



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

85876

C (45) Patentti myönnetty
Patent publicerat 10 08 1988
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/68, 1/21

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	854893
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	11.12.85
(24) Alkupäivä - Löpdag	11.12.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	13.06.86
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.02.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
12.12.84 DK 5940/84 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Novo Nordisk A/S, Novo Alle, Bagsvaerd, Danmark, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Diderichsen, Boerge Krag, 32, Estersvej, Hellerup, Danmark, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä plasmidien stabiloimiseksi bakteereissa viljelyn aikana
Förfarande för stabilisering av plasmider i bakterier under kultivering

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 12029 NCIMB
12030 NCIMB
12181 NCIMB

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 792481, FI A 841977, EP A 49619 (C 12N 15/00), EP A 80848 (C 12N 15/00),
EP A 127328 (C 12N 15/00), EP A 12494 (C 12N 15/00), EP A 106542 (C 12N 15/00),
EP A 120629 (C 12N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Uusi menetelmä kromosomien ulkopuolisten elementtien stabiloimiseksi bakteereissa viljelyn aikana käyttämättä antibiootteja elatusaineessa on kehitetty. Menetelmä sisältää isäntäbakteerin, jolla on vajausta kromosomigeenissä, jota tarvitaan solukuoren synteesiin tai säilymiseen, transformaation kromosomin ulkopuolisella elementillä, joka pystyy poistamaan isäntäbakteerin kromosomigeenin puutoksen aiheuttaman tarpeen. Lisäksi keksintö käsittää sellaisia transformoituja bakteereita ja stabiloituja, kromosomien ulkopuolisia elementtejä ja menetelmän haluttujen tuotteiden tuottamiseksi siirtämällä halutun tuotteen geenin stabiloituun, kromosomien ulkopuoliseen elementtiin, ja viljelemällä sopivia isäntäbakteereita, jotka sisältävät stabiloidun, kromosomien ulkopuolisen elementin, joka sisältää geenin haluttua tuotetta varten. Osoitettiin, että tämän menetelmän periaatteiden mukaan, plasmidia, joka sisältää *Bacillus subtilis*in dal-geenin ja haluttua tuotetta koodaavan geenin, voidaan säilyttää sopivassa dal⁻ *B. subtilis*-isännässä tavanomaisella kasvualustalla. Täten menetelmä mahdollistaa tuotteen saannon ja laadun parantamisen.

85876

Ett nytt förfarande för stabilisering av extra-kromosomala element i bakterier under kultivering utan användning av antibiotika i mediet. Förfarandet omfattar transformering av en värd bakterie som har en defekt i en kromosomgen, som behöves för syntetisering eller vidmakthållande av cellskalet, med ett extra-kromosomalt element med förmåga att undertrycka det av defekten i värd bakteriens kromosomgen förorsakade kravet. Uppfinningen avser ytterligare sådana transformerade bakterier och stabiliserade extra-kromosomala element och ett förfarande för framställning av önskade produkter genom införande av en gen för den önskade produkten i ett stabiliserat extra-kromosomalt element och kultivering av lämpliga värd bakterier innehållande det stabiliserade extra-kromosomala elementet innefattande genen för den önskade produkten. Det påvisades att enligt principerna för detta förfarande kan en plasmid innehållande *Bacillus subtilis* dal-gen och en gen, som kodar en önskad produkt, vidmakthållas i en lämplig dal⁻ B. *subtilis*-värd i konventionella media. Förfarandet möjliggör således en förbättring av utbytet och kvaliteten av produkten.

Menetelmä plasmidien stabiloimiseksi bakteereissa viljelyn aikana

Tämä keksintö liittyy uuteen menetelmään plasmidien stabiloimiseksi bakteereissa viljelyn aikana ilman tarvetta lisätä antibiootteja tai muita ei-toivottuja komponentteja kasvualustaan tarkoituksena lisätä saantoa tai fermentaatiotuotteiden laatua.

