



F1000104494B



SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 104494 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

15.02.2000

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/00, 15/10, 15/63, 1/21

(21) Patentihakemus - Patentansökning

884346

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

21.09.1988

(24) Alkupaiva - Löpdag

21.09.1988

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

22.03.1989

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

21.09.1987 HU 4245/87 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Biogal Gyógyszergyár, Pallagi ut 13, 4042 Debrecen, UNKARI, (HU)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Kiss,György Botond, Karasz u. 16, 6720 Szeged, UNKARI, (HU)

2 •Vincze,Éva, Jankovich u. 11, 6726 Szeged, UNKARI, (HU)

3 •Ott,István, Benczur u. 2, 1068 Budapest, UNKARI, (HU)

4 •Kiss,Péter, Építő u. 13/a, 6723 Szeged, UNKARI, (HU)

5 •Klupp,Tibor, Zöldlomb u. 19, 1025 Budapest, UNKARI, (HU)

6 •Molnár,István, Kossuth L. u. 32, 1121 Budapest, UNKARI, (HU)

7 •Szeleczy,Zoltán, Kolozsvár u. 7, 1182 Budapest, UNKARI, (HU)

8 •Ambrus,Gábor, Csalán u. 45/b, 1025 Budapest, UNKARI, (HU)

9 •Moravcsik,Imre, Mester u. 38, 1095 Budapest, UNKARI, (HU)

(74) Asiamies - Ombud: Seppo Laine Oy

Itämerenkatu 3 B, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uudet kloonausvektorit, menetelmät niiden valmistamiseksi, menetelmä DNA-sekvenssien kloonaukseksi ja vastaavasti geenikirjastojen valmistamiseksi

Nya kloningsvektorer, förfarande för framställning av dessa, förfarande för kloning av DNA-sekvenser eller respektive för bildning av genbanker

(83) Mikro-organismitaletus - Deposition av mikroorganism: B 000169 NCAIM B 000274 NCAIM B 000356 NCAIM
B 000357 NCAIM B 000358 NCAIM B 000359 NCAIM
B 001006 NCAIM B 001007 NCAIM B 001008 NCAIM
B 001009 NCAIM B 001010 NCAIM B 001011 NCAIM
B 001012 NCAIM

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1. painos, 1982, p. 13-15, 133-134, 269-274, Nature 286, 1980, p. 527-529, Nature 327, 1987, p. 532-535, Gene 17, 1982, p. 27-44, Gene 40, 1985, p. 259-266

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

keksinnön kohteena on transfamidiksi nimitetty, plasmidin ja fagin sekvenssejä sisältävä uusi DNA:n kloonausvektori sekä uudentyypiset fasmidivektorit. Transfamidi sisältää replikaatiokohdan ja antibioottien suhteen resistentiksi tekeviä geenejä ja se soveltuu valintaan. Yhdistelmä-molekyylit voidaan eristää haluttaessa joko fagina tai plasmidina. Uuden

kloonausmenetelmän mukaisesti DNA käsitellään ennen yhteensuostamista fosfataasilla, jonka ansiosta estetään konkatemerien muodostus ennen pakkaamista in vitro. Tällä tavalla saadut tai konkatemereistä terminaasientsyymillä valmistetut monomeeriset DNA-molekyylit voidaan pakata in vitro yhtä suuruusluokkaa tehokkaammin fageihin, kuin mitä on ollut mahdollista tähän asti tunnetuilla kloonausvektoreilla ja -menetelmillä.

Uppfinningen avser en ny DNA-kloningsvektor, som kallas transfamid och som innehåller plasmid- och fagekvenser, samt fasmidvektorer av ny typ. Transfamiden innehåller en replikationspunkt och gener som gör den resistent mot antibiotika och den lämpar sig för selektion. Rekombinantmolekylerna kan, om så önskas, isoleras antingen som fag eller plasmid. Enligt det nya kloningsförfarandet behandlas DNA-t före ligationen med fosfatas, varigenom bildningen av konkaterer före packandet in vitro förhindras. De på detta sätt erhållna eller från konkatererna medelst enzymet terminas framställda monomera DNA-molekylerna kan packas in vitro i fager en storleksordning effektivare än vad som varit möjligt vid de hittills kända kloningsvektorerna och -förfarandena.

Uudet kloonauksvektorit, menetelmät niiden valmistamiseksi, menetelmä DNA-sekvenssien kloonauksiksi tai vastaavasti geenikirjastojen valmistamiseksi

Keksinnön kohteena ovat uudet kloonauksvektorit, menetelmät niiden valmistamiseksi ja menetelmä DNA-sekvenssien kloonauksiksi tai vastaavasti geenikirjastojen valmistamiseksi.

On tunnettua, että käyttämällä geeniteknologisia menetelmiä voidaan eristää geenejä tai geenin sisältäviä DNA-pätkiä, siirtää ne erilaisiin eläviin soluihin ja saada niihin sisältyvä geneettinen informaatio ilmentymään. Uusi bioteknologia on siitä syystä menestyksellinen, että

- deoksiribonukleiinihappo voidaan leikata restriktioendonukleaaseilla kulloinkin kyseessä olevassa nukleotidisekvenssissä,
- DNA-pätkät voidaan liittää yhteen kovalenttisesti biologisilla ja kemiallisilla menetelmillä,
- on löydetty prokaryoottisissa ja eukaryoottisissa järjestelmissä toimivia DNA-molekyylejä, nk. DNA:n kloonauksvektoreita, joita voidaan lisätä replikaatiivisesti isäntäsolussa, ja joihin vieraita DNA-alueita voidaan sisällyttää, ja
- yhdistelmä-DNA voidaan siirtää prokaryoottiin tai eukaryoottiin soluihin ja valita vieraan geneettisen informaation sisältävät solut.

Geenin kloonauks muodostuu siten, että synteessillä, käänteistransskriptaasin tai restriktioendonukleaasin avulla valmistettu DNA-pätkä siirretään vektori-DNA:han, joka soveltuu replikoivatavaksi isäntäsolussa, ja sitten tämä yhdistelmä siirretään transformaation avulla soluun. Valmistettaessa geenikirjastoja eristetään bakteerikantoja, joiden kokonaisuus sisältää kulloinkin kyseessä olevan solun kaikki geenit, s.o. sen täydellisen genomin. Kantakokoelma, joka sisältää bakteerin koko geenistön, voidaan saada teo-

reettisesti siten, että kloonataan 5000 emäsparista koostuvat pätkät ja eristetään 400 transformanttia.

Kloonattaessa aikaisemmin valittuja geenejä ja koottaessa geenikirjastoja on käytetyllä DNA:n kloonausvektorilla ratkaiseva merkitys. On tärkeää, että vieraan geneettisen informaation sisältävä DNA-vektori saapuu suurella todennäköisyydellä transformoitavaan soluun. Kloonaukskoekiden tulokseen vaikuttaa olennaisesti se, millaisena määrösuutena kyseisen geenin sisältävät DNA-pätkät esiintyvät transformaatiossa käytetyssä, erilaisia DNA-pätkiä sisältävässä seoksessa. On selvää, että määrätyn geenin transformaatiotaajuus on sitä suurempi, mitä useampi halutun pätkän sisältävistä yhdistelmä-DNA-vektoreista pääsee transformaatiossa elävään soluun.

Kirjallisuuden mukaisesti käytetään vektori-DNA:na plasmideja, fageja tai vastaavasti virus-DNA:ta, kosmideja ja fasmideja.

Plasmidit ovat ekstrakromosomaalisia geneettisiä elementtejä, jotka ovat kromosomista riippumattomasti replikoituvia, rengasmaisia DNA-molekyylejä. Ensimmäisellä vektorina käytettävällä plasmidilla oli merkintä pSC101. Myöhemmin on esitetty vielä useita muita, esimerkiksi ColE1, pBR322, pBR328, pMB9, pIJ702 tai pIJ41.

E. colissa lisääntyvää lambda-fagia on tutkittu perusteellisesti; nykyisin käytetään kloonaukseen lambda-fagimutantteja. Villin lambda-fagin DNA:n koko on 49 ke. Bakterisolun infektoinnin jälkeen fagi voi lisääntyä lysogeenisessä tai lyyttisessä syklissä. Jos fagia käytetään kloonavana vektorina, sen replikaation on tapahduttava lyyttisessä syklissä, jolloin infektion jälkeen lambda-DNA:n kohesiiviset päät (cos-päät, sticky ends) yhdistyvät keskenään ja tapahtuu kaksirihmaisen, rengasmaisen DNA:n replikaatio. Fagi

sisältää n. 50 geeniä, mutta sen kasvuun ja plakkien muodostumiseen tarvitaan kuitenkin ainoastaan 25. Ei-olennaiset DNA-osat voidaan leikata pois ja korvata vieraalla DNA:lla. Yhdistelmä-lambda-DNA käyttäytyy kuten lambda-DNA. Plasmiidiin verrattuna fagivektorilla on se etu, että se voidaan muodostaa in vitro lambda-fageiksi ja transdusoida in vitro suoritetun pakkaamisen jälkeen suurella taajuudella E. coliin. (Fagien "pakkaaminen": fagi-DNA:ta inkuboidaan fagin päitä, fagin häntiä ja entsyymiä sisältävässä seoksessa, jolloin fagi itse "tekee itsensä täydelliseksi". Vrt. myös: Yhdistäminen ja morfogeneesi, viruskomponenttien muodostaminen valmiiksi virioniksi). Ensimmäiset fagivektorit olivat lambda-gt WES, NM 641, NM 762 ja Charon-sarja (3, 21a jne.).

Kosmidit sisältävät plasmidista peräisin olevan osan ja lambda-fagien kohesiiviset päät kaksirihmaisen DNA:n muodossa (cos-paikka). Pakkausjärjestelmä tunnistaa cos-paikkaa lähellä olevan lyhyen osan in vitro ja in vivo. Samassa suuntauksessa kaksi cos-paikkaa sisältävät DNA:t, joiden cos-sekvenssit on erotettu osalla, jonka pituus on n. 35 - 53 ke, voidaan pakata in vitro ja transdusoida E. coliin. Bakterin sisällä kosmidi esiintyy rengasmuodossa, mutta ei joudu lyyttiseen sykliin, koska se ei sisällä kaikkia olennaisia lambda-geenejä. Samanaikaisesti voidaan kuitenkin, samoin kuin plasmidien ollessa kloonaavia vektoreita, erottaa positiiviset transformantit fenotyyppisen valinnan avulla, esimerkiksi perustuen niiden resistenssiin antibioottien suhteen. Kosmidivektoreita ovat esimerkiksi pJC74, pJC720 tai MUA-3 ja pJB8. (Kirjallisuus: Genetic Engineering, toim. Robert Williamson; Dahl et al., s. 49 - 69, 1981, Academic Press, Lontoo).

Nykyisin kloonausvektoreina käytetään myös fasmideja. Fasmidi on fagina eristettävä, DNA:n kloonausvektori, joka sisältää kohesiivisten päiden lisäksi kloonnattavan DNA:n sijoituspaikassa E. coli-replikaatiokohdan ja antibiootin

suhteen resistentiksi tekevän geenin. Kloonattavan pätkän sijoittamisen jälkeen plasmidiosa poistetaan ja hybridimolekyyli käyttäytyy sitten ainoastaan kuten yhdistelmäfagi eikä sitä voida erottaa tästä (Karn, J. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77, 5172 - 5176, 1980).

On tunnettua, että kloonattava DNA-pätkä voidaan siirtää eri tavoin vektori-DNA:han. Jos vektori-DNA ja kloonattavan geenin sisältävä deoksiribonukleiinihappo katkaistaan samalla restriktioendonukleasilla, niin saadaan nk. tarkertuvia päitä sisältäviä pätkiä, jotka voidaan liittää yhteen DNA-ligaasilla. Vieras DNA voidaan siirtää vastaavassa suuntauksessa vektoriin, mutta tietenkin voivat yhdistyä myös vieraiden DNA-molekyylien tarkertuvat päät keskinäisesti, vektori-DNA:n takertuvat päät keskinäisesti ja keskenään, jolloin syntyy erittäin suuri määrä uusia DNA-molekyyliä. Kun vektorin molemmat päät yhdistyvät keskenään, muodostuu jälleen alkuperäinen vektori, ja vektori tuottaa myös optimaalisisessa moolisuhteessa haluttuja rekombinantteja moninkertaisen määrän. Alkuperäisten vektorien syntyminen on haitallista ja siitä syystä plasmidivektorien kovalenttisesti rengasmuotoiseksi suljettuna muotona (seuraavassa ccc-muoto) eristetty DNA katkaistaan restriktioendonukleasilla, saatu lineaarinen DNA käsitellään alkalisella fosfataasilla ja vasta sitten sijoitetaan vastaavalla entsyymillä käsitelty, kloonattava pätkä. Tällä tavalla voidaan yhteenliitettäessä estää vektori-DNA:n sulkeutuminen uudestaan renkaaksi, sillä fosfataasilla suoritettussa käsittelyssä poistuvat fosfaattiryhmät DNA:n 5'-päistä ja vastaavissa hydroksyyli-ryhmissä ei voi muodostua yhteenliitettäessä kovalenttista kemiallista sidosta. Yleisesti pätevän menetelmän yksityiskohdat on esitetty kuviossa 1.

Kuviosta 1 alan ammattihenkilö voi nähdä, että yhteenliittämisen jälkeen voi esiintyä erityyppisiä uusia DNA-molekyyliä, mutta ainoastaan esitetty rengasmuotoinen yhdistelmä-molekyyli on elinkykyinen.

Fosfataasilla käsitellyn vektorimolekyylin vapaiden 5'-päiden ja liitännäisen vapaiden 5'-päiden välinen kovalenttinen kemiallinen sidos muodostuu solun toimesta transformaation jälkeen - fosforyloitumisella ja yhteenliittymisellä in vivo. Molemmissa säikeissä yksittäissäiekatkoksia (nicks) sisältävät yhdistelmä-molekyylit pysyvät koossa in vitro komplementaaristen DNA-säikeiden välisillä vetysilloilla kaksois-säikeen muodossa. Erilaisten yhdistelmä-molekyylien määrä ja tyyppi riippuvat yhteenliittämisolosuhteista, kaikkien järjestelmään tuotujen molekyylien määrästä ja vektorin ja vieraan DNA-pätkän moolisuhteesta.

Kuviossa 2 on esitetty kaaviomaisesti tähän asti käytetyt kloonausvaiheet fagivektorin käyttöä varten. Fagina eristetyt, takertuvia päitä sisältävät lineaariset DNA-pätkät liitetään yhteen. Tällöin yhdistyvät fagit takertuvien päidensä kautta keskenään tai keskinäisesti kovalenttisesti. Tämän jälkeen katkaistaan vastaavalla entsyymillä keskisekvenssi, jossa ei ole mitään olennaisia geenejä, ja fosfataasikäsitellyn jälkeen saatu, päissään hydroksyyli-ryhmiä sisältävä vektori liitetään yhteen päissään ainoana fostaattiryhmiä sisältävän vieraan DNA-pätkän kanssa. Kuviossa 2 nähdään, että sopivissa olosuhteissa suoritettussa yhteenliittämässä muodostuu takertuvien päiden yhtymisen johdosta nk. konkatemeerinen muoto. Konkatemeerissä on olemassa vieraan DNA:n sisältävien osien lisäksi myös fagivektorin sisältäviä osia. Alan ammattihenkilölle on selvää, että yhteenliittämässä muodostuu useita koostumukseltaan erilaisia DNA-molekyyliä, jotka eivät kuitenkaan tuota mitään elinkykyisiä fageja. Yhteenliittämistuotteet sijoitetaan sitten pakkausseksessä fageihin ja fageilla transduoidaan sopiva isäntäsolu.

Ish-Horowitz ja Burke (Nucleic Acids Research 9, 2989 - 2998, 1981) ovat esittäneet fagivektoreihin perustuvan, kloonaukseen soveltuvan järjestelmän, jossa kosmidi, joka sisältää

cos-kohdan, katkaistaan reaktioastiassa cos-kohdan toiselta puolelta restriktioendonukleasilla ja toinen erä molekyyliä leikataan toisessa reaktioastiassa cos-kohdan toiselta puolelta toisessa restriktioekohdassa. Molemmat erät yhdistetään, lineaariset tuotteet käsitellään alkalisella fosfataasilla ja sitten pilkotaan kolmannella restriktioendonukleasilla. Kuvioista 3 nähdään, että etukäteen fosfataasilla käsitelty vieras DNA-sekvenssi voidaan sijoittaa paikalleen useissa kohdissa. Luonnollisesti voidaan pakata (koota, saada täydelliseksi) ainoastaan yksi ainoa tuote in vitro.

Esillä olevan keksinnön tekijöiden kokeissa on nyt todettu, että tähän asti käyttämätön, uudentyyppinen DNA:n kloonausvektori (työnimi: transfamidi) soveltuu DNA-pätkien kloonaukseen. Itse kloonaus suoritetaan kuten kloonattaisiin kosmidiin, lopputuotteet, yhdistelmä-DNA-molekyylit tuottavat kuitenkin elinkykyisiä fageja. Siten on mahdollista erottaa vieraan pätkän sisältävät rekombinantit erittäin yksinkertaisella ja tehokkaalla tavalla yksinomaan plasmidina elinkykyisistä molekyyleistä, jotka eivät sisällä mitään vierasta DNA:ta. Edelleen on todettu, että pakattaessa in vitro konkatemeerimuoto sulkeutuu vähintään yhtä suuruusluokkaa pienemmällä tehokkuudella fagihiukkaseen kuin lineaariset monomeerimolekyylit, ja että pakkaamisessa ei fosfaattiryhmien läsnäoloa välttämättä tarvita fagi-DNA:n takertuvissa päissä. Nämä molemmat havainnot sekä pyrkimys antaa muodostua mahdollisimman vähän erilaisia tuotteita liitännässä ovat johtaneet uuteen, tähän asti tuntemattomaan kloonauskaavioon ja uuteen DNA:n kloonausvektoriin.

Siten keksinnön kohteena on uusi kloonausjärjestelmä ja DNA:n kloonausvektorit, menetelmä uuden, transfamidiksi nimitetyn DNA:n kloonausvektorin valmistamiseksi sekä uudentyyppiset fasmidit ja menetelmä niiden valmistamiseksi.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä DNA-sekvenssien kloonauksi pakkaamalla yhdistelmä-lambda-fageja in vitro ja mo-

nistamalla fagit toimitaan siten, että kloonausvektorin kohesiivisistä 5'-päistä, joka vektori on eristetty lineaarisena DNA:na käsittelemällä restriktioendonukleaasilla, poistetaan fosfaattiryhmät fosfataasilla, lisätään keskinäiseen yhdistymiseen kykenemättömiin pätkiin kloonattavan geenin sisältävät, restriktioendonukleaasikäsittelyllä saadut, päissään fosfaattiryhmän sisältävät DNA-pätkät ja suoritetaan yhteenliittäminen ligaasilla, tai kohesiivisiä sekvenssejä sisältävä yhdistelmä-kloonausvektori, joka on tyypiltään fagi, kosmidi, fasmidi tai transfamidi, leikataan terminaasilla ja jommallakummalla tavalla saatu yhdistelmä-DNA pakataan in vitro (kootaan) ja sitten monistetaan fagi.

Uudessa kloonausjärjestelmässä voidaan käyttää uutta, keksinnön mukaista kloonausvektoria, transfamidia, mutta on myös mahdollista käyttää uudentyyppisiä insertiofasmideja.

