuk az 1. példában található kitanítás szerint.

C. Ligálás

A kivánt ligálást lényegében a 2 C példában található kitanítással összhangban hajtjuk végre. Különböző szerkezetű plazmidok képződhetnek, de a kivánt rekombináns plazmidok azok, amelyek fenotípusosan átviszik a rezisztenciát neomicinre és tiosztreptonra. Ezen kívül két orientációjú rekombináns plazmidokat készítünk, mivel a mintegy 1 kb-os Bcl I rezisztencia átadó fragmenst mindegyik irányba lehet orientálni. A pHJL210 és pHJL211 restriktív hely- és működési térképét a mellékelt ábrák közül az 5. ábra jeleníti meg.

7. példa

Az E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL210 és E. coli K 12 C600R_k-M_k-/pHJL211 megalkotása

A kivánt konstrukciókat egyenként alkotjuk meg, kiválasztjuk és kinyerjük, lényegében az 5. példában található kitanítással összhangban, azzal a kivétellel, hogy a pHJL210 és pHJL211 plazmidokat használjuk a pHJL200, pHJL201, pHJL202, pHJL203, pHJL204 és pHJL205 helyett.

8. példa

Streptomyces griseofuscus/pHJL201, *S. griseofuscus*/pHJL210 és *S. griseofuscus*/pHJL211 megalkotása

A kivánt konstrukciókat egyenként alkotjuk meg, kiválasztjuk és kinyerjük, lényegében a 3. példában található kitanítással összhangban azzal a kivétellel, hogy a pHJL201 plazmidot és nem a pHJL200 plazmidot alkalmazzuk, és a kiválasztásban fedő-agarként megfelelő mennyiségű neomicint

tartalmazó (hogy a végső lemezkoncentráció 2 µl/ml neomicin legyen) agart használunk tiosztreptont tartalmazó agar helyett. Hasonlóképpen a pHJL210 és pHJL211 megalkotását egyenként végezzük, kiválasztjuk és kinyerjük lényegében a 3. példában lévő kitanítással összhangban, azzal a kivétellel, hogy a pHJL210 és pHJL211 plazmidokat alkalmazzuk a pHJL2202 helyett.

9. példa

A Streptomyces lividans/pHJL210, S. lividans/pHJL210 és S. lividans/pHJL211 megalkotása

A kívánt konstrukciókat egyenként alkotjuk meg, kiválasztjuk és kinyerjük lényegében a 8. példában található kitanítással összhangban, azzal a kivétellel, hogy *S. griseofuscus* helyett *Streptomyces lividans*-t alkalmazunk. A *S. lividans* régi és jól ismert törzs, amely a köz rendelkezésére áll NRRL B-15 826 letéti számon, amely a Northern Regional Research Laboratory-nál (Peoria, Illinois) van letétbe helyezve, és annak részét képezi. Ezen kívül a *S. lividans* növesztéséhez és protoplasztképzéséhez tartozó tápközeg, a protoplaszt készítése és a transzformáció olyan, amelyet az International Publicationban leírtak, a PCT/BG79/00 095 nemzetközi szabadalmi bejelentésnél, amelynek közzétételi száma W0679/01 169, a 2. példában. Az azonosított transzformánsokat alkalmazzuk azután a pHJL201, pHJL210 és pHJL211 plazmidok előállításához és izolálásához ismert módszerek szerint, lényegében úgy, ahogyan ez a 3 C példa kitanításában le van írva.

10. példa

A Streptomyces fradiae/pHJL201, S. fradiae/pHJL210 és S. fradiae/pHJL211 megalkotása