Mikro-organismeja suojelevat kromosomien ulkopuoliset geneettiset elementit, esimerkiksi plasmidit, ovat, yleisesti puhuen, pysymättömiä siinä merkityksessä, että elementit saattavat usein hävitä palautumattomasti. Tämä palautumattomuus on erityisen ilmeinen, jos plamidi ei ole syntyjään isäntämikro-organismista, esimerkiksi, koska se sisältää muiden organismien geenejä tai se on rakennettu geenijatkostuksella.

Jotta plasmidin stabiilisuus lisääntyisi, antibioottia tai muuta bioaktiivista yhdistettä, johon plasmidi, mutta ei kromosomi, antaa vastustuskyvyn, lisätään tavallisesti elatusaineeseen, jota käytetään mikro-organismien viljelyssä. Tällaisessa elatusaineessa ainoastaan sellaiset solut lisääntyvät nopeasti, jotka pitävät sisällään plasmidin, jolla on antibioottiin vastustuskykyinen geeni. Tämän lähestymistavan suurimmat haitat ovat siinä, että se vaatii laajan kantakokoelman antibiooteille resistentteja mikro-organismeja, lisäksi kalliita antibiootteja kasvualustaan mahdollisine haitallisine vaikutuksineen ympäristöön ja edelleen laajana puhdistuksena poistamaan antibiootti halutusta tuotteesta.

Isäntäkromosomin auksotrofisen mutaation komplementointi on toinen tunnettu menetelmä plasmidien stabilisoimiseksi. Tämä lähestymistapa kuitenkin rajoittaa huomattavasti kasvu-alustan koostumusta, ja vaatii viljelyä kasvualustalla, joka ei sisällä isäntämikro-organismien tarvitsemaa ravintoainetta, ja täten rajoittaen optioita, jotka ovat käyttökelpoisia tuottavuuden parantamisessa.

Tämän keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön menetelmä plasmidien stabiloimiseksi transformoiduissa bakteereissa ilman, että tarvitsee käyttää antibiootteja ja ilman huomattavia rajoituksia kasvualustan koostumuksessa.

Tämän keksinnön toisena tarkoituksena on antaa käyttöön plasmideja ja transformoituja bakteereita, jotka sisältävät tällaisia stabilisoituja plasmideja.

Edelleen tämän keksinnön tarkoituksena on antaa käyttöön menetelmä haluttujen tuotteiden tuottamiseksi transformoidulla bakteerilla ilman, että tarvitsee käyttää antibiootteja tai erityisiä rajoituksia kasvualustan koostumuksessa.

Keksinnön muut tarkoitukset selviävät alan asiantuntijoille. Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Keksintö pohjautuu havaintoon, jossa plasmideja voidaan pitää isäntäbakteerissa viljelyn aikana tavallisessa elatusaineessa, jos plasmidit suojelevat tiettyä funktiota, joka määrätyissä olosuhteissa vaaditaan isännän normaaliin kasvuun.

Kun mutantin isäntäbakteeria transformoidaan, deleetio tai muu puute toimintaa koodaavassa geenissä, joka annetuissa olosuhteissa vaaditaan isännän normaaliin kasvuun, esim. plasmidin suojellessa tätä toimintaa koodaavaa geeniä, ainoastaan solut, jotka transformoituvat ja säilyttävät plasmidin, jäävät henkiin, koska ainoastaan tällaisissa soluissa isäntäsolujen vaatimus on lisätty plasmidilla. Kuitenkin plasmidin pysyvä säilyminen on ainoastaan varma, jos geneettisen tiedon siirtymistä plasmidista kromosomiin ei voi tapahtua, ja isäntäbakteereiden spontaani mutaationopeus mutantiksi, jolla ei ole sellaista vaatimusta, on mitätön.