Uuden kloonausvektorin ominaisuudet esitetään seuraavassa taulukossa vertaamalla tunnettuihin vektoreihin.

| Vektori | Plasmidi | Kosmidi | Fagi | Fasmidi | Transfamidi |
|----------------|----------|---------|--------|----------|-------------|
| Koko (ke) | 8 - 15 | 5 - 20 | 45 | 45 | 32 |
| <i>E. coli</i> | | | | | |
| Replikaatio | pl | pl | fagi | pl/fagi | pl |
| Eristys | ccc | ccc | fagi | ccc/fagi | ccc |
| Kloonaus | i | i | i/r | r | i |
| i:n koko (ke) | 0 - 30 | 20 - 45 | 9 - 22 | 9 - 22 | 5 - 18 |
| Lopputuote | pl | pl | fagi | fagi | pl/fagi |

i = insertio

r = substituutio

pl = plasmidi

ke = kiloemäs

Transfamidin rakentaminen tapahtuu keksinnön mukaisesti esimerkiksi siten, että E. colista eristetystä plasmidista,

esimerkiksi plasmidista pBR322 (Bolívar, F. et al., *Gene*, 2, 95 - 113, 1977) ja lambda-fagivektorista, esimerkiksi DNA EMBL4:stä (Frischauf, A. M. et al., *J. Mol. Biol.*, 170, 827 - 842, 1983) valmistetaan katkaisemalla restriktioendonukleaasilla ja yhteenliittämällä T4-DNA-ligaasilla 32,3 ke:n kokoine rengasmaisen DNA-vektori pGY95. Vektoria nimitetään transfamidityypiksi DNA-vektoriksi. Sen yksittäiset valmistusvaiheet on esitetty kuviossa 4.

Transfamidi sisältää cos-kohdan, ampicilliinin suhteen resistentiksi tekevän geenin, *E. coli*-replikaatiokohdan ja tetrazykliinin suhteen resistentiksi tekevän geenin, joka inaktivoituu BamHI-liittämisessä, mutta osittaisessa EcoRI-liittämisessä se pysyy kuitenkin koskemattomana. Transfamidi sisältää edelleen kaikki lambda-geenit, jotka tarvitaan lyyttiseen kasvuun. Tässä on transfamidin olennainen ominaisuus, nimittäin, että kloonauksen jälkeen, esimerkiksi vieraan DNA:n BamHI-kohtaan sijoittamisen jälkeen, ja pakkaamisen jälkeen in vitro syntyy elinkykyisiä fageja. Itse vektorista tai useiden vektoreiden yhdistelmästä (päinvastoin kuin kosmideissa) ei sopivasti valitun transfamidin koon johdosta voi syntyä mitään fageja (sinänsä liian pieniä, kaksinkertaisina tai useampikertaisina liian suurina).

Transfamidin pGY95 restriktiokartta ja funktionaalinen kartta on esitetty yksityiskohtaisesti kuviossa 5.

Transfamidiin pGY95 tapahtuvaa kloonausta varten suoritetaan kuvioista 6 nähtävät vaiheet. Transfamidi eristetään plasmidina, rengasmaisen DNA-molekyylin avataan käsittelemällä restriktioentsyymillä BamHI. Sitten lohkaistaan fosfaattiryhmät fosfataasilla. Pätkiin, jotka eivät pysty yhdistymään keskinäisesti, lisätään kloonattavan geenin sisältävät, BamHI:llä (tai BclIII:lla, BglII:lla, Sau3A I:llä tai MboI:llä) katkaisemalla saadut, päissään fosfaattiryhmän sisältävät pätkät ja suoritetaan seoksen yhteenliittäminen

ligaasilla. Jos vektorin ja vieraan DNA:n välinen suhde valitaan optimaalisesti, saadaan suurin mahdollinen määrä yhdistelmä-DNA-molekyylejä. Kloonattavan sekvenssin sisältävä transfamidi pakataan sitten in vitro. Tämän jälkeen osoitettavissa olevat fagit sisältävät kaikki yhdistelmä-DNA:ta. Tällä tavalla 10.000 yhdistelmätransfamidia, jos lasketaan 13 kiloemäksen liitännäisen mukaan, sisältää vähintään 10 kertaa yhden bakteerin koko genomien, kerran sienien genomien ja teoreettisesti neljänneksen nisäkään täydellisestä genomista.

Keksinnön mukaisen menetelmän lisäselvennystä varten kloonataan esimerkeissä yksityiskohtaisesti esitetyllä tavalla Streptomyces tenebrariusksen genomi transfamidiin pGY85. Str. tenebrariusksen koko DNA eristetään, katkaistaan Sau3A I:llä ja sakkaroosigradientissa eristetään 9 - 15 ke:n pätkät. Transfamidi pGY95 eristetään plasmidina, avataan Bam HI:llä ja fosfaattiryhmät poistetaan. Polyeteeniglykolin 6000 (PEG) läsnäollessa suoritetun yhteenliittämisen kautta valmistetaan in vitro fageja ja transdusoidaan fagitititterin määrittämiseksi E. coli-soluihin. Kontrollikokeissa ei muodostu fageja, s.o. plakkeja ei voida havaita, kun taas kloonaukskoikeessa voidaan osoittaa 15.000 yhdistelmäfagin läsnäolo. Yhteenliittämisessä saadaan yhdistelmä-molekyylejä ainoastaan konkatemeerimuodossa. Koska tämä muoto tuottaa pakattaessa in vitro alle kymmenesosan elinkykyisiä fageja verrattaessa monomeerimuodon tuottamaan määrään, konkatemeerit katkaistaan cos-kohdissa terminaasilla (Rackwitz et al., Gene 40, 259 - 266, 1985); tällä tavalla saadaan vähintään kymmenkertainen määrä rekombinantteja. Tällä tavalla voidaan esimerkeissä lähemmin esitetyllä menetelmällä saada yhdellä vaiheella geenikirjasto, joka edustaa moninkertaisesti Str. tenebrariusksen genomia.

Tämän osoittamiseksi eristetään itsenäisistä yhdistelmä-klooneista plasmidi-DNA, katkaistaan restriktioentsyymillä

EcoRI ja erotetaan muodostuneet DNA-pätkät toisistaan geelielektroforeesilla agarosissa. Kuviosta 13 nähdään, että yksittäiset kloonit sisältävät erikokoisia Str. tenebrariuk-sesta peräisin olevia EcoRI-pätkiä.

Keksinnön erään toisen edullisen suoritusmuodon mukaisesti valmistetaan fasmidityyppinen, fagina myös itsenäisesti elinkykyinen DNA-vektori. Esimerkiksi transfamidiin pGY95 voidaan sijoittaa BamHI:llä suoritettun avauksen jälkeen suunnilleen 11,0 ke:n kokoinen plasmidi pYF91 (Storms, R. K. et al., J. Bacteriol. 140, 73 - 82, 1979). Kokeen yksittäiset vaiheet nähdään kuviosta 4. Muodostunutta rengasmaista DNA pGY97:ä nimitetään kirjallisuuden mukaisesti (Elledge, S. J. ja Walker, G. C., J. Bacteriol., 162, 777 - 783, 1985) fasmidityyppiseksi DNA-vektoriksi. pYF91:n sijasta voidaan käyttää tietenkin myös muita sopivan kokoisia plasmideja tai DNA-pätkiä.

Fasmidi pGY97 sisältää olennaisten λ -fagigeenien lisäksi cos-kohdan, ampisilliinin suhteen resistentiksi tekevän geenin, E. coli-replikaatiokohdan ja tetrasykliinin suhteen resistentiksi tekevän geenin, joka inaktivoituu BamHI-liittämässä, mutta joka pysyy koskemattomana osittaisessa EcoRI-liittämisessä. Kloonauksessa vieraaseen DNA:han vaihdettava sekvenssi sijaitsee fasmidissa pGY97 kahden BamHI-kohdan välissä.

pGY97:n yksityiskohtainen restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 7.

Kloonauksessa suoritetaan olennaisesti kuviossa 8 esitetyt vaiheet. Fasmidi eristetään fagina ja katkaisemalla BamHI:llä poistetaan pätkä, joka ei sisällä mitään olennaisia fagigeenejä. Sitten poistetaan fosfaattiryhmät sekä kohesiivisista lambda-päistä että restriktiolohkaisulla saaduista takertuvista BamHI-päistä fosfataasilla. Seokseen,

joka sisältää kolme päissään hydroksyyliiryhmiä sisältävää ja tästä syystä keskinäiseen yhdistymiseen kykenemätöntä pät-kää, lisätään kloonattavan geenin sisältävät, katkaisemalla BamHI:llä (tai esim. BclI:llä, BglII:llä, Sau3A I:llä tai MboI:llä) saadut, päissään fosfaattiryhmän sisältävät pät-kät, ja suoritetaan seoksen yhteenliittäminen. cos-päät eivät yhdisty keskenään, koska ne eivät sisällä fosfaattiryhmää, s.o. konkatemeerejä ei voi muodostua, kloonattava pät-kä voidaan sijoittaa yksinomaan molempien cos-päiden väliin. Kloonattavien sekvenssien keskinäinen yhdistyminen voidaan käytännössä välttää valitsemalla oikein vektorin ja sijoitettavan pät-kä-DNA:n välinen suhde.

Kloonattavan sekvenssin sisältävä fasmidi pakataan tämän jälkeen in vitro. Jos yhteenliittäminen suoritetaan polyeteeniglykolin 6000 läsnäollessa (Pheiffer, B. H. ja Zimmermann, B., Nucleic Acids Res., 22, 7853, 1983), niin vektori-DNA:n 1 ug:aa kohden saadaan 10^5 - 10^6 yhdistelmä-DNA:ta sisältävää solua tai vast. tyhjiä täpliä (plakkeja) (ks. myös myöhemmin). Fosfataasikäsittelyn johdosta kaikki osoitettavissa olevat fagit tai plasmidin sisältävät solut sisältävät yhdistelmä-DNA:ta. Tämä merkitsee sitä, että eristettävissä olevat fagit tai yhdistelmäfasמידeja sisältävät solut sisältävät teoreettisesti, käytettäessä perustana 11 ke:n liitännäistä, mielivaltaisen bakteerin täydellisen genomien vähintään viisikymmentäkertaisesti, sienen täydellisen genomien kymmenkertaisesti ja teoreettisesti nisäkkään täydellisen genomien.

Jos kloonaus suoritetaan tähän asti tunnetuilla menetelmillä, tähän asti tavanomaisissa olosuhteissa ja tähän asti tavanomaisella kloonausjärjestelmällä, niin eristettävissä olevien rekombinanttien määrä on vähintään yhtä suuruusluokkaa pienempi.

Keksinnön mukaisten DNA:n kloonausvektorien ja keksinnön mukaisen kloonausjärjestelmän havainnollistamiseksi edelleen

kloonataan esimerkeissä yksityiskohtaisesti esitetyllä tavalla Medicago sativan (sinimailasen) genomi fasimidiin pGY97. Medicago sativasta eristetään koko DNA, katkaistaan Sau3A I:llä ja 9 - 15 ke:n pätkät eristetään sakkaroosi-gra-dientissa. Fasmidi pGY97 eristetään fagina, katkaistaan BamHI:llä ja vapautetaan fosfataasilla fosfaattiryhmistä. Polyeteeniglykolilla 6000 suoritettun yhteenliittämisen jäl-keen valmistetaan in vitro fageja, transdusoidaan E. coli-soluihin ja määritetään fagititteri. Kontrollikokeessa ei havaittu mitään fagiplakkeja, kloonaukskoikeessa voitiin osoittaa kuitenkin $5 \cdot 10^5$ fagia. Tämä osoittaa sen, että onnistuttiin kokoamaan geenikirjasto, joka muodostaa vähintään kerran Medicago sativan (sinimailasen) genomien.

Tämän osoittamiseksi eristettiin 12 toisistaan riippumatto-masta yhdistelmä-kloonista plasmidi-DNA, katkaistiin rest-riktioentsyymillä EcoRI ja restriktiopätkät erotettiin toi-sistaan geelielektroforeesilla agarosissa. Kuviosta 15 näh-dään, että yksittäiset kloonit sisältävät erikokoisia Medi-cago sativasta peräisin olevia EcoRI-pätkiä.

Uudentyyppisen fasmidin valmistamiseksi, joka sisältää myös Streptomyces-soluissa stabiilina pysyvän, antibioottiresis-tenssin antavan valintamerkin ja Streptomyces-replikaatio-kohdan, sijoitetaan keksinnön erään toisen edullisen suori-tusmuodon mukaisesti lambda-fagivektorista, esimerkiksi DNA EMBL4:stä (Frischauf, A. M. et al., J. Mol. Biol. 170, 827 - 842, 1983) BamHI:llä katkaistun keskimmäisen pätkän tilalle T4-DNA-ligaasilla liittämällä plasmidista pGYOKI1/2 BclI:llä leikattu 12,8 ke:n kokoinen DNA-osa molemmissa mahdollisissa suuntauksissa, jolloin muodostuvat rengasmaiset DNA:t pGYOKI9 ja pGYOKI10, joita nimitetään uudentyyppisiksi fas-midityyppisiksi DNA-vektoreiksi. Näiden uudentyyppisten vektoreiden (pGYOKI9 ja pGYOKI10) valmistuksen yksittäiset vaiheet on esitetty kuviossa 9.

Plasmidin pGYOKI1/2 valmistus on esitetty kuviossa 10 ja sen restriktio- ja toimintakartta kuviossa 11.

Uudentyyppiset fasmidit (pGYOKI9 ja pGYOKI10) ovat insertio-fagivektoreita, mutta ne ovat toimintakykyisiä myös plasmidivektoreina. Ne sisältävät cos-päät, E. colissa ja tästä riippumattomasti Streptomycesissä toimivat replikaatiokohdat, E. colissa ilmentyvän, kloramfenikolin suhteen resistentiksi tekevän geenin sekä resistenssigeenit, jotka ilmentyvät Streptomycesissä ja tekevät resistentiksi tiostreptonin sekä neomysiinin suhteen. Uudentyyppiset fasmidit sisältävät yhden ainoan BamHI-kohdan; jos tähän kloonataan, niin neomysiinin suhteen resistentiksi tekevä geeni menettää aktiivisuutensa.

pGYOKI9:n ja pGYOKI10:n yksityiskohtainen restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 12.

Kloonauksessa suoritetaan olennaisesti kuviossa 8 jo esitetyt ja fasmidikloonauksen yhteydessä selitetyt vaiheet. Uudentyyppiset fasmidit, joiden ensimmäiset edustajat ovat tässä esitetyt fasmidit pGYOKI8 ja pGYOKI10, muistuttavat muutoin jo esitettyä fasmidia pGY97; koska ensiksi mainitut ovat kuitenkin insertiovektoreita, ei vektorin valmistelussa muodostu keskimmäistä pätkää restriktioentsyymillä suoritetussa katkaisussa, kuten tapahtuu tähän asti tunnetuissa fasmideissa. Näissä hyödylliset, muutoin kloonaukseen kelpaavat sekvenssit muuttuvat yhteenliitettäessä tähän kelpottomiksi. Konkatemeerimuodostuksen välttämiseksi voidaan myös näiden uudentyyppisten fasmidien yhteydessä käyttää cos-päiden käsittelyä fosfataasilla, minkä johdosta kloonattavuuden taajuutta lisätään vähintään yhdellä suuruusluokalla.

Valmistettu, kloonattavan sekvenssin sisältävä uudentyyppinen fasmidi pakataan in vitro. Jos yhteenliittäminen suoritetaan polyeteeniglykolin 6000 läsnäollessa (Pheiffer, B. H.

ja Zimmermann, B., *Nucleic Acids Res.*, 22, 7853, 1983), niin saadaan koontiseoksella, jonka teho on $1 - 5 \cdot 10^7$ plakkia/ $1 \mu\text{g}$ ehjää lambda-DNA:ta (ks. myös myöhemmin), vektori-DNA:n $1 \mu\text{g}$:n suhteen laskettuna $10^5 - 10^6$ solua, jotka sisältävät yhdistelmä-DNA:ta. Fosfataasikäsittelyn tuloksena kaikki osoitettavissa olevat fagit tai plasmidin sisältävät solut sisältävät yhdistelmä-DNA:ta. Tämä merkitsee sitä, että yhdistelmä-DNA:ta sisältävät solut sisältävät teoreettisesti, käytettäessä perustana 10 ke:n liitännäistä, mielivaltaisen bakteerin koko genomien vähintään viisikymmentäkertaisesti, sienen genomien vähintään viisinkertaisesti ja teoreettisesti vähintään neljänneksen nisäkkään täydellisestä genomista.

Jos kloonaukseen suoritettaisiin tähän asti tunnetuissa olosuhteissa tähän asti tunnetuilla kloonauksjärjestelmillä, niin eristettävien rekombinanttien määrä olisi vähintään yhtä suuruusluokkaa pienempi.

Keksinnön mukaisen menetelmän ja DNA:n kloonauksvektorien havainnollistamiseksi edelleen kloonataan esimerkeissä yksityiskohtaisesti esitetyllä tavalla Streptomyces tendaen genomi uudentyypiseen fasmidiin pGYOKI9. Str. tendaesta eristetään koko DNA, katkaistaan Sau3A I:llä ja 5 - 9 ke:n DNA-pätkät eristetään sakkaroosi-gradientissa. Uudentyyppinen fasmidi pGYOKI9 eristetään fagina, katkaistaan BamHI:llä ja vapautetaan fosfataasilla fosfaattiryhmistä. Polyeteeniglykolin 6000 läsnäollessa suoritettun yhteenliittämisen jälkeen valmistetaan in vitro fageja ja E. coli-soluilla määritetään transduktion jälkeen fagititteri. Kontrollissa ei ole osoitettavissa mitään fageja tai vast. plakkeja, kun taas kloonaukskokeessa voidaan osoittaa 400.000 yhdistelmäfagin läsnäolo. Tämä osoittaa sen, että onnistuttiin valmistamaan geenikirjasto, joka sisältää vähintään kerran Str. tendaen genomien.

Keksinnön mukaisen menetelmän avulla valmistetut transfamidit (pGY95), fasmidit (pGY97) ja uudentyypiset fasmidit

(pGYOKI9 ja pGYOKI10), kun DNA:n (tai vektori-DNA:n) valmistuksessa käytetään uutta kloonaustragiaa (cos-päiden käsittely fosfataasilla, käsittely terminaasilla yhteenliittämisen jälkeen), voidaan eristää, kuten jo mainittiin, sekä fagina että plasmidina. Tämä on huomattava etu verrattuna tähän asti tunnettuihin vektoreihin, jotka voidaan eristää joko ainoastaan plasmidina tai ainoastaan fagina.

Uusia, kloonauksessa käyttökelpoisia DNA-vektoreita (transfamidi pGY95, fasmidi pGY97 ja uudentyyppiset fasmidit pGYOKI9 ja pGYOKI10) ei voida tietenkään valmistaa, mikä on alan ammattihenkilölle selvää, yksinomaan yllä lyhyesti selitetyllä ja esimerkeissä lähemmin selvitetyllä tavalla. Tällaisia vektoreita voidaan valmistaa myös leikkaamalla restriktioentsyymeillä muita plasmideja ja fagi-DNA:ita ja liittämällä tämän jälkeen tällöin saatuja tuotteita yhteen, ja samankaltaisia tuloksia saadaan, jos tällä tavalla saadut vektorit kloonataan keksinnön mukaisella tavalla. Mainitut kloonauksvektorit voidaan siten valmistaa ja kloonata esimerkiksi seuraavista plasmideista, fagi-DNA:ista ja kosmideista valmistetuilla vektori-DNA:illa: fagit: EMBL3, Lambda 1059 jne., plasmidit: pBR322, pYF91, pGYOKI3, pGYOKI4 jne., kosmidit: pJB8 jne.

