

C 12 N 15

Ans.nr.: 1361/84

Indleveret: 29 feb 1984

Løbedag: 29 feb 1984

Alm. tilgængelig: 10 sep 1984

Prioritet: 09 mar 1983 JP 38439/83

TERUHIKO \*BEPPU; Tokyo, JP.

Opfinder: Teruhiko \*Beppu; JP, Takeshi \*Uozumi; JP, Katsuhiko \*Nishimori; JP, Norio \*Shimizu; JP, Yoshiyuki \*Kawaguchi; JP, Makoto \*Hitaka; JP.

Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

Fremgangsmåde til udtrykkelse af et gen, der koder for prochymosin, i E.coli-værtsceller og udtrykkelsesplasmid til brug ved fremgangsmåden

#### SAMMENDRAG

1361-84

Fremgangsmåder til udtrykkelse af et prochymosin-kodende gen i E. coli-værtsceller, idet genet stammer fra et rekombinant-plasmid indeholdende clonet prochymosin cDNA, består i isolering af genet, binding hertil af en transkriptionel promotor og en translationel initiations-codon, indførsel af udtrykkelsesplasmidet i værtscellerne ved transformation og udvælgelse af transformerede celler med stor udtrykkelse for prochymosin, idet genet har mindst fra 5. kodende codon til afslutningen af koderækkefølgen (365. codon) for prochymosin, eller ved isolering af genet, binding af et syntetisk oligonukleotid bærende en komplementær del af prochymosin-koderækkefølgen, der er frigjort fra genet, til genet, fastbinding af en transkriptionel promotor og en translationel initiations-codon, dersom den ikke findes i det syntetiske oligonukleotid, til dannelse af udtrykkelsesplasmidet, indførsel af udtrykkelsesplasmidet i værtsceller ved transformation

under udvælgelse af transformerede celler med stor udtrykkelse for prochymosin, idet det syntetiske oligonukleotid eventuelt bærer en translationel initiations-codon.

Ekspressionsplasmid omfattende et prochymosin-kodende gen og en hertil knyttet vektor, idet vektoren oprindeligt stammer fra pBR322 plasmid, og idet den indeholder en transkriptionel promotor og en translationel initiations-codon. Prochymosin-gen omfattende en nukleotidrækkefølge fra den 1. codon (GCT) til den 365. codon (ATC).

Fremstillingsmetoder for pTRE1, pTRL1, pTRP1, pCR501, pCR601 og pCR701 plasmid beskrives.

Rekombinant-plasmid tilstede i E. coli FRI registreringsnummer FERM BP 262, 263 og 264.

Fremgangsmåde til fremstilling af prochymosin ved hjælp af udtrykkelsen af et prochymosin-kodende gen i E. coli-værtsceller beskrives.

Kalve-prochymosin fremstillet ved ovennævnte fremgangsmåde.

E. coli-stammerne deponeret i FRI under registreringsnumrene FERM BP 262, 263 og 264.

De beskrevne fremgangsmåder er anvendelige til storproduktion af prochymosin ved forgæring, idet udbytterne heraf er særdeles store.