Tämän keksinnön näkökohdan mukaan kyseessä on menetelmä

plasmidien stabiloimiseksi bakteereissa viljelyn aikana, mainittu menetelmä sisältää: otetaan plasmidi, joka sisältää rakenteellista tai toiminnallista komponenttia koodaavan DNA-jakson, joka tarvitaan synteeseihin tai ylläpitämään solukuorta; ja transformoidaan isäntäbakteeri, jolta puuttuu kromosomaalisessa geenissä tämä rakenteellinen tai toiminnallinen komponentti, jolla on mainitun DNA-jakson sisältämä plasmidi; jonka avulla isäntäbakteerin kromosomin geenivajauksen aiheuttama tarve poistetaan plasmidille ja plasmidin menetys viljelyn aikana on merkityksetön.

Sen lisäksi menetelmä sisältää isäntäbakteerin rakenteen, josta spontaanin mutaation aiheuttama kromosomaalinen puutteellisuuden deleetio on mitätön, ja plasmidin rakenne, josta DNA-jaksoa lisättynä isäntäbakteerin kromosomivajavaisuuteen ei voida siirtää isäntäkromosomiin erikseen lopusta plasmidia.

Plasmidin sijasta voidaan käyttää myös bakteriofageja tai muuta geneettistä materiaalia, joka ei ole normaalisti läsnä isäntäbakteerissa eikä itsenäisinä molekyyleinä tai yhdistettynä kromosomiin. Etusijalle asetettuja kromosomin ulkopuolisia elementtejä ovat plasmidit, vaikka bakteriofagien ja muiden vektorisysteemien käyttäminen tai DNA:n integroituminen kromosomiin saattaa kuvata tätä keksintöä alan asiantuntijoille.

Tämän keksinnön lisänäkökohdan mukaan kyseessä on transformoitu bakteeri, jolla on vajavaisuutta kromosomigeenissä, jota tarvitaan synteeseihin tai solukuoren säilymiseen ja plasmidien suojelemiseen, joka pystyy poistamaan tarpeen, jonka aiheuttaa isäntäbakteerin kromosomivajaus.

Lisäksi tämä keksintö käsittää menetelmän haluttujen tuotteiden (se on DNA, RNA, peptidit ja proteiinit) tuottamiseksi transformoidussa bakteerissa, joka sisältää: yhdistetyn plasmidin, joka sisältää i) rakenteellista tai toiminnallista komponenttia koodaavan DNA-jakson, jota tar-

vitaan synteeseihin tai säilyttämään solukuorta ja ii) geenin mainitun halutun tuotteen koodaamiseksi; transformoitavan sopivan isäntäbakteerin, jolla on kromosomigeenissä vajausta mainitun rakenteellisen tai toiminnallisen komponentin suhteen mainitun yhdistetyn plasmidin kanssa; transformoidun bakteerin viljelemisen sopivalla ravintokasvialustalla; ja halutun tuotteen talteenottaminen viljelyalustalta.

Tämä keksintö sisältää myös menetelmän halutun tuotteen valmistamiseksi transformoidussa bakteerissa, joka menetelmä sisältää: sopivassa ravintoalustassa viljeltävän bakteerin, jolla on vajausta kromosomigeenissä, jota tarvitaan synteeseissä tai solukuoren säilyttämisessä, mainittu bakteeri sisältää yhdistetyn plasmidin, joka pystyy poistamaan isäntäbakteerin kromosomivajauksen aiheuttaman tarpeen, mainittu yhdistetty plasmidi voi sisältää myös mainittua haluttua tuotetta koodaavan DNA-jakson; ja ottaa talteen halutun tuotteen viljelyalustalta.

Sopivia isäntäbakteereja ovat bakteerit, jotka kuuluvat Bacillus- tai Enterobacteriaceae-lajiin, esim. Bacillus subtilis ja Escherichia coli, vaikka muiden sopivien bakteereiden käyttö saattaa olla ilmeinen alan asiantuntijoille.