Keksinnön mukaisella kloonauksjärjestelmällä on mm. seuraavat ilmeiset edut. Sen ansiosta, että konkatemeerien muodostus estetään käsittelemällä fosfataasilla tai vast. oligomeerit hajotetaan monomeereiksi käsittelemällä terminaasilla, lisätään fagien in vitro koottavuutta. (Mahdollisesti yhdistelmä-, s.o. vierasta DNA:ta sisältävistä) fasmideista (pGY97) ja uudentyyppisistä insertiofasmideista (pGYOKI9 ja pGYOKI10) voidaan valmistaa lineaarisia monomeerejä, kun fasmidit eristetään fagi-DNA:na.

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu tietenkin, mikä on ilman muuta selvää alan ammattihenkilölle, samoin tähän asti tunnetuille fagivektoreille kuin myös sellaisille, jotka

otetaan käyttöön vasta tulevaisuudessa, koska menetelmä on yleispätevä. Lopputuote voidaan eristää tähän asti tunnetuihin fagivektoreihin verrattuna sekä fagina että plasmidina. Tämä koskee myös transfamidilla pGY95 suoritettua kloonausta.

Kloonattaessa transfamidilla pGY95 muunnetaan yhteenliittämisen jälkeen saadut konkatemeerimuodot monomeereiksi käsittelemällä terminaasilla ja pakataan in vitro. Tämä menetelmä on tietenkin yleispätevä ja alan ammattihenkilö tietää, että sitä voidaan käyttää yhtä hyvin tähän asti tunnettuihin ja tulevaisuudessa vielä tunnetuiksi tuleviin transfamideihin ja kosmideihin.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja transfamideja (pGY95), fasmideja (pGY97) ja uudentyyppisiä fasmideja (pGYOKI9 ja pGYOKI10) käyttämällä saadut yhdistelmälopputuotteet voidaan eristää sekä fagina että plasmidina.

Tämä viimeksi mainittu etu syntyy siitä, että pakkaamalla in vitro muodostetut rekombinantit siirretään E. coli-soluihin, jotka majoittavat puutteellisen fagin, jossa on mutaatio CI_{ts} 587 (E. coli K1400). Siten estetään valmiiden fagien muodostus esimerkiksi 28°C:ssa CI-geenin määrittelemällä repressorivalkuaisaineella. 42°C:ssa kuitenkin repressorivalkuaisaine inaktivoituu ja muodostuu valmiita fageja. Tästä syystä yhdistelmä-molekyylit sisältävistä soluista muodostuu 42°C:ssa lyyttisen syklin toiminnan johdosta fageja tai vast. plakkeja, kun taas samoista soluista kehittyy 28°C:ssa selektiivisissä olosuhteissa, esimerkiksi kloramfenikolia tai ampisilliiniä sisältävissä kasvualustoissa, plasmideja sisältäviä bakteeripesäkkeitä.

Eräänä toisena keksinnön mukaisen kloonausjärjestelmän etuna on se, että verrattuna fagivektoreihin soveltuvat DNA:n kloonausmolekyylit valintaan. Ne sisältävät replikaatiokoh-

dan ja antibioottien suhteen resistentiksi tekeviä geenejä, jotka voidaan ilmentää E. colissa ja/tai Streptomycesissä.

Esitetyllä transfamidityyppisellä (pGY95) vektorilla on kosmideihin verrattuna se etu, että yhdistelmä-molekyylit ovat elinkykyisiä myös fageina, että elinkykyisiä fageja voi muodostua ainoastaan silloin, kun vektoriin on sijoitettu vierasta DNA:ta. Tämä merkitsee sitä, että rekombinantit voidaan eristää 100%:sella positiivisella valinnalla. Tällainen transfamidi-vektori voidaan valmistaa esimerkiksi siten, että fagivektoriin, esimerkiksi EMBL4:ään sijoitetaan esimerkiksi pBR322:sta tai pGYOKI1/2:sta peräisin oleva replikaatiokohta ja valinnan mahdollistava, antibiootin suhteen resistentiksi tekevä geeni. Sijoitetun osan on oltava niin pitkä, että kun se korvaa EMBL4:n keskimmäisen BamHI-pätkän, muodostuu muoto, joka voi osallistua replikaatioon ainoastaan plasmidina. Tällainen vektori on esimerkiksi transfamidi pGY95. Muodostuvan vektorin DNA-molekyylin monomeeriset, dimeeriset jne. muodot eivät pysty muodostamaan valmiita fageja molekyylipainoalueen johdosta, johon ne kuuluvat. Kloonnaessa kuitenkin, joka tapahtuu muutoin kuten kosmideissa, voidaan valita valmiita fagihiukkasia. Nämä ovat kaikki rekombinantteja, sillä itse vektorista ei voi muodostua esitetyistä syistä yhtään elinkykyistä fagia.

Keksinnön mukaisesti DNA-vektoreihin voidaan sijoittaa myös muita replikaatiokohtia, esimerkiksi replikaation Bacilluksessa, Saccharomycesissä, Cephalosporiumissa tai muissa bakteereissa, sienissä tai kasvi- tai eläinsoluissa mahdollistavia replikaatiokohtia.

Voidaan sijoittaa myös muiden antibioottien, esimerkiksi streptomysiinin, tobramysiinin, tiostreptonin, hygromysiinin tai metotreksataatin tai muiden yhdisteiden suhteen resistentiksi tekeviä geenejä. Myös nämä johdannaiset kuuluvat tarkoituksenmukaisesti keksinnön suojan piiriin.

Mikro-organismeja, jotka sisältävät keksinnön mukaisen DNA:n kloonauksvektorin, kasvatetaan kulloinkin kyseessä olevalle mikro-organismille edullisessa lämpötilassa orgaanisen hiililähteen, typpilähteen ja epäorgaanisia suoloja sisältävässä kasvualustassa. Yleensä kasvualustaa täydennetään mikro-organismin kasvulle välttämättömillä hivenaineilla, vitamiineilla jne., vaikkakin nämä aineet sisältyvät useimmiten kasvualustan makrokomponentteihin jo epäpuhtauksina. Mikro-organismeja fermentoidaan sinänsä tunnetulla tavalla ilmastetuissa pinnanalaisviljelmissä.

Hiililähteenä tulevat kysymykseen esimerkiksi glukoosi, maltoosi, tärkkelys jne., typpilähteenä epäorgaaniset suolat, peptoni, hiivauute, kaseiini tai fermentointiteollisuudessa yleisesti tunnetut muut aineet.

Fagit tai plasmidit eristetään sinänsä tunnetulla tavalla. Alan ammattikirjallisuus sisältää useita tätä koskevia viitejulkaisuja (esimerkiksi Helms et al., DNA, 4, 39, 1985). Myös lineaarinen DNA eristetään fageista sinänsä tunnetulla tavalla. Muutamia menetelmiä selitetään esimerkeissä.

Keksinnön mukaista menetelmää ja keksinnön mukaista kloonauksjärjestelmää selitetään seuraavassa esimerkkien avulla. Esimerkit ainoastaan havainnollistavat keksintöä rajoittamatta sitä millään tavoin.

Esimerkeissä esiintyvät kannat on talletettu Budapestin yliopiston puutarhanhoidon ja elintarviketeollisuuden osastolle (Budapester Universtität für Gartenbau und Lebensmittelindustrie) maatalous- ja teollisuusmikro-organismien kokoelmaan (NCAIM).

Esimerkeissä käytetyt kasvualustat ja liuokset

TA-kasvualusta: 10 g tryptonia (Bacto)

0,1 g hiivauutetta (Difco)

5 g natriumkloridia

liuotetaan 1 l:aan tislattua vettä, liuokseen lisätään 1 ml 0,1 M magnesiumkloridin vesiliuosta ja 1 ml 0,1 M kalsiumkloridiliuosta. Seosta steriloidaan 121°C:ssa 20 minuutin ajan.

TGE-liuos: 0,23 ml 40%:ista glukoosin vesiliuosta

0,25 ml 1 M tris-HCl:a (pH 8)

0,4 ml 0,15 M vesipitoista EDTA:ta
(Reanal Budapest)

9,12 ml ionivapaata vettä

NSE-liuos: 13,9 ml tislattua vettä

1,33 ml 3 M natriumhydroksidia

0,8 ml 25%:ista natriumlauryylisulfaatin
vesiliuosta

4 ml 0,25 M vesipitoista EDTA:ta

TE-liuos: 250 ml 0,01 M tris-HCl:a (pH 7,5)

1 ml 0,25 M vesipitoista EDTA:ta

SM-liuos: 20 ml 1,0 M tris-HCl:a (pH 7,5)

5,8 g NaCl:a

2,0 g magnesiumsulfaattia

20 g gelatiinia

tislattua vettä ad 1 litraan. Liuosta steriloidaan 121°C:ssa 20 minuutin ajan.

NTM-puskuri: 10 ml 1,0 M NaCl-liuosta
20 ml 1,0 M tris-HCl:a (pH 7,5)
10 ml 1,0 M MgCl₂:a
960 ml ionivapaata vettä

EC-puskuri: 340 µl 3 M NaCl:n vesiliuosta
2000 µl 1 M tris-HCl:a (pH 7,5)
120 ml 1 M MgCl₂:a
8,4 µl merkaptoetanolia
7430 µl tisl. vettä

L-liuos: 1,25 ml 1 M tris-HCl:a (pH 8)
0,25 ml 1 M vesipitoista MgCl₂:a
0,5 ml 1 M ditiotreitolia (BRL, Maryland,
USA)
30,3 mg adensiinitrifosfaattia
3 ml ionivapaata vettä

B-puskuri: 1000 µl 3 M vesipitoista NaCl:a
120 µl 1 M tris-HCl:a (pH 7,5)
120 µl MgCl₂:a
8,4 µl merkaptoetanolia
8650 µl tisl. vettä

D-puskuri: 50 ml 80%:ista sakkaroosia
0,01 g bromifenolisiniä
0,4 ml 1 M tris-HCl:a (pH 7,5)
4 ml tisl. vettä

BeM-kasvualusta: 1,0 % dekstriiniä
 0,1 % hiivauutetta
 0,2 % hydrolysoitua kaseiinia
 0,1 % lihauutetta (LabLemco)
 0,001 % kobolttikloridia
 2,0 % agaria (Bacto)
 vesijohtovettä täydennystä varten

BI-kasvualusta: 0,3 % hiivauutetta
 0,5 % peptonia
 0,3 % mallasuutetta
 1,0 % glukoosia (erikseen steriloitu)
 0,1 % magnesiumkloridia
 17,0 % sakkaroosia

Lysotsyymi-liuos:

100 ml 10,3%:ista sakkaroosi-liuosta
 1 ml 2,5%:ista kaliumsulfaattiliuosta
 1 ml 0,5%:ista kaliumdivetyfosfaatti-
 liuosta
 0,1 ml 2,5 M MgCl₂:a
 1 ml 0,25 M CaCl₂:a
 2,5 ml 1 M tris-HCl:a (pH 8,0)
 4 ml 50%:ista glukoosiliuosta
 100 mg lysotsyymiä (Reanal, Budapest)

NESP-puskuri: 128 ml tisl. vettä
 5 ml 3 M NaCl:a
 30 ml 0,250 EDTA:ta
 30 ml 10%:ista natriumlauryylisulfaattia
 3 ml proteinaasiliuosta (20 mg/ml,
 Merck)

GVI/b-kasvualusta: 0,1 % kalsiumkarbonaattia
0,1 % kaliumnitraattia
0,1 % kaliumdivetyfosfaattia
0,5 % ammoniumnitraattia
0,05 % natriumkloridia
0,05 % magnesiumsulfaattia
0,1 % asparagiinia
2,0 % vesiliukoista tärkkelystä
1,9 % agaria (Bacto)

Vedellä täydennetyn kasvualustan pH-arvo säädetään ennen sterilointia arvoon 7,3, sitten steriloidaan 121°C:ssa 30 minuutin ajan.

Esimerkki 1

Plasmidin pBR322 valmistus

a) Escherichia coli pBR322:n (MNG 359) viljely

Kantaa E. coli pBR322 (MNG 359) säilytetään -20°C:ssa. Sitä viljellään 28°C:ssa stationaarisen kasvuvaiheen saavuttamiseen asti TA-kasvualustalla. 3 ml:aan viljelmää sekoitetaan 0,225 ml dimetyylisulfoksidia, jäädytetään äkkiä -70°C:seen ja varastoidaan tässä lämpötilassa.

Solujen viljelemiseksi steriloidaan 100 ml TA-kasvualustaa 500 ml:n erlenmeyerpullossa. Steriili kasvualusta ympätään 0,1 ml:lla jäädytetyssä tilassa varastoitua viljelyä. Erää viljellään 28°C:ssa 16 tunnin ajan ravistelulaitteessa, jonka nopeus on 200 min⁻¹.

b) Plasmidin pBR322 eristys

Kohdan a) mukaisesti valmistettu viljelmä lingotaan Sorvall RC5-lingossa 4°C:ssa kierrosluvun ollessa 8000 min⁻¹. Solut suspendoidaan 10 ml:aan TGE-liuosta. Suspensioon lisätään 20

ml NSE-liuosta. Kirkastuvan lyaatin annetaan seistä huoneen lämpötilassa 5 minuutin ajan, sitten siihen lisätään 15 ml 5 M natriumasetatiliuosta (pH 4,8) ja annetaan seistä 5 minuutin ajan 0°C:ssa. Muodostunut suspensio lingotaan 0°C:ssa roottorissa, jonka kierrosluku on 10.000 min⁻¹, 5 minuutin ajan. Emälius erotetaan ja siihen lisätään 0,54 tilavuusosaa isopropanolia, jonka lämpötila on -20°C. Erän annetaan seistä -20°C:ssa 30 minuutin ajan. DNA-sakka erotetaan 0°C:ssa linkoamalla kierrosluvulla 10.000 min⁻¹. Sakka pestään 10 ml:lla 70%:ista etanolia ja kuivatetaan sitten eksikkaattorissa. Tuote liuotetaan 7 ml:aan TE-liuosta. Saatun 7 ml:aan liuosta liuotetaan 7,5 g cesiumkloridia (SERVA), sitten lisätään 0,5 ml liuosta, joka sisältää 10 mg etidiumbromidia millilitraa kohden. Sitten erä lingotaan roottorissa T865.1 15°C:ssa 48 tunnin ajan kierrosluvulla 39.000 min⁻¹ Sorvall OTD-50B-ultralingossa. Fluoresoiva alempi kaista poistetaan injektioneulalla, etidiumbromidi uutetaan 3 kertaa isopropanolilla. Saatu, plasmidi-DNA:n sisältävä liuos dialysoidaan 1000-kertaisesti laimennettua steriiliä TE-liuosta vastaan. Tällä tavalla saadaan plasmidin pBR322 puhdas DNA. DNA-konsentraatio lasketaan mittamalla optinen läpäisevyys 260 nm:ssä (OD₂₆₀-yksikkö vastaa DNA-määrää 50 g/ml).

Plasmidin yksityiskohtainen restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 4.

Esimerkki 2

Fagin EMBL4 eristäminen

a) Fagin EMBL4 puhdistus

Fagin kantaliuos varastoidaan 4°C:ssa kloroformilla valmistetussa suspensiossa (Frischauf et al., J. Mol. Biol., 170, 827 - 842, 1983). 4 ml:aan fagisuspensiota EMBL4, joka lysoi TA-kasvualustalla kasvavan kannan E. coli NM526 (NCAIM B /P/1006), lisätään 0,1 ml kloroformia, erää ravistellaan perusteellisesti ja se varastoidaan 4°C:ssa.

Fagikantaliuosta laimennetaan niin paljon, että muodostuu toisistaan erillään olevia plakkeja; niillä infektoidaan E. coli NM526:n solut. Yksinäinen plakki poimitaan ja suspendoidaan 1 ml:aan SM-puskuria. Suspensiota ravistellaan hieman 0°C:ssa 4 - 6 tunnin ajan. 0,1 ml:sta fagisuspensiota valmistetaan maljalysaatti. Maljaa inkuboidaan 37°C:ssa 8 - 12 tunnin ajan. Täysin kirkastuneeseen levyyn lisätään 6 ml SMpuskuriä ja inkuboidaan 0°C:ssa hieman ravistellen.

5 ml tätä lysaattia lisätään 500 ml:ssa TA-kasvualustaa eksponentiaalisesti jakaantuvaan (OD600 = 0,3) bakteeriviljelmään, jota inkuboidaan sitten 37°C:ssa ravistelulaitteessa. Viljelmän OD600-arvo mitataan joka 30. minuutti. Kun minimi saavutetaan, niin viljely jäähdytetään huoneen lämpötilaan ja siihen lisätään 5 ml kloroformia. Erää ravistellaan, siihen lisätään RNAasia (SIGMA), kunnes saavutetaan loppukonsentraatioksi 1 g/ml, ja inkuboidaan vielä 30 minuutin ajan.

500 ml:aan viljelyä lisätään 29,2 g kiteistä keittosuolaa, suola liuotetaan sekoittaen ja liuoksen annetaan seistä tunnin ajan. Sitten poistetaan rikkoutunut solumateriaali linkoamalla (roottorin kierrosluku 11.000 min^{-1}). Lingotaan 4°C:ssa 10 minuutin ajan. Kirkas supernatantti kerätään ja siihen lisätään polyeteeniglykolia 6000 (PEG, FLUKA), kunnes sen loppukonsentraatio on 10 %. Sen jälkeen kun PEG on liuennut, erän annetaan seistä 0°C:ssa tunnin ajan ja sitten sakka erotetaan linkoamalla (roottorin kierrosluku 11.000 min^{-1}) 4°C:ssa 10 minuutin ajan. Supernatantti poistetaan, sakka suspendoidaan varovasti 8 ml:aan SM-liuosta ja uuteetaan samalla tilavuudella kloroformia. Molemmat faasit erotetaan toisistaan linkoamalla ja vesifaasiin lisätään ml:aa kohden 0,5 g cesiumkloridia (SERVA). Sen jälkeen kun kaikki on liuennut, fagisuspensio kerrostetaan varovasti cesiumkloridi-konsentraatiogradientissa.

Gradientti valmistetaan seuraavasti:

| <u>Liuos</u> | <u>Tiheys (g/ml)</u> | <u>CsCl (g)</u> | <u>SM (ml)</u> | <u>refraktiokerroin (n)</u> |
|--------------|----------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| a | 1,45 | 60 | 85 | 1,3768 |
| b | 1,50 | 67 | 82 | 1,3815 |
| c | 1,70 | 95 | 75 | 1,3990 |

Liuoksesta c pipetoidaan 3 ml muoviseen linkoputkeen SW28 (Sorvall), tämä peitetään varovasti 3 ml:lla liuosta b ja tämän päälle laitetaan 4 ml liuosta a. Tämä gradientti peitetään nyt 20 ml:lla fagisuspensiota. Sorvall OTD-50B ultralingossa putkea lingotaan roottorissa SW28 kierrosluvulla 22.000 min^{-1} 4°C :ssa 2 tunnin ajan. Fagikaista (opaali kaista liuosten a ja b välissä) imetään pois injektioneulalla ja siihen lisätään niin paljon CsCl-liuosta, jonka konsentraatio on 1,5 g/ml, että lopputilavuus on 10 ml. Tämä liuos kaadetaan muoviseen linkoputkeen ja lingotaan roottorissa SW50.1 4°C :ssa ja kierrosluvulla 38.000 min^{-1} yllä mainitulla lingolla 24 tunnin ajan.