A kívánt konstrukciókat egyenként alkotjuk meg, kiválasztjuk és kinyerjük, lényegében a 8. példában található kitanítás szerint azzal a különbséggel, hogy *Streptomyces fradiae*-t alkalmazunk *S. griseofuscus* helyett. A *S. fradiae* régi és jól ismert törzs, amely a köz rendelkezésére áll ATCC 19 609 letéti számon, és amely az American Type Culture Collection-nál (12 301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20 852) van letétbe helyezve és annak részét képezi. Ezen kívül a TSB tápközeget a *S. fradiae* növesztéséhez és protoplaszt-képzéshez módosítjuk olyan formán, hogy csak 0,2% glicint tartalmaz. A *S. fradiae* nagyon kis gyakorisággal transzformál az endogén restrikciós rendszer miatt, ezért a transzformánsok száma DNS

milligrammonként lényegesen kisebb a pHJL201, pHJL210 és pHJL211-el transzformált *S. fradiae* gazdaszervezeteknél, mint a *S. griseofuscus* vagy *S. lividans* gazdaszervezeteknél. A *S. fradiae*-ből izolált plazmid DNS azonban nagy gyakoriságú transzformálást ad, amikor ezt visszatranszformáljuk *S. fradiae*-ba.

10

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás mérsékleten nagy kópiaszámú rekombináns DNS klónozó vektor előállítására azzal jellemezve, hogy a.) a pJL192 plazmid replikációt tartalmazó restrikciós fragmensének egy mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I kiindulását és b.) egy vagy több olyan DNS szegmenst, amely legalább egy antibiotikumra ad át rezisztenciát, amikor érzékeny, restrikció nélküli gazdasejtre visszük át, egyesítünk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás pHJL2200 és pHJL2201 plazmidok előállítására azzal jellemezve, hogy a pHJL192 plazmid mintegy 2,5 kb-s *Kpn* I restrikciós fragmensét és a pLR2 plazmid végeinél *Kpn* I kapcsolókkal rendelkező, mintegy 1,6 kb-s *Bam*HI restrikciós fragmensét ligáljuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás pHJL2202 és pHJL2203 plazmidok és ezek beiktatásos izomerjeinek előállítására azzal jellemezve, hogy a pHJL2200 plazmid részleges *Bcl* I emésztésével nyert anyagot és a pLR4 plazmid mintegy 3,4 kb-s *Bam*HI fragmensét ligáljuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pHJL200, pHJL201, pHJL202, pHJL203, pHJL204 és pHJL205 plazmidok előállítására azzal jellemezve, hogy a pJL192 plazmid DNS-t *Kpn* I restrikciós enzimmal emésztünk, a reakciókeverékből az emésztés során a 15., 30., 60., 90. és 120. percben alikvotokat veszünk, az egyes alikvot minták DNS fragmenseit ligázzal inkubáljuk az önkörbezárás elősegítésére, az alikvotok mindegyikének egy mintáját baktérium-sejttel inkubáljuk a transzformálás kivitelezésére, a transzformált sejteket fenotípus alapján kiválasztjuk, a kiválasztott, transzformált sejteket plazmid-méret szerint osztályozzuk, és a mintegy 7,2 kb-s, mintegy 9,9 kb-s, mintegy 18 kb-s, mintegy 15,3 kb-s, mintegy 10,6 kb-s és mintegy 12,6 kb-s plazmidokat hagyományos módon izoláljuk és azonosítjuk, amely plazmidokat pHJL200-nak, illetve pHJL201-nek, illetve pHJL202-nek, illetve pHJL203-nak, illetve pHJL204-nek, illetve pHJL205-nek nevezzük el.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás a pHJL210 és pHJL211 plazmidok előállítására, azzal jellemezve, hogy egy *E. coli dam*-törzs-ből izolált pLR2 plazmid mintegy 1 kb-s *Bcl* I restrikciós fragmensét és a pHJL201 plazmid részleges *Bam*HI emésztésével kapott anyagot ligáljuk.

6. Eljárás mérsékleten nagy kópiaszámú klónozó vektorral transzformált restriktió nélküli *E. coli* vagy *Streptomyces* előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely 1-5. igénypont szerinti rekombináns DNS klónozó vektorral valamely *E. coli* vagy *Streptomyces* törzset transzformálunk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás *Streptomyces* gazdasejt előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely *Streptomyces* törzset transzformálunk.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Streptomyces griseofuscus*, *S. lividans* vagy *S. fradiae* törzset transzformálunk.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pHJL2200, pHJL2201, pHJL2202 vagy pHJL2203 plazmiddal transzformálunk.