Esityksessä käytetään seuraavia termejä:

- | | |
|---------------------------|---|
| dal-geeni: | geeni D,L-alaniinin rasemaatille. |
| dal ⁺ -geeni: | toiminnallinen geeni (villi tyyppi) D,L-alaniinin rasemaatille. |
| dal-l-geeni: | mutanttigeeni D,L-alaniinin rasemaatissa geeni aiheuttaa tavallisesti vaatimuksen ulkoisesta D-alaniinista: |
| dal ⁻ -isäntä: | mutantti-isäntä dal-geenissä (tässä vaaditaan normaalisti ulkoisen D-alaniinin lisäys kasvua varten). |
| dal ⁺ -isäntä: | isäntä, jolla on villin tyyppinen dal-geeni. |
| Dal ⁺ -isäntä: | isäntä, jolla ei ole vaatimusta ulkoiselle D-alaniinille. |
| Dal ⁻ -isäntä: | isäntä, jolla on vaatimus ulkoiselle D-alaniinille. |

- Cam^R: klooriamfenikoliresistanssi.
Kan^R: kanamysiiniresistanssi.
Amp^R: ampisilliiniresistanssi.
bla: geeni β -laktamaasille, joka aiheuttaa Amp^R:n.
cat: geeni klooriamfenikoliasetyylitransferaasille aiheut-
taen Cam^R:n.
amyM: geeni maltogeeniselle amylaasille.

Useimmille bakteereille kyky kasvaa ja jakautua riippuu hyvin pysyvästä solukuoresta (se on solumembraanit, soluseinät ja vastaavat rakenteet). Kuoren rikkoontuminen tai hajoaminen joh-
taa tavallisesti solukuolemaan tai kasvun loppumiseen.

Yksi välttämättömän tarpeellisista komponenteista kestäväälle solukuorelle *Bacillus subtilis* ja muilla bakteereilla on D-alaniini. D-alaniini on oleellinen osa soluseinämää, jolle se antaa ristisidoksellisia polysakkaridiketjuja täten antaen so-
lulle tarvittavaa jäykkyyttä. D-alaniinia ei ole useimmissa ta-
vanomaisissa kasvualustoissa, ja tavallisesti monet bakteerit,
mukaan luettuna *B. subtilis* ja *E. coli*, syntetisoivat tätä amino-
happoa L-alaniinista D,L-alaniinirasemaattientsyymillä ja eivätkä
tarvitse ulkopuolista D-alaniinilähdettä kasvuun. Jotkut mutantit
tarvitsevat ulkopuolisen D-alaniinilisäyksen kasvua varten,
esimerkiksi *B. subtilis* dal⁻-mutantit, joissa D,L-alaniini-
rasemaattigeeni on tuhoutunut mutaatioissa (Freese et al., *Proc.*
Natl. Acad. Sci. 51:1164 - 72, 1964, Dul et al., *J. Bacteriol.*
15:1212-14, 1973). Toiset mutantit saattavat tarvita ulkopuoli-
sen lisäyksen muita metaboliitteja solukuoren ylläpitämiseen,
kuten esimerkiksi diaminopimeliinihappo, D-glutamiinihappo ja
N-asetyyli-glukoosi-amiini.

Tämän keksinnön mukaan on osoitettu, että D,L-alaniinirasema-
atin toiminnallista geeniä suojelevat plasmidit pysyvät varmas-
ti dal⁻-isännässä, jos dal⁺-geeniä ei voida siirtää plasmidista
kromosomiin, ja isännän spontaani mutaatiofrekvenssi Dal⁺-feno-
tyypiksi on merkityksetön, ja jos ulkopuolista D-alaniinia ei
ole saatavissa solussa.

Täten liittämällä geeni haluttuun tuotteeseen sopivalla dal^+ -plasmidilla ja viljelemällä plasmidia sopivassa dal^- -isännässä, dal^+ -plasmidi säilyy suolukasvustossa varmistaen halutun tuotteen korkeita saantoja, jotka saadaan plasmidin itsenäisen replikaation aikana. Koska D-alaniinia ei esiinny monissa tavannaomaisissa kasvualustoissa, ei tarvita enää lisärajoituksia tällä elatusaineella.

Sen mukaisesti tämä keksintö kuvaa tarkoituksenmukaista menetelmää plasmidien stabiloimiseksi, jotka sisältävät haluttuja tuotteita varten geenejä viljelyn aikana.