Fagikaista kerätään injektioneulalla ja dialysoidaan NTM-liuoksen 1000-kertaista määrää vastaan.

b) Fagi-DNA EMBL4:n valmistus

Dialyysin jälkeen 1,0 ml:aan fagisuspensiota lisätään EDTA:ta (500 mM, pH 8,0, 20 mM:n loppukonsentraatioon), proteinaasia K (50 $\mu\text{g/ml}$) ja natriumlauryylisulfaattiliuosta (SDS, 20 %, 0,5 %:n loppukonsentraatioon). Seosta inkuboidaan 37°C :ssa tunnin ajan.

Pilkkoutumisen jälkeen liuokseen sekoitetaan varovasti fenolin ja kloroformin 1:1-seosta, sitten molemmat faasit erotetaan toisistaan linkoamalla (10 minuuttia, 10.000 min^{-1}). Vesifaasi dialysoidaan 1000-kertaista TE-puskurin määrää vas-

taan. DNA-konsentraatio määritetään esimerkissä 1 esitetyllä tavalla.

Fagin restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 4.

Esimerkki 3

Transfamidin pGY95 valmistus

12,5 µl esimerkin 1b) mukaisesti puhdistettua plasmidin pBR322 DNA-liuosta lisätään 12,5 µl:aan EC-puskuria. Reaktioseokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä EcoRI (BRL, Maryland, USA) ja seoksen annetaan seistä 37°C:ssa tunnin ajan.

12,5 µl esimerkin 2b) mukaisesti puhdistettua EMBL4:n DNA:ta lisätään 12,5 µl:aan EC-puskuria ja seokseen lisätään sitten 5 yksikköä restriktioentsyymiä EcoRI. Myös tätä seosta inkuboidaan 37°C:ssa tunnin ajan.

Restriktioentsyymi EcoRI leikkaa molemmat DNA:t sekvenssissä GAATTC. Kumpaankin DNA:han syntyy katkaisussa neljästä emäsparista koostuvat ulkonevat päät (takertuvat päät, sticky ends), jotka ovat komplementaarisia toistensa suhteen ja tästä syystä ne voivat yhdistyä keskenään kaikissa yhdistelmissä.

Molempia reaktioseoksia pidetään 10 minuutin ajan 68°C:ssa ja sitten ne yhdistetään. Lineaariset DNA-molekyylit sisältävään liuokseen lisätään 12,5 µl L-liuosta. Seos täydenne-
tään, jotta lineaariset DNA-molekyylit voivat yhdistyä, yhdellä yksiköllä T4-DNA-ligaasia (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan 15°C:ssa 16 tunnin ajan. Nyt muodostuu reaktioseoksessa transfamidi pGY95. Transfamidin pGY95 valmistuksen kaaviomainen kulku on esitetty kuviossa 4. Kuv. 5 esittää plasmidin yksityiskohtaista restriktio- ja toimintakarttaa.

Esimerkki 4E. coli pGY95:n (MNG 356) valmistus

10 µl:lla esimerkin 3 mukaisesti valmistettua, transfamidin pGY95 sisältävää reaktioseosta transformoidaan E. coli K1400:n (MNG 357) solut.

Kanta E. coli K1400 ympätään ja viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla TA-kasvualustalla. Millilitraa kohden $2 \cdot 10^8$ solua sisältävää viljelmää lingotaan 4°C:ssa Sorvall RC5-lingossa kierrosluvulla 5000 min^{-1} 5 minuutin ajan. Sakka suspendoidaan 1,2 ml:aan 0,02 M vesipitoista tris-HCl-puskuria (pH 7,5). 0,5 ml:aan tätä bakteerisuspensiota lisätään 10 µl esimerkin 3 mukaisesti valmistettua transfamidi-DNA-liuosta sekä 0,1 ml 0,15 M kalsiumkloridin vesiliuosta ja 0,13 M magnesiumkloridin vesiliuosta. Seoksen annetaan seistä 0°C:ssa 60 minuutin ajan. Sitten suspensioon lisätään 5 ml TA-kasvualustaa ja inkuboidaan 28°C:ssa 30 minuutin ajan. Sitten solut erotetaan linkoamalla yllä esitetyllä tavalla.

Eristetyt transformoidut solut erotetaan kiinteällä kasvualustalla TAA, joka sisältää 50 µg/l ampisilliiniä. Kasvualustalla TAA on sama koostumus kuin kasvualustalla TA, mutta se sisältää lisäksi 2,2 % agaria (Bacto). Viljelmiä inkuboidaan 28°C:ssa 24 tunnin ajan. Ampisilliinin suhteen resistentit pesäkkeet eristetään (transformaatiotaajuus: 10.000 transformanttia/1 µg DNA:ta), viljellään esimerkin 1a) mukaisesti ja plasmidi-DNA erotetaan esimerkin 1b) mukaisesti. Erotettu transfamidi pGY95 analysoidaan endonukleaaseilla. Tällaisina käytetään EcoRI:tä, BamHI:tä ja HindIII:a (BRL, Maryland, USA). Entsymaattinen käsittely suoritetaan esimerkin 3 mukaisesti sillä erotuksella, että katkaistaessa BamHI:llä tai vast. HindIII:lla käytetään B-puskuria, joka sisältää kulloinkin yhden yksikön BamHI:tä tai vast. HindIII:a. Kulloinkin 10 µl:aan käsiteltyjä näytteitä lisä-

tään kulloinkin 10 µl D-puskuria ja DNA-pätkät erotetaan toisistaan elektroforeesilla agarosigeelissä. Agarosigeelin valmistamiseksi 1 g agarosia (SIGMA, St. Louis, USA) lisätään 80 ml:aan TEA-puskuria ja suspensiota keitetään 2 minuutin ajan, sitten se jäädytetään 60°C:seen ja valetaan vaakasuoraksi geeliksi. TEA-puskurin valmistamiseksi 800 ml:aan tislattua vettä liuotetaan 48,4 g trisiä, 3,7 g EDTA-dinatriumia, 16,4 g Na-asetaattia ja 0,05 ml etidiumbromidiliuosta, jonka konsentraatio on 10 mg/ml. pH-arvo säädetään väkevällä etikkahapolla arvoon 8,3 ja seos täydennetään tislattulla vedellä 1000 ml:aan.

Liuokset, jotka sisältävät restriktioentsyymillä käsitellyt pGY95-DNA-pätkät, tiputetaan geelille ja alistetaan TEA-puskurissa 4 tunnin ajaksi elektroforeesiin 40 V:lla ja 40 mA:lla. Eripituisia DNA-pätkiä vastaavat DNA-vyöhykkeet tunnistetaan niiden fluoresenssin perusteella UV-valossa ja sitten ne valokuvataan. Restriktioanalyysin tulos on esitetty kuviossa 14.

Näiden tulosten perusteella muodostettu restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 5.

Transfamidin sisältävä E. coli-kanta on talletettu nimityksellä E. coli pGY95 maatalous- ja teollisuusmikro-organismien kokoelmaan ja sen numero on MNG 356 (NCAIM B/P/000356).

Esimerkki 5

Transfamidin pGY95 eristys E. coli pGY95:stä

a) Kanta E. coli pGY95 (MNG 356) viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla ja transfamidi eristetään esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla.

Esimerkki 6Streptomyces tenebrarius koko DNA:n valmistusa) Streptomyces tenebrarius (MNG 169) viljely

Kantaa Str. tenebrarius MNG 169 viljellään agar-pitoisella kasvualustalla BeM. Vesijohtovedellä valmistettu kasvualusta säädetään ennen sterilointia pH-arvoon 7,2 ja sitten steriloidaan 121°C:ssa 30 minuutin ajan.

Vinoagarit ympätään Str. tenebrarius (MNG 169) itiöillä ja inkuboidaan sitten 37°C:ssa 6 päivän ajan. Kasvaneella viljelmällä ympätään 100 ml BI-kasvualustaa (kasvualustaa steriloidaan 500 ml:n erlenmeyerpullossa 121°C:ssa 20 minuutin ajan, ensin kuitenkin se säädettiin pH-arvoon 7,0).

Viljelmiä inkuboidaan 37°C:ssa 24 tunnin ajan ravistelulaitteessa, joka kulkee läpimitaltaan 2,6 cm:n ympyrää 260 kierrosta minuutissa. Kulloinkin 1 ml:lla viljelmää ympätään BI-kasvualustoja, jotka sisältävät 1, 2 tai vast. 3 % glysiiniä. Näitä inkuboidaan esitetyllä tavalla 24 tunnin ajan. Viljelmä, jossa kasvaa rihmastoja, lisätään kasvualustoihin, joiden glysiinikonsentraatio kasvaa. Näillä viljellään niin kauan, kunnes mikro-organismi kasvaa 5 % glysiiniä sisältävällä kasvualustalla 24 tunnin kuluessa.

b) Str. tenebrarius koko DNA:n eristys

Kohdan a) mukaisesti valmistettua viljelmää lingotaan Sorvall RC5-lingossa 25°C:ssa 10 minuutin ajan (roottorin kierrosluku 8000 min⁻¹). Solut suspendoidaan 200 ml:aan 10%:ista steriiliä sakkaroosiliuosta ja sitten lingotaan uudestaan. Tämän jälkeen rihmastot suspendoidaan 10 ml:aan lysotsyymi-liuosta, inkuboidaan tässä 60 minuutin ajan 30°C:ssa ja sitten lisätään 4,6 ml 0,25 M EDTA-liuosta ja 1,6 ml pronaasia (Calbiochem, USA), jonka konsentraatio on 10 mg/ml. Pidetään

5 minuutin ajan 30°C:ssa ja sitten erään lisätään 0,66 ml 25%:ista natriumlauryylisulfaattia ja inkuboidaan uudestaan 37°C:ssa 60 minuutin ajan.

Sitten erään lisätään sama tilavuus fenolin ja kloroformin 1:1-seosta ja varovaisen sekoittamisen jälkeen molemmat faasit erotetaan toisistaan linkoamalla (10 min., 10.000 min⁻¹). Vesifaasi uutetaan 3 kertaa eetterillä ja sitten siihen lisätään 2,5-kertainen tilavuus 96%:ista etanolia. Saostunut DNA erotetaan linkoamalla (Sorvall RC5, 5 min., 10.000 min⁻¹). Kirkas supernatantti poistetaan, DNA kuivataan eksikkaattorissa ja sitten se otetaan 7 ml:aan TE-liuosta.

Eristetty DNA puhdistetaan esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla ultralinkoamalla cesiumkloridin ja etidiumbromidin läsnäollessa ja dialysoidaan sitten. Puhdas koko DNA sisältyy linkoamisen jälkeen yhteen ainoaan fluoresoivaan vyöhykkeeseen.

Esimerkki 7

Str. tenebrariuksen geenikirjaston valmistus transfamidi pGY95:ssä

a) Vektorin ja liitännäis-DNA:n valmistelu ja yhteenliittäminen

12,5 µl esimerkin 5 mukaisesti puhdistettua pGY95-transfamidi-DNA-liuosta lisätään 12,5 µl:aan B-puskuria. Seokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä BamHI (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan tunnin ajan 37°C:ssa. Sitten seos käsitellään fosfataasilla. Tätä varten BamHI:llä leikattuun DNA:han lisätään 20 yksikköä alkalista fosfataasia (Calf Intestinal, Boehringer Mannheim GmbH) ja inkuboidaan ensin 15 minuutin ajan 37°C:ssa, sitten 15 minuutin ajan 56°C:ssa.

Sitten näytettä käsitellään samassa puskurissa 68°C:ssa 60 minuutin ajan 20 yksiköllä bakteerista alkalista fosfataasia (BRL, Maryland, USA). Fosfataasikäsitteilyn jälkeen lisätään fenolia esimerkissä 6 esitetyllä tavalla, DNA saostetaan etanolilla ja otetaan 20 µl:aan TE-liuosta. BamHI:llä suoritettun leikkaamisen ja fosfataasikäsitteilyn tehokkuus tarkastetaan liittämällä (ei-fosfataasikäsiteltyihin BamHI-pätkiin) ja katkaisemalla uudestaan (BamHI). Jos BamHI-käsitteily oli kunnossa, on uudestaan katkaistaessa lähtöpätkät saatava takaisin. Fosfataasilla käsitelty vektori ei voi muodostaa itsensä kanssa mitään sitoutumistuotetta.

125 µl esimerkin 6 mukaisesti puhdistettua Str. tenebrariuksen DNA-liuosta lisätään 125 µl:aan B-puskuria, sitten erään lisätään yksi yksikkö restriktioentsyymiä Sau3AI (BRL, Maryland, USA) ja inkuboidaan 37°C:ssa 10 minuutin ajan. Fenolin lisäys ja DNA:n saostaminen etanolilla tapahtuvat esimerkissä 6 esitetyllä tavalla. DNA otetaan 500 µl:aan TE-liuosta.

Käsittelemällä Sau3AI:llä katkeaa DNA osittain ja muodostuu erikokoisia pätkiä. Koska vektoriin optimaalisesti sijoitettavien pätkien koko on 9 - 15 ke, osittain pilkottu DNA erotetaan näiden pätkien eristämiseksi sakkaroosigradientissa.

Lingottaessa pätkät erottuvat gradientissa kokonsa mukaisesti ja tällä tavalla voidaan eristää sopivankokoisia pätkiä.

Yksityiskohtaisesti tapahtuu koon mukainen fraktiointi seuraavasti. SW41-linkoputkessa valmistetaan jatkuva sakkaroositiheysgradientti, jonka konsentraatio on 10 - 40 %. TE-puskurilla valmistetaan 10%:nen ja 40%:nen sakkaroosiliuos (TE-puskuriin lisättiin ensin natriumkloridia pitoisuuteen 1 M). 6 ml kumpaakin liuosta lisätään gradientinsekoituslaitteen kautta linkoputkeen. Aivan ylhäälle tulee näyte (500 µl). Sitten lingotaan 4°C:ssa roottorin kierrosluvun ollessa 32.000 min⁻¹ Sorvall OTD-50B-ultralingolla 16 tunnin

ajan. Lingottu aine jaetaan kulloinkin 200 µl:n fraktioihin, fraktioissa olevan DNA:n koko määritetään geelielektroforeesilla agarosissa esimerkissä 4 esitetyllä tavalla. Vastavat fraktiot yhdistetään, DNA saostetaan etanolilla ja sitten se liuotetaan 10 µl:aan TE-liuosta.

Restriktioentsyymi BamHI katkaisee DNA:n sekvenssissä GGATCC, entsyymi Sau3AI leikkaa sekvenssin GATC. Molemmissa emäspareissa muodostuu ulkonevia päitä (sticky ends) 4 emäsparista, jotka ovat komplementaarisia toistensa suhteen ja tästä syystä ne voivat yhdistyä keskenään kaikissa yhdistelmissä.

10 µl BamHI:llä katkaistua transfamidia pGY95 liitetään 10 µl:aan Sau3AI:llä osittain pilkottua Str. tenebrariuksen DNA-liuosta seuraavasti: 20 l:n reaktioseokseen lisätään 5 µl L-puskuria ja 5 yksikköä T4-DNA-ligaasia. Toimintatapa on sama kuin esimerkissä 3.

Yhteenliittämisen jälkeen seos jaetaan kahteen osaan. Toinen näyte (12,5 µl) laimennetaan TE-liuoksella 48 µl:aan ja sitten käsitellään 2 µl:lla terminaasiliuosta 37°C:ssa 30 minuutin ajan. Terminaasientsyymi valmistetaan Rackwitzin et al.:n mukaisesti (Gene, 40, 259 - 266, 1985).

b) Fagituotanto in vitro

Yhteenliittämisessä ilmestyy reaktioseokseen konkatemeeriset tai vast. terminaasilla käsitellyssä reaktioseoksessa mono-meeriset DNA-molekyylit, joista kukin sisältää kahden saman suuntauksen omaavan vektorimolekyylin välissä Str. tenebrariuksen sopivan kokoisen DNA-pätkän, jotka pätkät kattavat koko genomin. Näistä molekyyleistä muodostetaan valmiita fageja käyttämällä koontiseosta in vitro.

Faginvalmistuksella, fagin pakkaamisella in vitro, tarkoitetaan tässä sitä, että reagenssilasissa oleva DNA kasvaa li-

sättäessä sopivia lysaatteja (SE tai vast. FTL; toinen komponentti sisältää fagin päät ja hännät, toinen entsyymin) ja puskuria valmiiksi fageiksi, joissa on vaippa. Koontiseos on kaupallinen tuote, jonka nimitys on DNA-Kit A01-0215 ja jota valmistaa Biotechnika Rt. (Szeged, Unkari).

8 µl:aan Kit-puskuria lisätään 10 µl yllä esitetyllä tavalla valmistettua yhteenliittämisseosta ja sitten 2 µl jäällä sulatettua SE-lysaattia ja 5 µl FTL-lysaattia. Seos sekoitetaan heti ja sitten sen annetaan seistä 10 minuutin ajan 0°C:ssa, sitten 60 minuutin ajan 25°C:ssa. Sitten seokseen lisätään 975 µl SM-puskuria ja titrataan 100 mikrolitraa kohden E. coli NM526 NCAIM B /P/1006:ta vastaan. Isäntäorganismien viljely ja titraus suoritetaan DNA-pakkauksen käyttöohjeen mukaisesti, kasvualustana toimii TAA-alusta.

12-tuntisen kasvamisen jälkeen maljaa kohden lasketaan 1500 plakkia. Kontrollikloonauksessa (yhteenliittäminen ilman Streptomyces tenebrarius DNA:ta) ei esiinny yhtään plakkia. Tämä merkitsee sitä, että on valmistettu geenikirjasto, joka sisältää Streptomyces tenebrarius genomien moninkertaisena jäljennöksenä.

Eräs toinen osoitus geenikirjaston muodostumisesta on se, että tutkittaessa 12 itsenäistä plakkia jokainen yksittäinen sisälsi yhdistelmä-DNA:n (ks. kuv. 13). 12 itsenäisestä plakista peräisin olevilla fageilla infektoitiin E. coli K1400 (MNG 354). Populaatioita viljeltiin 28°C:ssa esimerkin 1a) mukaisesti, jolloin yhdistelmä-DNA monistui plasmidimuodossa. Sitten plasmidi-DNA eristettiin esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla, katkaistiin esimerkin 3 mukaisesti EcoRI:llä ja muodostuneet pätkät analysoitiin esimerkissä 4 esitetyllä tavalla agarosissa suoritettulla elektroforeesilla. Geelielektroforeesin tulos on esitetty kuviossa 13.

Esimerkki 8

Plasmidin pYF91 puhdistus

Kanta E. coli pYF91 (NCAIM B /P/1007) varastoidaan ja viljellään kohdassa 1a) esitetyllä tavalla. Plasmidi eristetään esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla.

Plasmidin yksityiskohtainen restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 4.

Esimerkki 9

Yhdistelmäfasmidin pGY97 valmistus

12,5 µl esimerkin 8 mukaisesti puhdistettua plasmidin pYF91 DNA-liuosta lisätään 12,5 µl:aan puskuria. Tähän seokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä BamHI (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan tunnin ajan 37°C:ssa.