10. A 6. vagy 9. igénypont szerinti eljárás *E. coli* gazdasejt előállítására, azzal jellemezve, hogy *E. coli* törzset transzformálunk.

11. 6-8. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pHJL200, pHJL201, pHJL202, pHJL203, pHJL204, pHJL205, pHJL210, vagy pHJL211 plazmiddal transzformálunk.

12. A 6-8. vagy 11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás transzformált *Streptomyces fradiae* gazdasejt előállítására, azzal jellemezve, hogy *Streptomyces fradiae* törzset pHJL201, pHJL210 vagy pHJL211 plazmidok valamelyikével transzformálunk.

13. A 6-9. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, transzformált *E. coli* K 12 C600R_k-M_k-törzs előállítására, azzal jellemezve, hogy *E. coli* K 12 C600R_k-M_k- törzset pHJL210 vagy pHJL211 plazmiddal transzformálunk.

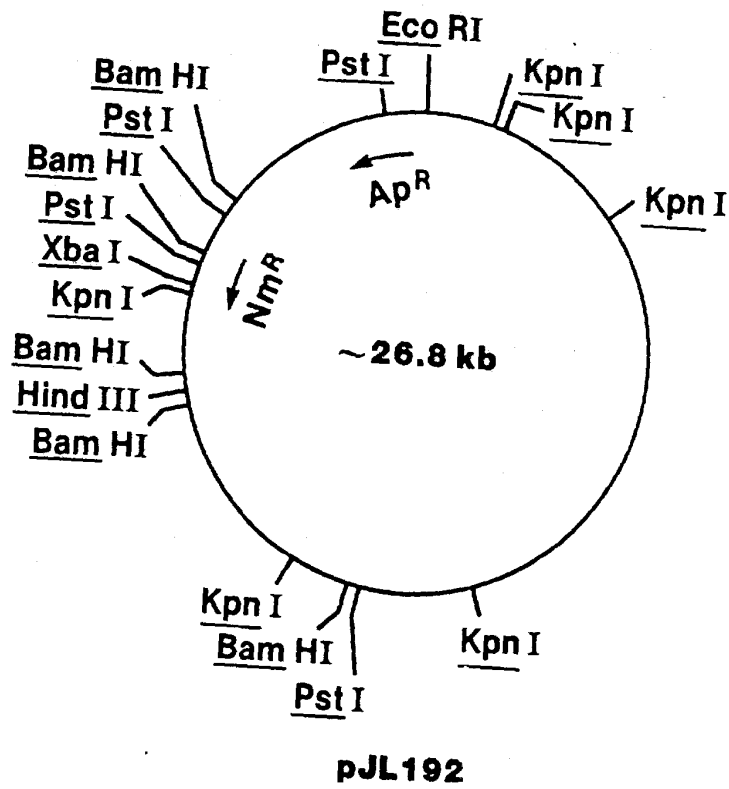
6 ábraoldal

A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója

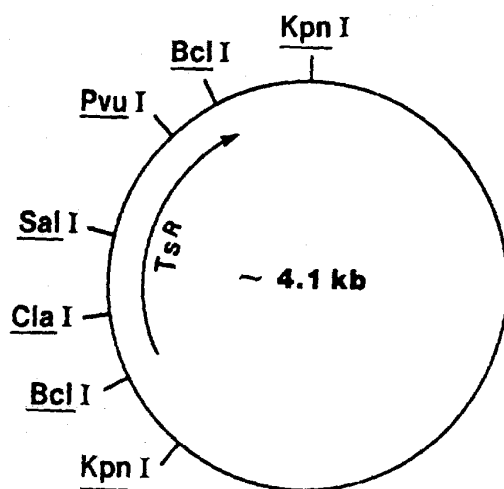
90.2044.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató

15

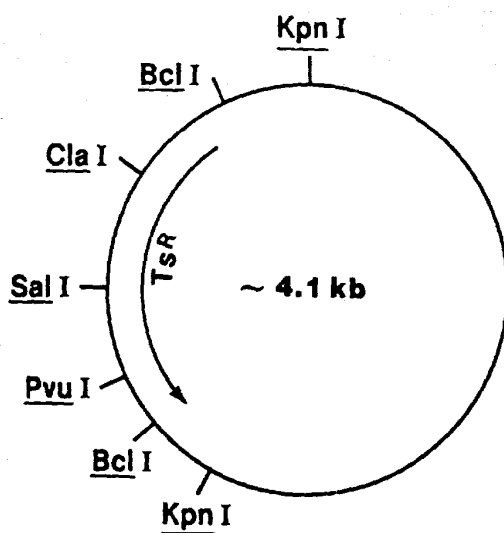
1. ábra



2. ábra

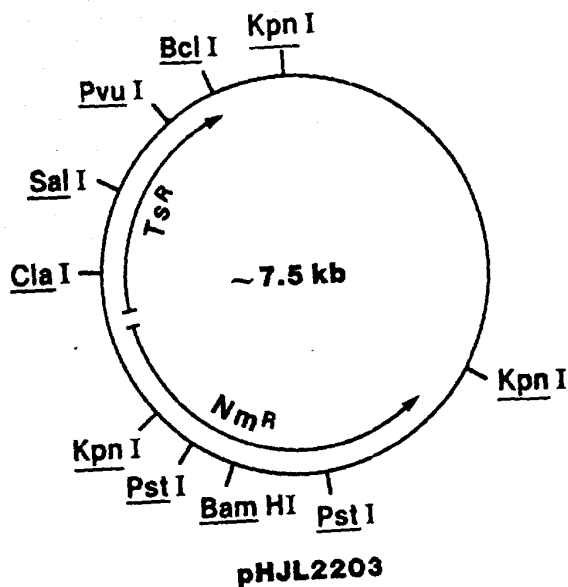
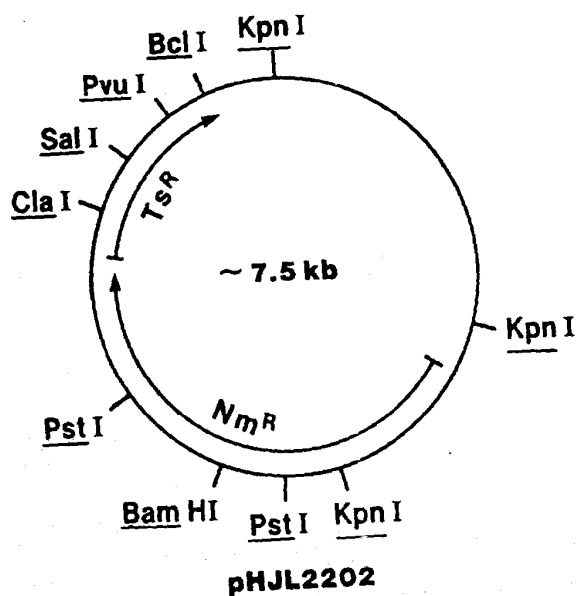