Jotta varmistetaan, että isännän spontaani mutaationopeus Dal^+ -fenotyyppi on merkityksetön, saattaa olla tarpeellista poistaa osa dal -geenistä.

Kuitenkin, yhdistämällä sellainen isäntä, joka sisältää poistetun osan dal -geeniä, joka tarvitaan Dal^+ -fenotyypin ilmenemiseen dal^+ -plasmidin kanssa, joka suojaa kokonaista dal^+ -geeniä ja osia, jotka ovat homologisia DNA:n kanssa, jotka sivuavat poistetun kromosomin molempia sivuja, dal^+ -vastageenin siirtymisen plasmidista kromosomiin saattaa tapahtua homologisella risteytyksellä. Jotta vältettäisiin tällainen homologinen riskiteytys, isäntä rakennettiin siten, että dal -poisto laajennettiin segmentteihin sivuten kromosomin dal -geeniä. Myös plasmidi rakennettiin siten, että se suojelee toiminnallista dal^+ -geeniä, mutta ei DNA:ta, joka on homologinen DNA:lle, joka sivuaa molemmilta puolin poistettua kromosomia. Yhdistämällä tämä viimeksi mainittu plasmidi edellä mainitun dal^- -isännän kanssa muodostuu esitetty isäntä-vektoripari.

Vaihtoehtoisesti, dal^+ -vastageenin siirto voidaan estää joko käyttämällä rekombinoitua, heikennettyä isäntää tai käyttämällä kromosomien ulkopuolista dal^+ -geeniä joko ei ollenkaan tai vähäisen isäntäbakteerin kromosomin DNA-homologin kanssa.

Ensisijaisesti dal^+ -geeni on johdettu *B. subtilis*-kannasta, kuten on selitetty jatkossa tarkemmassa yksityiskohdassa. dal^+ -geenin lisäksi plasmidin pitäisi myös sisältää osa plasmidin kopiointiin, esimerkiksi kopiointitoiminnot paljon kopioivasta plasmidi pUB110:sta kopiointiin *Bacillaessa* tai muissa gram-positiivisissa bakteereissa tai pBR322:n kopiotoiminta *Enterobacteriacaessa* tai muissa gram-negatiivisissa bakteereissa kopiointiin.

Tämän keksinnön mukaan halutun tuotteen tuottaminen on esitetty tuottamalla maltogeenista amylaasia *Bacillus*-kannasta (NCIB 11837) nopeutettuna sen omalla promoottorilla. Muita esimerkkejä halutuista tuotteista, joita voidaan tuottaa tämän keksinnön mukaan, ovat toisentyypiset amylaasit, amyloglykosidaasit, pululanaasit, proteinaasit, lipaasit, hormonit ja muut ensyymit tai eukaroyttiset proteiinit ja peptidit.

Keksintöä kuvataan edelleen oheisten, viitteenä olevien kuvioiden mukaan, joissa

kuvio 1 esittää plasmidien pDN691, pDN770, pDN820 ja pDN1050 rakennetta,

kuvio 2 esittää pDN1122:n rakennetta,

kuvio 3 esittää plasmidien pDN1090, pDN1120, pDN1222 ja pDN1277 rakennetta rajoittavien entsyymiosien kartan pDN1000:ssa,

kuvio 4 esittää plasmidien pDN1130 ja pDN1290 rakennetta,

kuvio 5 esittää plasmidin pDN1274 rakennetta, ja

kuvio 6 esittää plasmidin pDN1800 rakennetta.