12,5 µl esimerkin 5 mukaisesti puhdistettua transfamidia pGY95 lisätään 12,5 µl:aan puskuria, seokseen lisätään sitten 5 yksikköä restriktioentsyymiä BamHI ja annetaan seistä samoin 37°C:ssa tunnin ajan. Entsyymi BamHI katkaisee molemmat DNA:t sekvenssissä GGATCC. Tällöin muodostuu neljästä emäsparista koostuvia ulkonevia päitä (sticky ends) kummasakin DNA:ssa. Nämä ulkonevat päät ovat komplementaarisia toistensa suhteen ja tästä syystä ne voivat yhdistyä keskenään mielivaltaisina yhdistelminä.

Molemmat reaktioseokset sekoitetaan keskenään, sitten lisätään esimerkissä 6 esitetyllä tavalla fenolia ja DNA saostetaan etanolilla. DNA-sakka liuotetaan 50 µl:aan TE-puskuria ja liuokseen lisätään 12,5 µl L-liuosta. Tähän seokseen lisätään sitten, jotta lineaariset DNA-molekyylit yhdistyvät, yksi yksikkö T4-DNA-ligaasia (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan 15°C:ssa 16 tunnin ajan. Reaktioseokseen ilmestyy yhdistelmäfasmidi pGY97, jonka valmistus on esitetty

kaaviomaisesti kuviossa 4, kun taas kuviossa 7 on esitetty fasmidin yksityiskohtainen restriktio- ja toimintakartta.

Esimerkki 10

E. coli pGY97:n (MNG 358) valmistus

5 µl esimerkin 9 mukaisesti valmistettua reaktioseosta, joka sisältää yhdistelmäfasmidin pGY97, käytetään in vitro-pakkausta varten. Tämä suoritetaan esimerkin 7b) mukaisesti. Saaduilla valmiilla fageilla, joissa esiintyy fasmidi pGY97, infektoidaan Escherichia coli K1400:n (MNG 357) solut. Infektion jälkeen fasmidin pGY97 sisältävät solut yksilöidään kiinteällä, 50 µg/ml ampisilliiniä sisältävällä TAA-kasvu-alustalla. Viljelmiä inkuboidaan 28°C:ssa 24 tunnin ajan. Ampisilliinin suhteen resistentit pesäkkeet erotetaan (pakkaustiheys in vitro 10.000 transformanttia/µg DNA:ta), viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla ja fagi-DNA eristetään esimerkin 2b) mukaisesti. Eristetty fasmidi pGY97 analysoidaan esimerkissä 4 esitetyllä tavalla leikkaamalla endonukleaaseilla. Restriktioentsyymeinä käytetään EcoRI:tä, BamHI:tä ja HindIII:a (BRL, Maryland, USA). Kulloinkin 10 µl:aan entsyymillä käsiteltyjä näytteitä lisätään kulloinkin 10 µl D-puskuria ja muodostuneet DNA-pätkät erotetaan esimerkissä 4 esitetyllä tavalla geelielektroforeesilla agarosigeelissä.

Restriktioanalyysin tulos on esitetty kuviossa 14. Kuva 7 esittää restriktioanalyysin tuloksesta johdettua restriktio- ja toimintakarttaa.

Yhdistelmäfasmidin pGY97 sisältävää kantaa E. coli nimettiin E. coli pGY97:ksi ja talletettiin maatalous- ja teollisuusmikro-organismien kokoelmaan numerolla MNG 358.

Esimerkki 11

Yhdistelmäfasmidin pGY97 eristys fagina E. coli pGY97:stä
(MNG 358)

Kanta E. coli pGY97 (MNG 358) varastoidaan ja viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla sillä erotuksella, että inkubaatiolämpötila on 28°C. Fagina saatavan fasmidin pGY97 puhdistamiseksi viljely titrataan 37°C:ssa E. coli NM526:ta vastaan. Tässä lämpötilassa fasmidi lisääntyy fagimuodossa. E. coli NM526:sta saatuja fageja lisätään sitten esimerkissä 2a) esitetyllä tavalla ja DNA eristetään esimerkissä 2b) esitetyllä tavalla.

Esimerkki 12

Medicago sativan (sinimailasen) koko DNA:n valmistus

20 g Medicago sativan siemeniä annetaan itää 7 päivän ajan. Alkiotaimet kerätään ja ne jäädytetään 50 g:n määränä nestemäisessä tyypessä ja sitten jauhetaan jauheeksi huhmarissa. Massaan lisätään 150 ml NESP-puskuria. Suspensiota inkuboidaan 65°C:ssa tunnin ajan ja sitten se lingotaan 20°C:ssa roottorissa, jonka kierrosluku on 8000 min⁻¹, Sorvall RC5-lingolla. Kirkas supernatantti sekoitetaan varovasti fenolin ja kloroformin 1:1-seoksen kanssa. Sitten molemmat faasit erotetaan toisistaan linkoamalla (10.000 min⁻¹, 10 min.). Vesifaasi erotetaan ja uutetaan 3 kertaa eetterillä. Lisätään 200 ml 96%:ista etanolia ja sitten saostunut DNA eristetään linkoamalla (Sorvall RC5, 10.000 min⁻¹, 5 min.). Kirkkaan supernatantin erottamisen jälkeen DNA kuivatetaan eksikkaattorissa. Tällä tavalla eristetty DNA puhdistetaan esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla cesiumkloridin ja etidiumbromidin läsnäollessa ultralinkoamalla. Medicago sativan koko DNA voidaan erottaa yhden ainoan fluoresoivan vyöhykkeen muodossa.

Esimerkki 13Medicago sativan geenikirjaston valmistus fasmidissa pGY97

12,5 µl esimerkin 11 mukaisesti eristettyä plasmidin pGY97 fagi-DNA-liuosta lisätään 12,5 µl:aan B-puskuria. Reaktio-seokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä BamHI (BRL, Maryland, USA). Sitten seosta inkuboidaan 37°C:ssa tunnin ajan ja käsitellään tämän jälkeen esimerkissä 7a) esitetyllä tavalla fosfataasilla.

125 µl esimerkin 12 mukaisesti puhdistettua Medicago sativan DNA:ta lisätään 125 µl:aan B-puskuria. Seokseen sekoitetaan yksi yksikkö restriktioendonukleaasia Sau3AI (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan 37°C:ssa 10 minuutin ajan. Seokseen lisätään esimerkissä 6 esitetyllä tavalla fenolia, DNA saostetaan sitten etanolilla ja liuotetaan 500 µl:aan TE-liuosta.

Entsyymi Sau3AI pilkkoo DNA:n osittain, muodostuu erikoisia pätkiä. Koska 5 - 15 ke:n pätkät voidaan sijoittaa optimaalisesti vektoriin, tämän kokoisten pätkien eristämiseksi entsyymaattisesti käsitelty seos erotetaan sakkaroosi-gradientissa. Gradientti lingotaan esimerkissä 7a) esitetyllä tavalla: Tämän jälkeen otetaan kulloinkin 200 µl:n fraktioita ja määritetään geelielektroforeesilla agarosissa kussakin fraktiossa esiintyvien DNA-pätkien koko. Sopivat fraktiot (9 - 15 ke) yhdistetään, saostetaan etanolilla ja liuotetaan 10 µl:aan TE-liuosta.

Restriktioentsyymi BamHI leikkaa DNA:n sekvenssissä GGATCC, entsyymi Sau3AI sekvenssissä GATC. Lohkaisun jälkeen muodostuu kummassakin DNA:ssa neljästä emäsparista koostuvia kohe-siivisiä päitä, jotka ovat komplementaarisia toistensa suhteen ja tästä syystä ne voivat yhdistyä keskenään mielival-taisina yhdistelminä.

Medicago sativan osittain pilkottu DNA liitetään BamHI:llä avattuun ja fosfataasilla käsiteltyyn fasmidiin pGY97. Tätä varten sekoitetaan kulloinkin 10 µl kumpaakin liuosta keskenään ja lisätään 5 µl LP-seosta. LP-seoksen valmistamiseksi 1,25 ml M tris-HCl:a (pH 8,0) ja 0,25 ml M magnesiumkloridin vesiliuosta, 0,5 ml M tiotreitolia (BRL, Maryland, USA), 2,5 ml 30%:ista polyeteeniglykolia 6000, 30,3 mg adensiinitri-fosfaattia ja 0,5 ml ionivapaata vettä sekoitetaan keskenään.

Lineaaristen DNA-molekyylien kytkemiseksi seokseen lisätään yksi yksikkö T4-DNA-ligaasia (BRL, Maryland, USA) ja sitten seosta inkuboidaan 15°C:ssa 16 tunnin ajan. Yhteenliittämisen aikana reaktioseokseen ilmestyvät ne monomeeriset DNA-molekyylit, jotka sisältävät sopivan suuruisina DNA-pätkinä Medicago sativan koko genomien. Nämä pakataan esimerkissä 7b) esitetyllä tavalla in vitro, jolloin muodostuu valmiita fageja. Valmiita fagihiukkasia sisältävään seokseen lisätään 975 µl SM-puskuria. Seos titrataan kulloinkin 100 µl:n määränä E. coli NM526:lla (NCAIM /P/B. 1006). Titraukseen (fagimäärän toteamiseen) käytetty kanta kasvatettiin TAA-kasvualustalla.

Isäntäorganismin viljely ja titraus suoritetaan pakkauksen käyttöohjeen mukaisesti. 12-tuntisen viljelyn jälkeen havaitaan levyä kohden 50.000 plakkia. Kontrollikloonauksessa (ilman Medicago sativan DNA:ta) ei esiinny yhtään plakkia. Tämä merkitsee sitä, että on muodostunut Medicago sativan genomien vähintään kerran sisältävä geenikirjasto.

Eräs toinen osoitus geenipankin olemassaolosta on se seikka, että jokaisessa 11 tutkitussa itsenäisessä plakissa havaittiin yhdistelmä-DNA (ks. kuv. 15). Tätä varten infektoitiin E. coli K1400 (MNG 357) 11 itsenäisestä plakista peräisin olevilla fageilla. Populaatiota lisättiin 28°C:ssa, jolloin yhdistelmä-fasmidit monistuivat plasmidien muodossa soluis-

sa. 11 itsenäistä populaatiota viljeltiin esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla, plasmidi-DNA eristettiin esimerkin 1b) mukaisesti. Puhdistetut DNA:t katkaistiin esimerkissä 3 esitetyllä tavalla EcoRI:llä ja muodostuneet pätkät analysoitiin esimerkin 4 mukaisesti elektroforeesilla agarosi-geelissä. Geelielektroforeesin tulos on esitetty kuviossa 15.

Esimerkki 14

Plasmidin pGYOKI1 eristys

Kanta E. coli pGYOKI1 (NCAIM /p/B. 1008) säilytetään ja viljellään esimerkin 1a) mukaisesti. Plasmidi pGYOKI1 eristetään esimerkin 1b) mukaisesti. Bifunktionaalisen plasmidin restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 10 (ks. myös unkarilainen patenttihakemus n:o 2468/83).

Esimerkki 15

Yhdistelmäplasmidin pGYOKI1/2 valmistus

10 µl esimerkin 14 mukaisesti puhdistettua plasmidia pGYOKI1 lisätään 10 µl:aan B-puskuria ja sitten lisätään 2 yksikköä restriktioendonukleaasia XbaI (BRL, Maryland, USA). Seosta inkuboidaan 37°C:ssa tunnin ajan. Sitten lisätään esimerkin 6 mukaisesti fenolin ja kloroformin seos ja DNA saostetaan etanolilla. Saostunut DNA liuotetaan 10 µl:aan TE-liuosta.

Restriktioentsyymi XbaI leikkaa pGYOKI1:n DNA:n kahdessa kohdassa sekvenssissä TCTAGA. Kummassakin DNA:ssa muodostuu neljästä emäsparista koostuvia kohesiivisiä päitä, jotka ovat toistensa suhteen komplementaarisia ja tästä syystä voivat yhdistyä keskenään kaikissa yhdistelmissä.

10 µl:n määrässä esiintyvät, XbaI:llä leikatut DNA-pätkät liitetään yhteen esimerkissä 3 esitetyllä tavalla lisäämällä yksi yksikkö T4-DNA-ligaasia ja 2,5 µl L-puskuria. Reaktio-

seokseen ilmestyvät yhdistelmäplasmidit pGYOKI1/2, jotka ovat muodostuneet plasmidin pGYOKI1 suuremmasta pätkästä it-sesitoutumisella.

Plasmidin pGYOKI1/2 valmistus on esitetty kaaviomaisesti kuviossa 10, sen restriktio- ja toiminta-kartta on esitetty kuviossa 11.

Esimerkki 16

E. coli pGYOKI1/2:n (NCAIM/P/B. 1009) valmistus

10 µl:lla esimerkin 15 mukaisesti saatua, yhdistelmäplasmideja pGYOKI1/2 sisältävää reaktioseosta transformoidaan E. coli dam-miinus-solut (NCAIM/P/B. 1010). Dam-miinus-soluis-sa ei ole mitään DNA:n metyloitumista koodittavaa geeniä, siitä syystä DNA ei metyloidu sekvenssissä GATC. Tämä aiheuttaa sen, että esimerkiksi restriktioendonukleaasi BcII leikkaa tällaisista soluista eristetyyn DNA:n, kun taas se ei vahingoita metyloitua DNA:ta. Transformointi suoritetaan esimerkissä 4 esitetyllä tavalla, jolloin kuitenkin TAA-kasvualusta ympätään E. coli dam⁻:lla.

Eristetyt transformoidut solut yksilöidään µl:aa kohden 50 µg kloramfenikolia sisältävällä TAA-kasvualustalla. Viljely- ja inkuboidaan 28°C:ssa 24 tunnin ajan. Kloramfenikolin suhteen resistentit pesäkkeet erotetaan (transformaatiotaajuus: 10.000 transformanttia/1 µg DNA:ta), viljellään esimerkin 1a) mukaisesti ja sitten niistä erotetaan esimerkin 1b) mukaisesti plasmidi-DNA.

Eristetty plasmidi pGYOKI1/2 analysoidaan endonukleaaseilla esimerkissä 3 esitetyllä tavalla. Restriktioentsyymeinä käytetään EcoRI:tä, BamHI:tä ja HindIII:a (BRL, Maryland, USA). Kulloinkin 10 µl:aan entsyymillä käsiteltyjä näytteitä lisätään kulloinkin 10 µl D-puskuria ja muodostuneet DNA-pätkät erotetaan agarosigeelissä geelielektroforeesilla esimerkis-

sä 4 esitetyllä tavalla. Restriktioanalyysin tulos on esitetty kuviossa 16. Analyysin tuloksen perusteella piirretty restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 11.

Yhdistelmä-plasmidin pGYOKI1/2 sisältävä kanta E. coli nimettiin E. coli pGYOKI1/2:ksi ja talletettiin numerolla NCAIM/P/B. 1009.

Esimerkki 17

Yhdistelmäplasmidin pGYOKI1/2 eristys E. coli pGYOKI1/2:n soluista

Kanta E. coli pGYOKI1/2 (NCAIM/P/B. 1009) varastoidaan ja viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla. Plasmidi eristetään esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla.

Esimerkki 18

Uudentyyppisten, yhdistelmäfasmidien pGYOKI9 ja pGYOKI10 valmistus

12,5 µl esimerkin 17 mukaisesti puhdistettua plasmidin pGYOKI1/2 DNA-liuosta lisätään 12,5 µl:aan B-puskuria. Seokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä BclI (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan tunnin ajan 50°C:ssa.

12,5 µl esimerkin 2b) mukaisesti puhdistettua EMBL4-DNA:ta lisätään 12,5 µl:aan B-puskuria. Seokseen lisätään 5 yksikköä BamHI:tä ja sitten inkuboidaan tunnin ajan 37°C:ssa.

Restriktioentsyymi BclI leikkaa DNA:n sekvenssissä TGATCA, BamHI sekvenssissä GGATCC. Muodostuu neljästä emäsparista koostuvia ulkonevia päitä, jotka ovat toistensa suhteen komplementaarisia ja tästä syystä ne voivat yhdistyä keskenään kaikissa yhdistelmissä.

Molempiin reaktioseoksiin lisätään esimerkissä 6 esitetyllä tavalla fenolia, DNA saostetaan etanolilla ja liuotetaan

kulloinkin 10 µl:aan TE-puskuria. Molemmat liuokset yhdistetään. Lineaariset DNA-molekyylit sisältävään liuokseen lisätään 5 µl L-liuosta ja yksi yksikkö T4-DNA-ligaasia. Seosta inkuboidaan 15°C:ssa 16 tunnin ajan. Reaktioseokseen ilmestyvät uudentyypiset yhdistelmäfasmidit pGYOKI9 ja pGYOKI10. Niiden valmistus on esitetty kaaviomaisesti kuviossa 9, niiden restriktio- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 12.

Esimerkki 19

E. coli pGYOKI9:n (NCAIM/P/B. 1011) ja E. coli pGYOKI10:n (NCAIM/P/B. 1012) valmistus

5 µl uudentyypiset yhdistelmäfasmidit pGYOKI9 ja pGYOKI10 sisältävää esimerkin 18 mukaista reaktioseosta alistetaan esimerkissä 7b) esitetyllä tavalla koontiin.

Tällöin saaduilla valmiilla fagihiukkasilla, jotka sisältävät uudentyypiset fasmidit fagimuodossa, infektoidaan E. coli K1400 (MNG 357) kannan solut. Infektoidut solut, jotka sisältävät uudentyypiset fasmidit nyt plasmidimuodossa, yksilöidään 50 µg/ml kloramfenikolia sisältävällä kiinteällä TAA-kasvualustalla. Viljelmiä inkuboidaan 28°C:ssa 24 tunnin ajan. CmR-pesäkkeet (kloramfenikoli-resistentit) erotetaan (koontitaajuus in vitro: 10.000 transformanttia/1 µg DNA:ta), viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla ja plasmidi-DNA eristetään esimerkissä 1b) esitetyllä tavalla. Eristetyt fasmidit pGYOKI9 ja pGYOKI10 käsitellään esimerkissä 3 esitetyllä tavalla restriktioentsyymeillä EcoRI, BamHI ja HindIII (BRL, Maryland, USA). Kulloinkin 10 µl:aan entsyymillä käsiteltyjä näytteitä lisätään kulloinkin 10 µl D-puskuria ja pätkät erotetaan toisistaan esimerkissä 4 esitetyllä tavalla geelielektroforeesilla agarosigeelissä.

Restriktioanalyysin tulos on esitetty kuviossa 17 ja kuviossa 12 on esitetty analyysin perusteella muodostettu restriktio- ja toimintakartta.

Uudentyyppisen fasmidin pGYOKI9 sisältävä E. coli-kanta nimettiin E. coli pGYOKI9:ksi ja talletettiin numerolla NCAIM/P/B. 1011. Talletettu E. coli pGYOKI10 kanta sai numeron NCAIM/P/B. 1012.

Esimerkki 20

Uudentyyppisen yhdistelmäfasmidin pGYOKI9 eristys E. coli pGYOKI9:stä (NCAIM/P/B. 1011) fagien muodossa

Kanta E. coli pGYOKI9 (NCAIM/P/B. 1011) varastoidaan ja viljellään esimerkissä 1a) esitetyllä tavalla. Fasmidin pGYOKI9 puhdistamiseksi fagien muodossa viljely titrataan 37°C:ssa E. coli NM526:lla esimerkin 13 mukaisesti. Esitettyssä lämpötilassa vapautuu uudentyyppinen fasmidi E. coli pGYOKI9:n (NCAIM/P/B. 1011) soluista fagimuodossa ja lisääntyy kannassa E. coli NM526. E. coli NM536-isäntäsolusta saatua fagia lisätään esimerkissä 2a) esitetyllä tavalla ja fagi-DNA eristetään esimerkissä 2b) esitetyllä tavalla.