pHJL2200

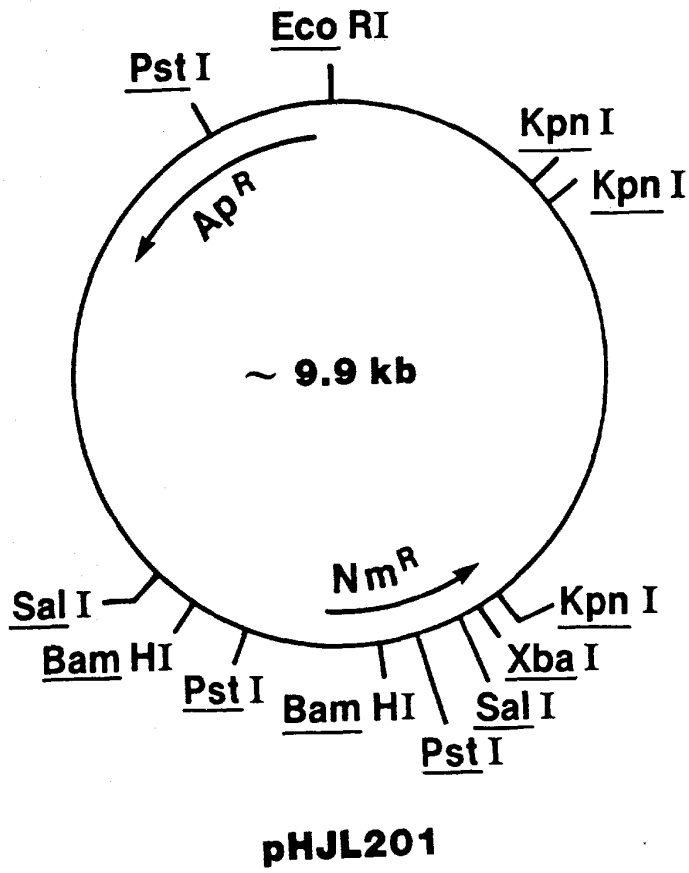


pHJL2201

3. ábra



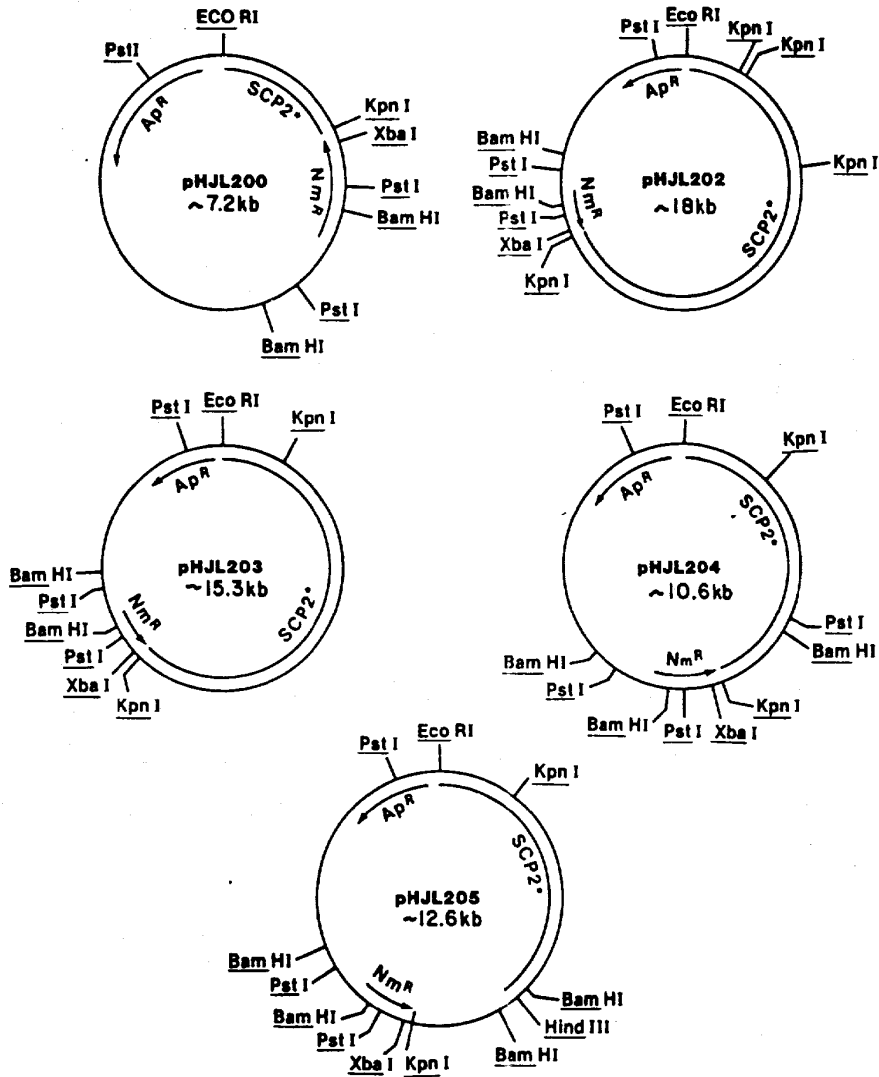
4. ábra



197352

Nemzetközi osztályozás:
C 12 N 15/00

5. ábra



6. ábra