Esimerkki 21

Streptomyces tendae koko DNA:n valmistus

Mikro-organismi Streptomyces tendae (MNG 274) säilytetään agarpitoisella kasvualustalla GVI/b. Tämän koostumuksen omaavat vinoagarit ympätään Streptomyces tendae (MNG 274) itiöillä ja inkuboidaan 28°C:ssa 6 päivän ajan. Viljelmällä ympätään 100 ml BI-kasvualustaa, jota steriloidtiin 500 ml:n erlenmeyerpullossa 121°C:ssa 20 minuutin ajan.

Viljelmää inkuboidaan 28°C:ssa 48 tunnin ajan 2,6 cm:n ympyrää 260 kierrosta minuutissa kulkevalla ravistelulaitteella. 1 ml:lla kehitettyä ja kontrolloitua viljelmää ympätään 100 ml BI-kasvualustaa, joka sisältää 0,5 % glysiiniä. Viljelmää viljellään 48 tunnin ajan.

b) Streptomyces tendaen koko DNA:n eristys

Esimerkin 21a) mukaisesti valmistetusta viljelmästä eristetään koko DNA esimerkissä 6b) esitetyllä tavalla ja sitten puhdistetaan esimerkin 1b) mukaisesti cesiumkloridin ja etidiumbromidin läsnäollessa ultralinkoamalla. Puhdas koko DNA voidaan eristää yhden ainoan fluoresoivan vyöhykkeen muodossa.

Esimerkki 22

Streptomyces tendaen geenikirjaston valmistus uudentyyppisellä fasmidilla pGYOKI9

12,5 µl esimerkin 20 mukaisesti puhdistetun fasmidifagi-DNA:n sisältävää liuosta lisätään 12,5 µl:aan B-puskuria. Seokseen lisätään 5 yksikköä restriktioentsyymiä BamHI (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan 37°C:ssa tunnin ajan. Inkuboimisen jälkeen näyte käsitellään esimerkissä 7a) esitetyllä tavalla fosfataasilla ja sitten lisätään fenolia esimerkissä 6 esitetyllä tavalla. DNA saostetaan etanolilla ja liuotetaan 20 µl:aan TE-liuosta.

125 µl esimerkin 21 mukaisesti puhdistettua Streptomyces tendaen DNA:ta lisätään 125 µl:aan B-puskuria. Seokseen lisätään yksi yksikkö restriktioentsyymiä Sau3AI ja inkuboidaan 37°C:ssa 10 minuutin ajan. Seos käsitellään esimerkin 6 mukaisesti fenolilla ja DNA saostetaan etanolilla. DNA liuotetaan 100 µl:aan TE-liuosta.

Entsyymillä Sau3AI pilkotaan DNA osittain, jolloin muodostuu erikokoisia pätkiä. Koska vektoriin voidaan sijoittaa optimaalisesti 5 - 9 ke:n pätkät, näiden pätkien eristämiseksi erotetaan osittain pilkottu DNA sakkaroosigradientissa esimerkissä 7a) esitetyllä tavalla. Linkoamisen päätyttyä otetaan kulloinkin 200 µl:n fraktioita ja määritetään geelielektroforeesilla agarosissa fraktioissa olevien DNA-palasten koko. Sopivat fraktiot (5 - 9 ke) yhdistetään, DNA saostetaan etanolilla ja liuotetaan 10 µl:aan TE-liuosta.

Restriktioentsyymi BamHI leikkaa DNA:n sekvenssissä GGATCC, restriktioentsyymi Sau3AI sekvenssissä GATC. Kummassakin DNA:ssa muodostuu neljästä emäsparista koostuvia kohesiivisiä päitä, jotka ovat komplementaarisia toistensa suhteen ja voivat tästä syystä yhdistyä keskenään kaikissa yhdistelmissä.

BamHI:llä leikattu ja fosfataasilla käsitelty fasmidi pGYOKI9 liitetään yhteen Streptomyces tendaen Sau3AI:llä osittain pilkotun DNA:n kanssa. Kulloinkin 10 µl kumpaakin liuosta yhdistetään ja lisätään 5 µl LP-seosta. Lineaaristen DNA-molekyylien yhdistämiseksi keskenään lisätään yksi yksikkö T4DNA-ligaasia (BRL, Maryland, USA) ja sitten inkuboidaan 15°C:ssa 16 tunnin ajan. Liittämisen kuluessa ilmestyvät reaktioseokseen ne monomeeriset DNA-molekyylit, joista kukin sisältää sopivan kokoisen DNA-pätkän, jotka pätkät kokonaisuudessaan kattavat Streptomyces tendaen koko genomien.

Nämä molekyylit pakataan esimerkissä 7b) esitetyllä tavalla in vitro täydellisiksi fageiksi. Valmiit fagit sisältävään seokseen lisätään 975 µl SM-puskuria. Seos titrataan (kulloinkin 100 µl) TAA-levyillä E. coli NM526:ssa (NCAIM/P/B. 1006). Isäntäorganismin viljely ja titraus suoritetaan DNA-tarvikepakkauksen käyttöohjeessa koontia varten esitetyllä tavalla (ks. yllä). 12-tuntisen kasvun jälkeen havaitaan jokaisella levyllä 40.000 plakkia. Tämä merkitsee sitä, että valmistettu geenikirjasto muodostaa Streptomyces tendaen genomien moninkertaisesti. Kontrollikloonauksessa (sitominen ilman Streptomyces tendaen DNA:ta) ei muodostunut yhtään plakkia.

Kuvioiden 13 - 17 selitys

Kuv. 13: Streptomyces tenebrariusksen DNA:n sisältävän yhdistelmäkloonin pGY95 restriktioanalyysi

vyöhykkeet 1 - 12: klooneista saadun DNA:n EcoRI:llä suoritetun leikkaamisen jälkeen saadut pätkät
vyöhykkeet 13: lambdafagin DNA:n HindIII:lla suoritetun leikkaamisen jälkeen saadut pätkät (moolimassa-merkintä)

Kuv. 14: pGY95:n ja pGY97:n DNA:n restriktioanalyysi
vyöhykkeet 1 - 3: pGY95, leikattu BamHI:llä, EcoRI:llä ja HindIII:lla
vyöhykkeet 5 - 7: leikattu BamHI:llä, EcoRI:llä ja HindIII:lla
vyöhykkeet 4: lambdafagi-DNA, leikattu HindIII:lla

Kuv. 15: Medicago sativan (sinimailasen) DNA:n sisältävän yhdistelmäklonin pGY97 restriktioanalyysi
vyöhykkeet 1 - 11: klooneista eristetty DNA, leikattu EcoRI:llä
vyöhykkeet 12: lambdafagi-DNA, leikattu HindIII:lla

Kuv. 16: plasmidin pGYOKI1/2 restriktioanalyysi
pGYOKI1/2:n pätkät
vyöhykkeet 1: BamHI:llä suoritetun leikkaamisen jälkeen
vyöhykkeet 2: BclI:llä suoritetun leikkaamisen jälkeen
vyöhykkeet 3: EcoRI:llä suoritetun leikkaamisen jälkeen
vyöhykkeet 4: lambdafagi-DNA, leikattu HindIII:lla
vyöhykkeet 5: HindIII:lla suoritetun leikkaamisen jälkeen
vyöhykkeet 6: PstI:llä suoritetun leikkaamisen jälkeen

Kuv. 17: pGYOKI9:n ja pGYOKI10:n DNA:n restriktioanalyysi
vyöhykkeet 1: pGYOKI9, leikattu EcoRI:llä
vyöhykkeet 2: pGYOKI10, leikattu EcoRI:llä

vyöhykkeet 3: lambdafagi-DNA, leikattu HindIII:lla
(markkeri)

vyöhykkeet 4: pGYOKI9, leikattu HindIII:lla

vyöhykkeet 5: pGYOKI10, leikattu HindIII:lla.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä DNA-sekvenssien kloonamiseksi tai vastaavasti geenikirjastojen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kloonausvektorin kohesiivisistä 5'-päistä, joka vektori on eristetty lineaarisena DNA:na restriktioendonukleaasikäsittelyn jälkeen, poistetaan fosfaattiryhmät fosfataasilla, keskenään yhdistymään kykenemättömiin pätkiin lisätään kloonattavan geenin sisältävät, restriktioendonukleaasikäsittelyllä tuotetut, päissään fosfaattiryhmän sisältävät DNA-pätkät ja suoritetaan seoksen yhteenliittäminen ligaasilla tai fagi-, kosmidi-, fasmidi- tai transfamidityyppinen kohesiivisiä sekvenssejä sisältävä yhdistelmäklonauksvektori leikataan terminaasilla ja jommallakummalla tavalla saatu monomeerinen DNA kootaan in vitro ja sitten lisätään fageja.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kloonaus suoritetaan uudentyyppisellä DNA:n kloonausvektorilla, transfamidilla, joka eristetään plasmidina ja käsitellään ennen fosfataasikäsittelyä rengasmaisten DNA-molekyylien avaamiseksi restriktioendonukleaasilla.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kloonaus suoritetaan transfamidilla pGY95.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kloonaus suoritetaan fasmidilla pGY97.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kloonaus suoritetaan uudentyyppisellä fasmidilla pGYOKI9.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kloonaus suoritetaan uudentyyppisellä fasmidilla pGYOKI10.

7. Menetelmä transfamidityyppisen DNA:n kloonausvektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että lambda-fagin fagilisääntymiselle välttämättömät geenit sisältävät pätkät liitetään yhteen replikaation plasmidina Escherichia coli-soluissa mahdollistavien ja antibioottiresistenssin määrittävien DNA-pätkien kanssa, jolloin molemmat pätkät yhdessä eivät saavuta fagin lisääntymiseksi tarvittavaa kokoa, ja eristetään tällöin muodostuva, plasmidina eristettävä, vieraiden DNasekvenssien insertiokloonaukseen sopiva, insertion jälkeen fagina in vitro koottava ja tämän in vitro-kokoamisen jälkeen sekä fagina että plasmidina replikaatioon kykenevä transfamidi-DNA.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä transfamidin pGY95 valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että plasmidi pBR322 ja fagivektori EMBL4 leikataan samalla restriktioendonukleasilla ja tällöin saatava plasmidi-DNA ja fagi-DNA liitetään yhteen T4-DNA-ligaasilla ja eristetään saatu transfamidi-DNA.

9. Menetelmä uudentyyppisen fasmidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että lambda-fagin fagilisääntymiselle välttämättömät geenit sisältävät pätkät, edelleen replikaatioon plasmidina Escherichia colissa mahdollistavat ja antibioottiresistenssin määrittävät DNA-pätkät ja lopuksi eloonjäämisen plasmidina jossakin toisessa mikro-organismissa takaavat ja tässä mikro-organismissa valikoimisen mahdollistavat DNA-pätkät - jolloin näillä kolmella pätkällä yhdessä on fagilisääntymiseen tarvittava koko - liitetään keskenään yhteen ja eristetään näin saatu fasmidi-DNA, joka on eristettävissä sekä fagina että plasmidina ja soveltuu vieraiden DNA-sekvenssien insertiokloonaukseen ja kykenee insertion jälkeen E. colissa replikaatioon fagina ja plasmidina ja pysyy elossa mainitussa toisessa mikro-organismissa plasmidina.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä uudentyypisten fasmidien pGYOKI9 ja pGYOKI10 valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että lähdetään yhdistelmä-plasmidista pGYOKI1/2 ja lambdafagi-vektorista EMBL4.

11. Transfamidi pGY95, t u n n e t t u siitä, että sillä on kuviossa 5 nähtävä restriktio- ja toimintakartta, ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssigeeni sekä kokona 32,3 ke.

12. Uudentyyppiset fasmidit pGYOKI9 ja pGYOKI10, t u n n e t t u siitä, että niillä on kuviossa 12 esitetty restriktio- ja toimintakartta, kussakin yksi kloramfenikoli-, neomysiini- ja tiostreptoniresistenssigeeni ja kokona 41 ke.

13. Uusi kanta Escherichia coli pGY95 (NCAIM B/P/000356), joka sisältää patenttivaatimuksen 11 mukaisen transfamidin.

14. Uusi kanta Escherichia coli pGYOKI9 (NCAIM B/P/001011), joka sisältää patenttivaatimuksen 12 mukaisen fasmidin pGYOKI9.

15. Uusi kanta Escherichia coli pGYOKI10 (NCAIM B/P/001012), joka sisältää patenttivaatimuksen 12 mukaisen fasmidin pGYOKI10.



Patentkrav

1. Förfarande för kloning av DNA-sekvenser eller fram-
ställning av genbanker, k ä n n e t e c k n a t av att
5 man från de kohesiva 5'-ändarna av en klonande vektor, som
efter behandling med restriktionsendonukleas isolerats som
linjär DNA, avlägsnar fosfatgrupperna med fosfatas, de
till ligering med varandra inkapabla fragmenten tillsätts
DNA-fragment, som innehåller den för kloning avsedda ge-
10 nen, har erhållits medelst behandling med restriktionsen-
donukleas och vid sina ändrar uppvisar fosfatgrupper, och
ligeringen av blandningen utförs medelst ligas, eller en
rekombinant kloningsvektor innehållande kohesiva sekvenser
av fag-, kosmid-, fasmid- eller transfamidtyp bryts med
15 terminas och det på ettdera sättet erhållna monomera DNA
samlas in vitro och fagerna sedan förökas.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t
av att man genomför kloningen med en DNA-klonande vektor av
20 ny typ, en transfamid, som isoleras som plasmid och som
före fosfatasbehandlingen för öppnande av de ringformiga
DNA-molekylerna behandlas med en restriktionsendonukleas.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t
25 av att man genomför kloningen med transfamiden pGY95.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t
av att man genomför kloningen med fasmiden pGY97.

- 30 5. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t
av att man genomför kloningen med fasmiden pGYOKI9 av ny
typ.

- 35 6. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t
av att man genomför kloningen med fasmiden pGYOKI10 av ny
typ.

7. Förfarande för framställning av en DNA-klonande vektor av transfamidtyp, k ä n n e t e c k n a t av att de fragment som innehåller de för förökningen av fagerna nödvändiga generna av fagen lambda ligeras med DNA-fragment som möjliggör replikationen som plasmid i Escherichia coli-celler och som bestämmer en antibiotikaresistens, varvid båda fragment tillsammans inte uppnår den storlek som är nödvändig för förökningen av fagen, och det härvid erhållna transfamid-DNA isoleras, som kan isoleras som plasmid, lämpar sig för insertionskloning av främmande DNA-sekvenser, efter en insertion som fag in vitro kan samlas och efter denna in vitro-samlingen är kapabel till replikation både som fag och plasmid.
8. Förfarande enligt patentkrav 7 för framställning av transfamiden pGY95, k ä n n e t e c k n a t av att plasmiden pBR322 och fagvektoren EMBL4 bryts med samma restriktionsendonukleas och det härvid erhållna plasmid-DNA och fag-DNA ligeras med T4-DNA-ligas och det erhållna transfamid-DNA isoleras.
9. Förfarande för framställning av en fasmid av ny typ, k ä n n e t e c k n a t av att de fragment som innehåller de för förökningen av fagerna nödvändiga generna av fagen lambda, vidare de DNA-fragment som möjliggör en replikation som plasmid i Escherichia coli och som bestämmer en antibiotikaresistens och slutligen de DNA-fragment som garanterar överlevnaden som plasmid i någon annan mikroorganism och som möjliggör selektion i denna mikroorganism - varvid dessa tre fragment tillsammans uppvisar en storlek som är nödvändig för förökningen av fagerna - ligeras med varandra och det så erhållna fasmid-DNA isoleras, som kan isoleras som både fag och plasmid och lämpar sig för insertionskloning av främmande DNA-sekvenser och som efter insertionen i E. coli är kapabel till replikation som fag och plasmid och överlever i nämnda andra mikroorganism som plasmid.

10. Förfarande enligt patentkrav 9 för framställning av fasmiderna pGYOKI9 och pGYOKI10 av ny typ, k ä n n e - t e c k n a t av att man utgår ifrån kombinationsplasmiden pGYOKI1/2 och lambdafagvektorn EMBL4.

5

11. Transfamid pGY95, k ä n n e t e c k n a d av att den uppvisar de i figur 5 visade restriktions- och funktionskartorna, en ampicillin- och en tetracyclin-resistensgen och en storlek på 32,3 kb.

10

12. Fasmiderna pGYOKI9 och pGYOKI10 av ny typ, k ä n n e - t e c k n a d e av att de uppvisar de i figur 12 visade restriktions- och funktionskartorna, vardera en kloramfenikol-, neomycin- och tiostrepton-resistensgen och en storlek på 41 kb.

15

13. Ny stam Escherichia coli pGY95 (NCAIM B/P/000356) innehållande transfamiden enligt patentkrav 11.

20

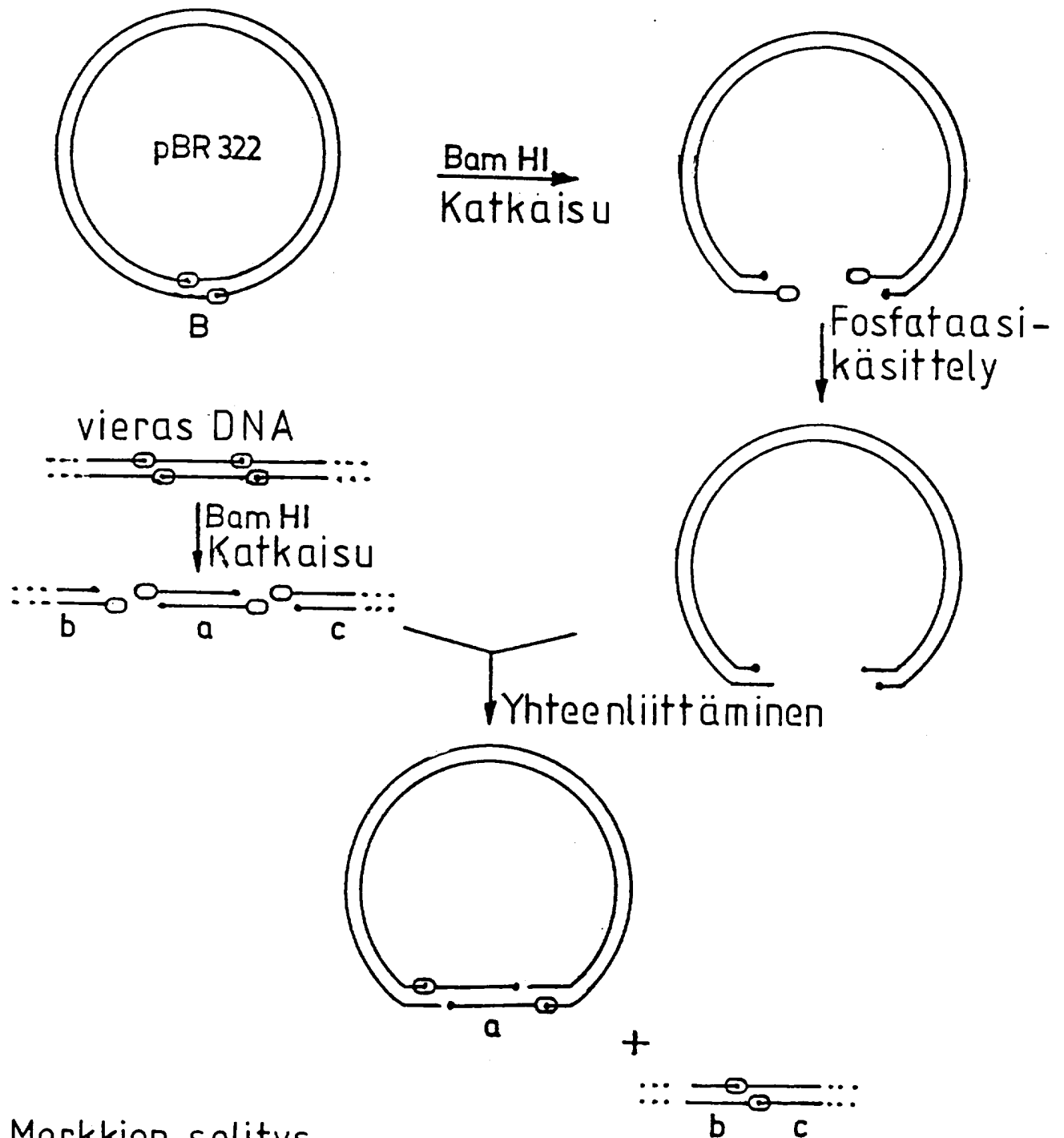
14. Ny stam Escherichia coli pGYOKI9 (NCAIM B/P/001011) innehållande fasmiden pGYOKI9 enligt patentkrav 12.

15. Ny stam Escherichia coli pGYOKI10 (NCAIM B/P/001012) innehållande fasmiden pGYOKI10 enligt patentkrav 12.

25



Kloonaukseen plasmidivektoriin



Merkkien selitys

- B = Bam HI paikka
 - = 5'-fosfaatti
 - = 3'-OH
 - = 5'-OH
- } ryhmä

Fig.1

Kloonaus fagivektoriin

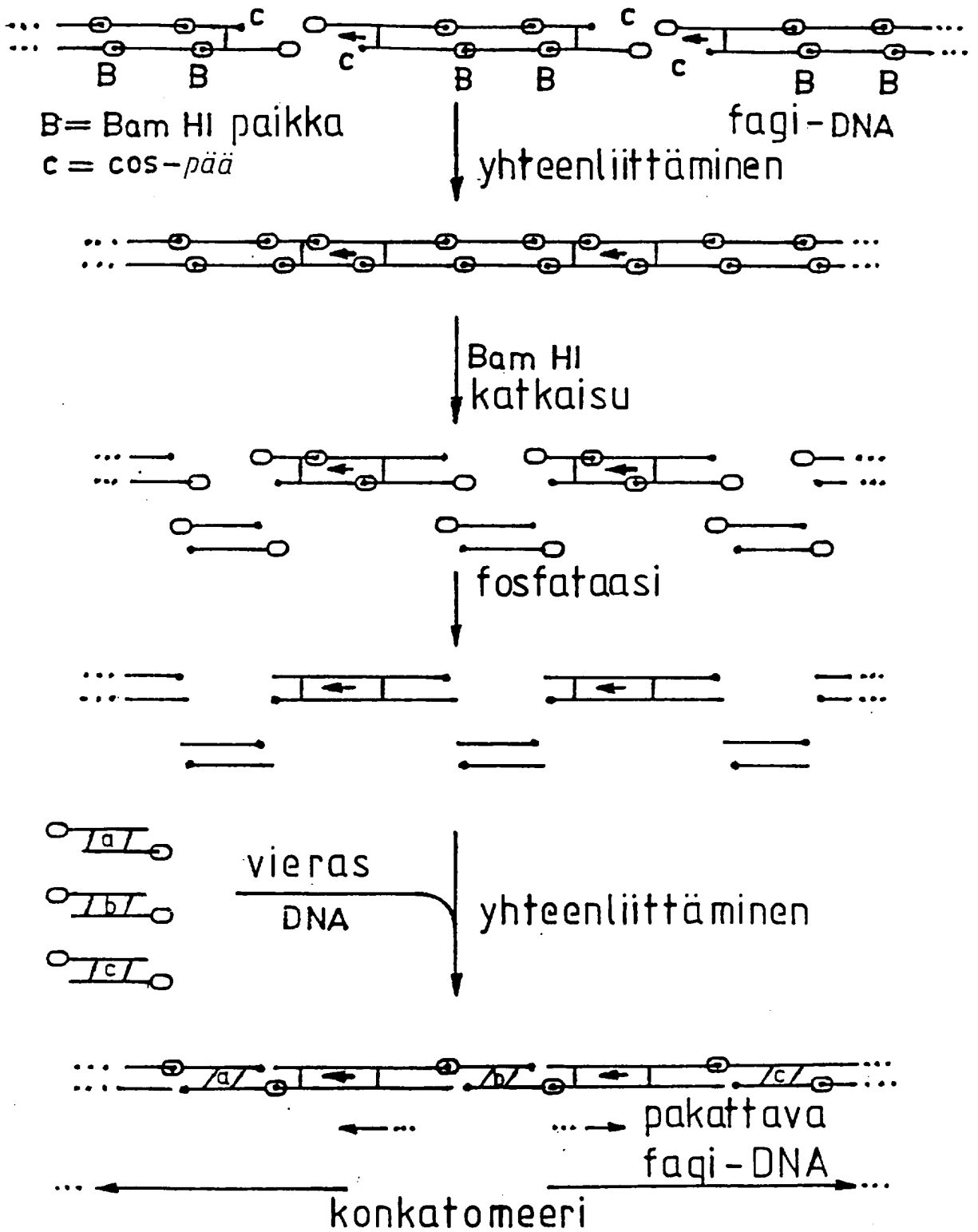
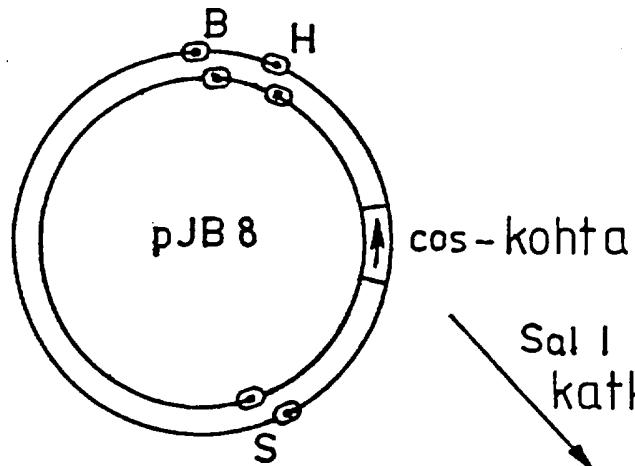


Fig. 2

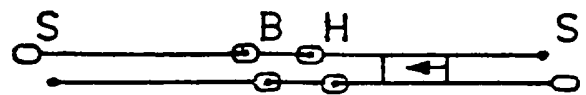
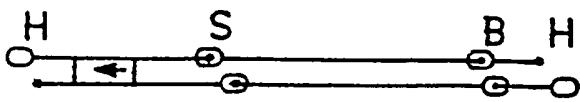
Kloonaus kosmidiin

Merkkien selitys
 H = Hind III
 S = Sal I
 kohta



Hind III
 katkaisu

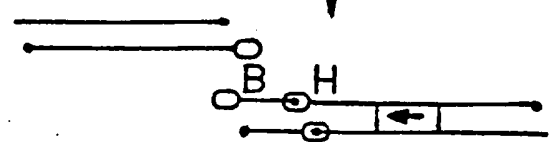
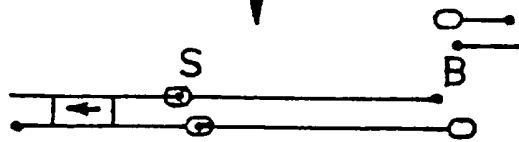
Sal I
 katkaisu



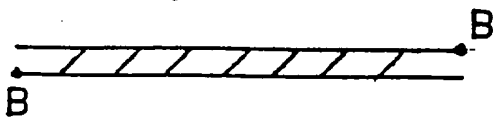
käsittely fosfataasilla



katkaisu Bam HI:llä



defosforyloitu



yhteenliittäminen

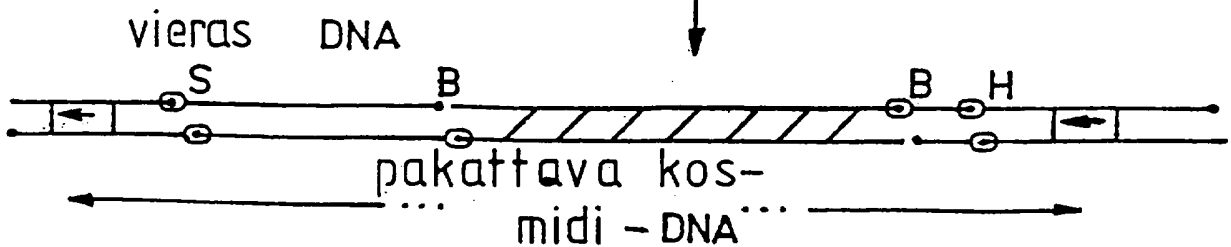


Fig. 3

pGY95:n ja pGY97:n valmistuksen kaaviomainen esitys

104494

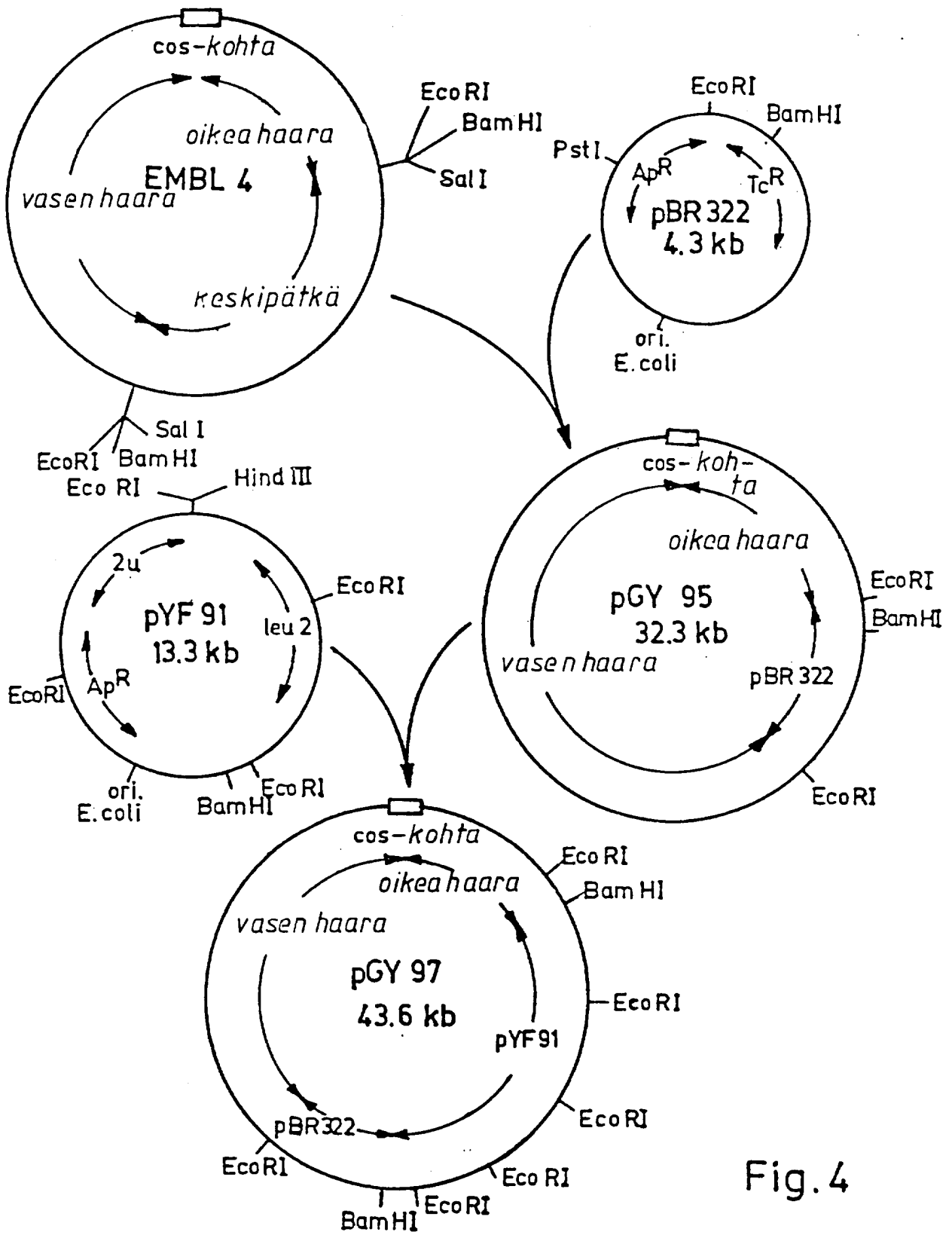


Fig. 4

pGY 95:n restriktio- ja toimintakartta

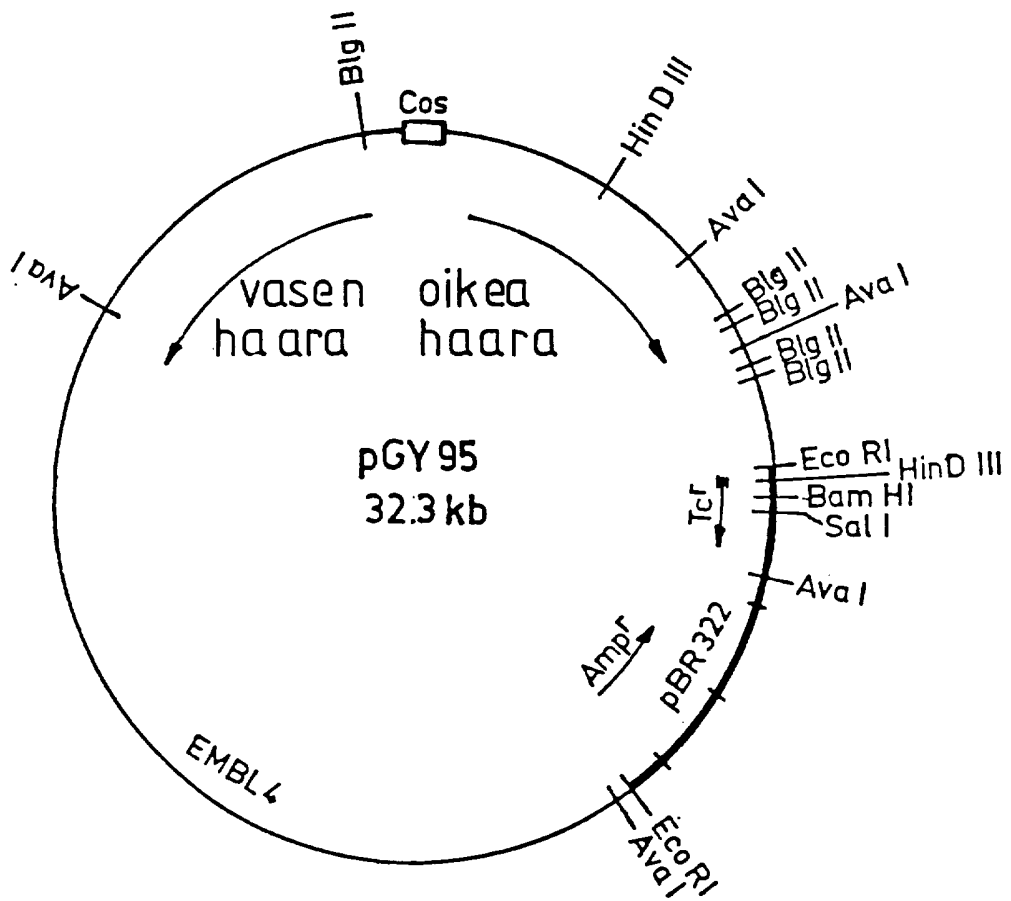


Fig. 5

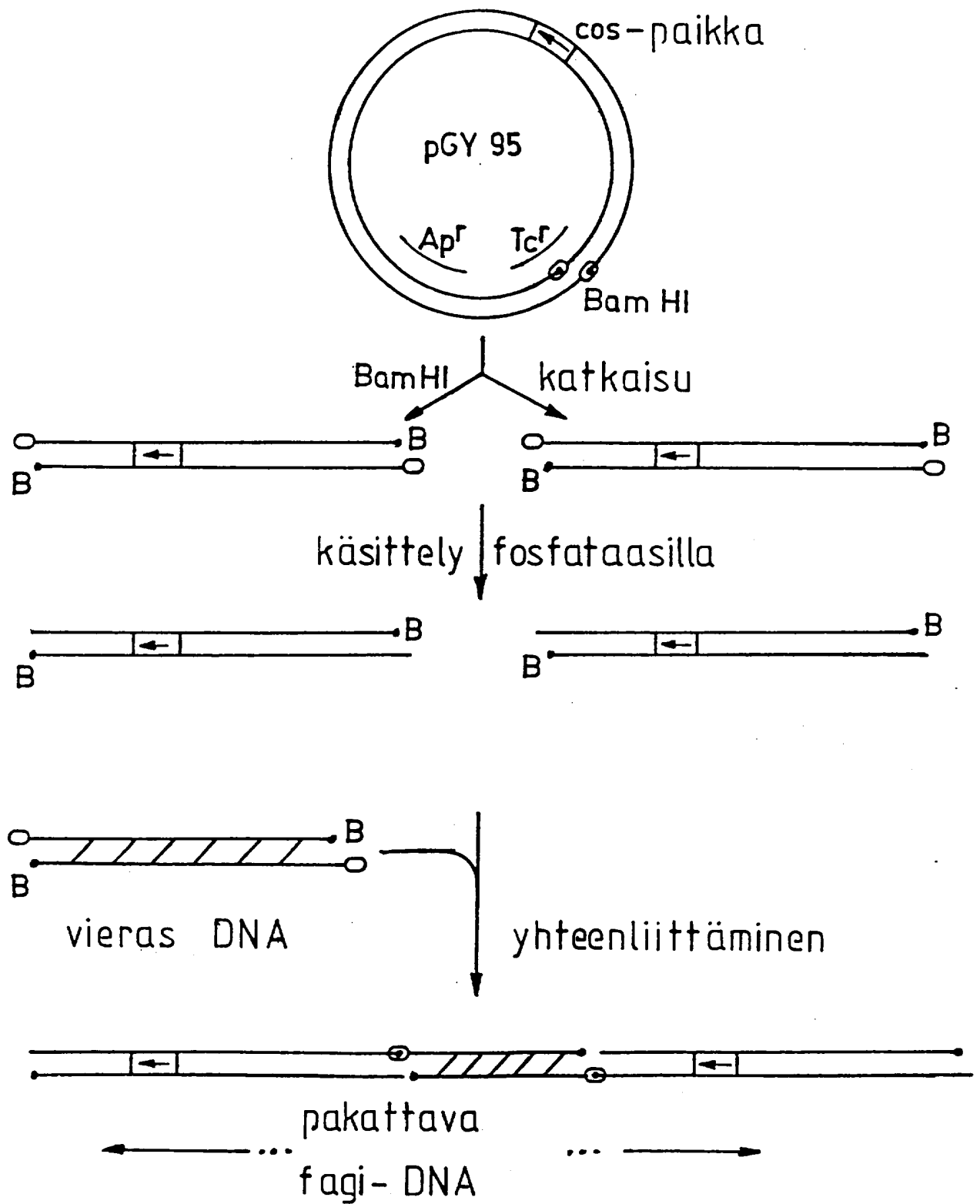


Fig. 6

pGY 97:n restriktio- ja toimintakartta

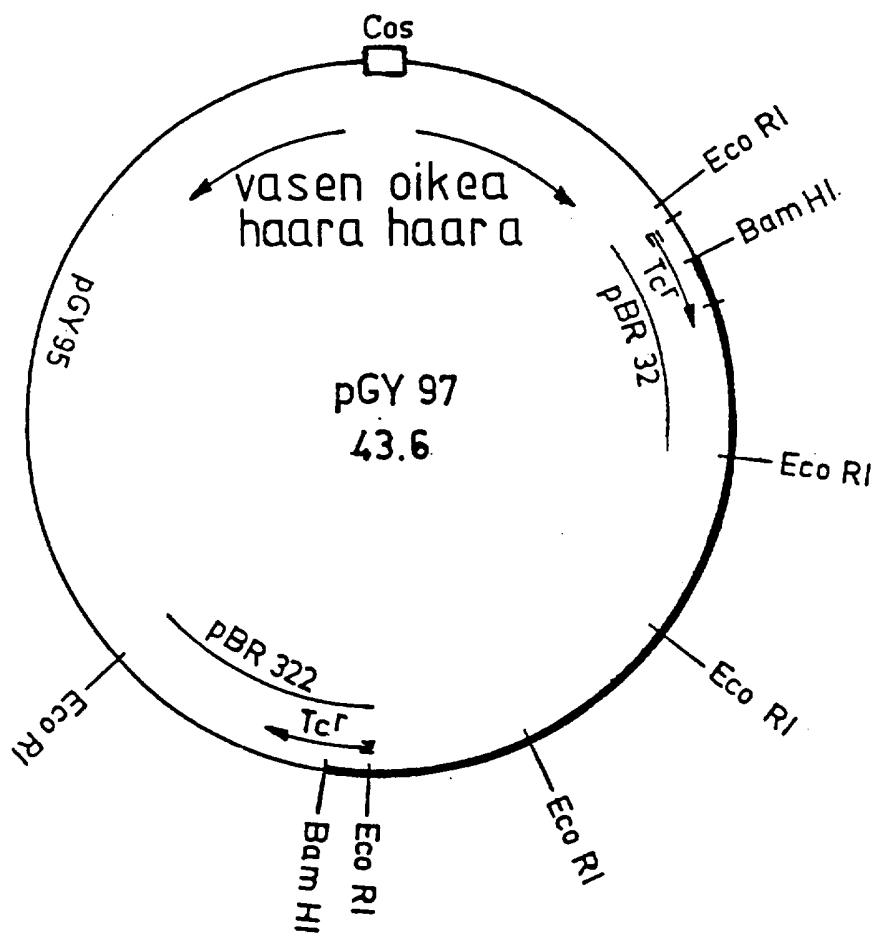
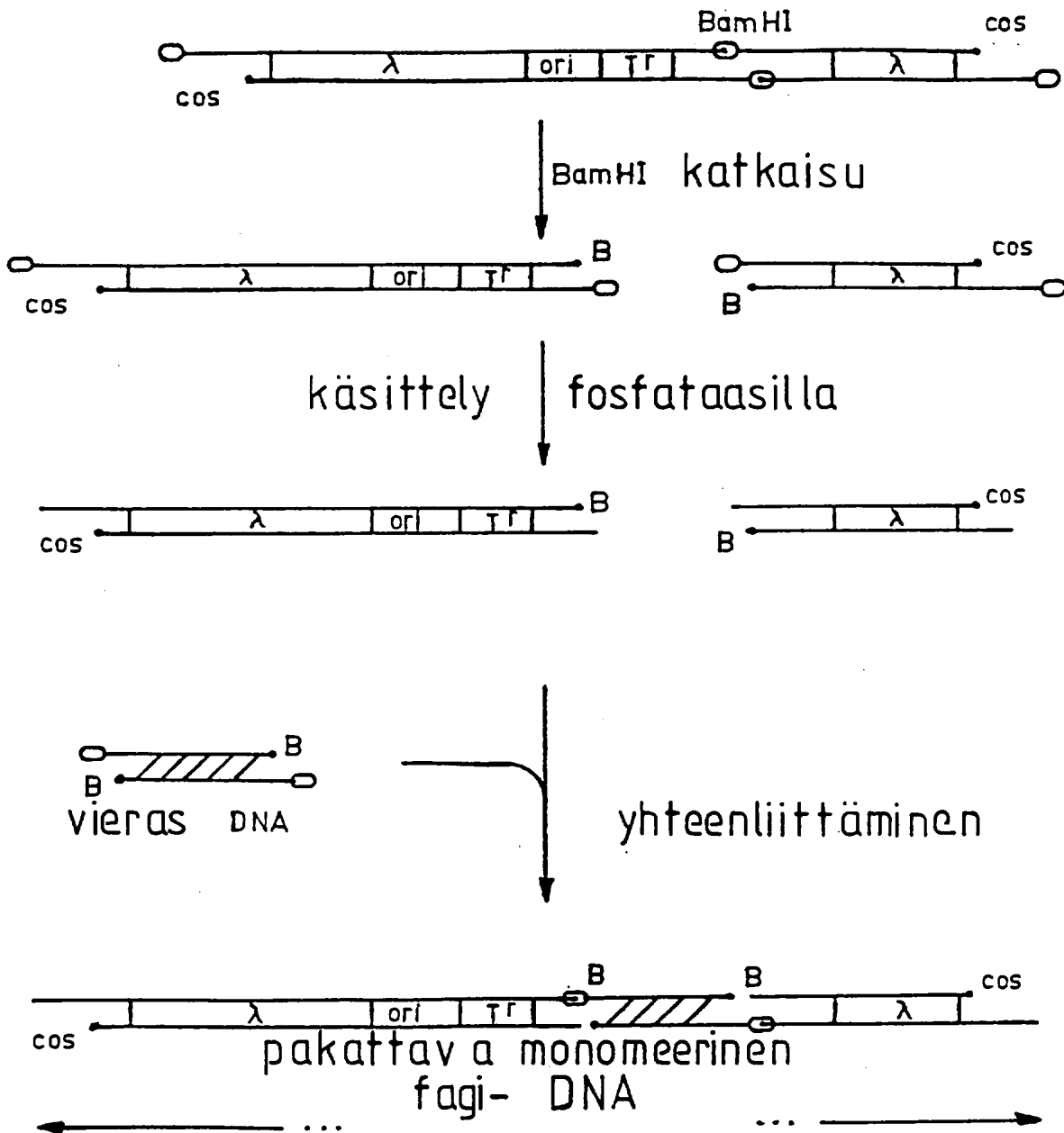


Fig.7

Kloonaus uudentyyppiseen fasmidiin

pGYOKI 9



Merkkien selitys

ori = streptomyces- origo
T^r = tiiostreptoni-resistanssi
 λ = λ DNA

Fig. 8

pGYOKI9:n ja pGYOKI10:n valmistuksen
kaaviomainen esitys

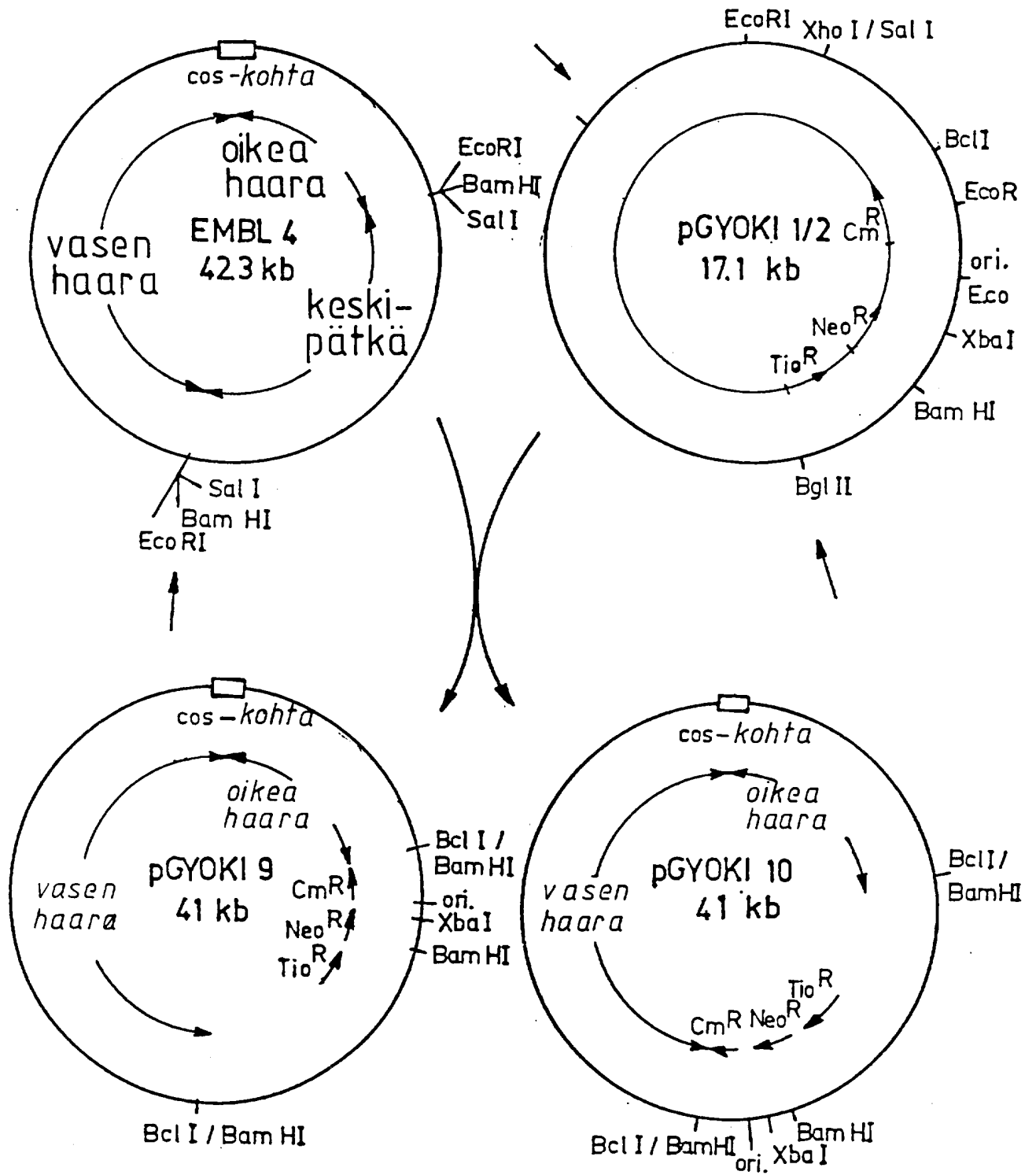


Fig. 9

pGYOKI 1/2:n valmistuksen kaaviomainen esitys

— PACYC184
 — pIJ41

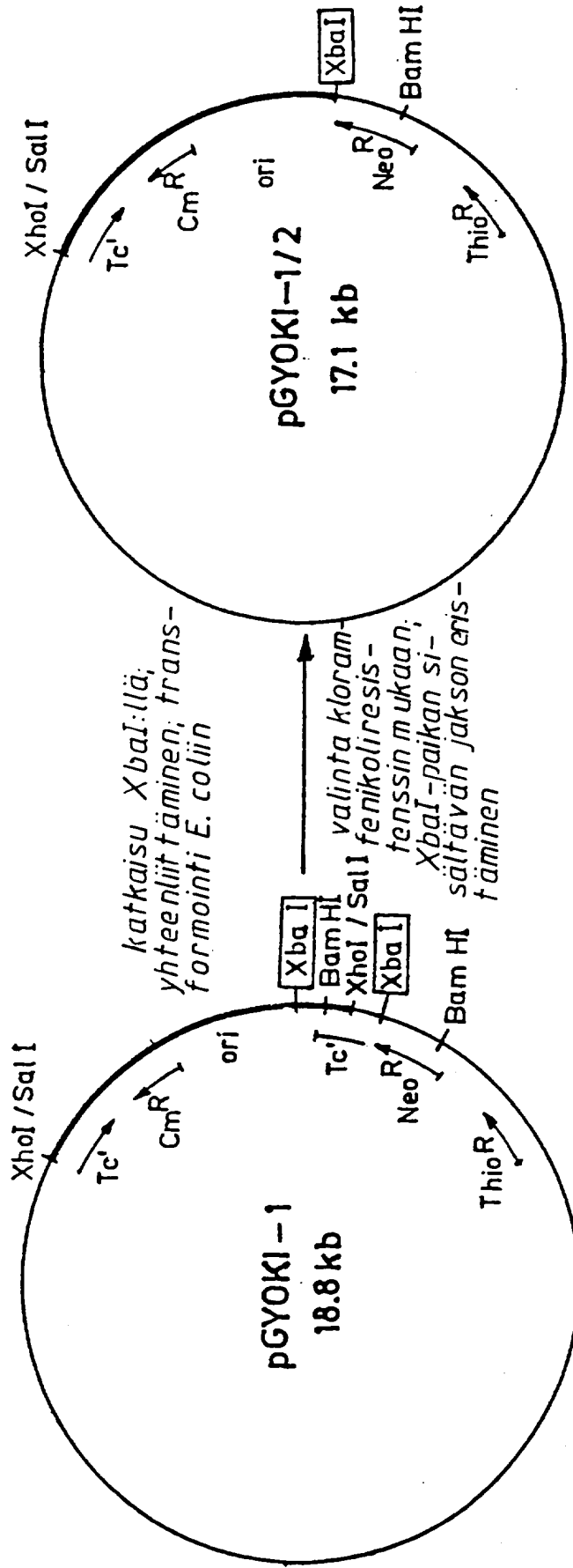


Fig.10

pGYOKI1/2:n restriktio- ja toimintakartta

— pACYC 184
— pIJ 41

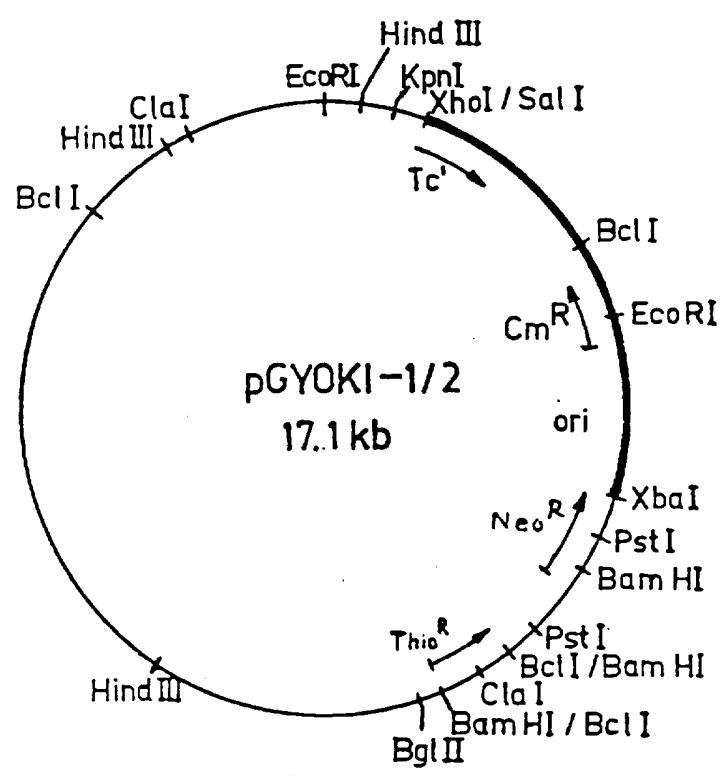


Fig. 11

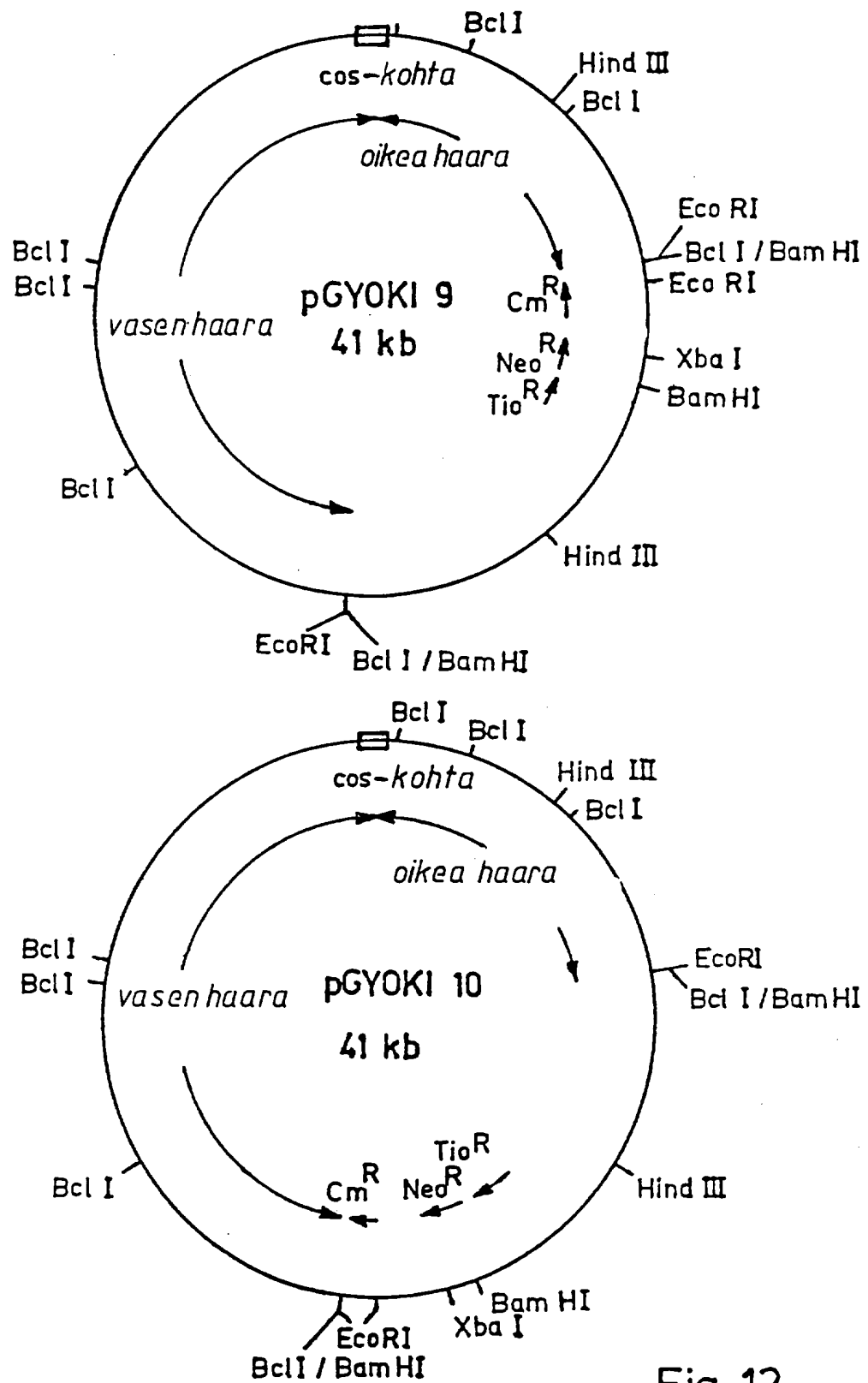


Fig.12