Keksinnön menetelmä sallii transformoidun bakteerin viljelyn antibiooteista vapaassa elatusaineessa. Olisi kuitenkin ymmärrettävä, että se ei ole ehto keksinnön toteuttamiselle, ainoastaan seuraus siitä. Jos on käytännöllistä tai hyödyllistä viljellä keksinnön mukaista transformoitua bakteeria antibiootin (antibioottien) kanssa, näin voidaan totta kai tehdä.

dal^+ -geeni saatiin DN497:stä, *Bacillus subtilis* 168-kannan johdannaisesta (Spizizen, Proc. Natl. Acad. Sci. 44, 1072-78, 1958). Kromosomaalinen DNA eristettiin täysin sopivilla restri-

tioentsyyymeillä ja sidottiin plasmidin pDN691 kanssa, joka antoi vastustuskyvyn klooriamfenikolia ja kanamysiiniä vastaan, ja kopiointikyvyn *B. subtilis*:ssä: sidottu DNA siirrettiin *D-alaniinia* vaativaan *B. subtilis* *dal*⁻:seen valikoiden *D-alaniinin* vaatimuksen lisäystä. *Dal*⁺-transformantti, josta oli samanaikaisesti tullut *Cam*^R (klooriamfenikoliresistantti) sisälsi rekombinoitua plasmidia, joka oli johdettu pDN681:stä, jolla *Dal*⁺- ja *Cam*^R-fenotyypit sidottiin. Mahdollisesti homologisesta rekombinaatiosta johtuen kromosomin ja plasmidin välillä, vain hyvin pieni määrä plasmidia voitiin havaita transformantissa.

Jotta vältettäisiin plasmidin rekombinaatio ja edelleen yhden-tyminen kromosomiin, plasmidi valmistettiin tästä *Dal*⁺ *Cam*^R-transformantista ja siirrettiin *D-alaniinia* vaativaan ja rekombinoituun, heikentyneeseen kantaan DN733 *dal*⁻ *recE*⁻ valkoi-vaan *Dal*⁺:san. Transformanteista tuli samanaikaisesti *Dal*⁺ *Cam*^R ja *Kan*^R (kanamysiiniresistantti).

Transformantit sisälsivät pieniä määriä plasmidia, noin 16 kb. Tästä plasmidista, 2,0 kb *Clal*-*SphI*-osan antava *Dal*⁺-fenotyyppi kloonattiin 2,6 kb osan plasmidilla pDN820: *Cam*^R-kannassa DN608: *dal*⁻-valikoivaan *Cam*^R *Dal*⁺:saan antamaan 4,6 kb rekombinantti plasmidin pDN1000. Tämä plasmidi voi kuitenkin korvata rekombinoitujen, hyvien kantojen (esim. DN608) kromosomien *dal*-l-mutaation homologisen rekombinaation *dal*⁺-vastageenillä, jossa *Dal*⁺-fenotyypin valinta ilman siihen liittyvää *Cam*^R valintaa, ei voida enää varmistaa plasmidin säilymistä.

Jotta estettäisiin *dal*⁺-vastageenin siirtyminen kromosomiin homologisella rekombinaatiolla ja edelleen plasmidin häviäminen, ja jotta vähennettäisiin mutaatioiden esiintymistiheyttä aiheuttaen *Dal*⁺-tyypin, isäntäkromosomista poistettiin sekä isännän *dal*-geeni sekä naapuriosan *dal*-geeni: kloonattu *dal*-geeni katkaistiin restriktioentsyyymeillä *EcoRI* ja *EcoRV*, ja edelleen eristettiin eksonukleasilla *Bal31*. Eristetty seos sidottiin ja transformoitiin DN608 *dal*⁻ valikoiden *Cam*^R. Transformantit, joiden sisältämiltä plasmideilta puuttui *dal*-geeni, tunnistettiin *Dal*⁻ *Cam*^R:ksi. Isäntäkannan valmistamiseksi sopivalla *dal*-geenin poistolla *dal*⁺-isäntä siirrettiin yhden poistetun plasmidi-

din, pDN1274 Cam^R dal⁻:n kanssa. Valikoiden Cam^R, noin 0,1 % transformantista oli Dal⁻ ilmeisesti johtuen kromosomaalisesta dal⁺-geenin täydennyksestä yhdessä homologisella rekombinaatiolla poistetun dal⁻-osan pDN1274:n kanssa. Tätä seuranneessa spon-
 taanissa pDN1274:n häviämisessä kasvun aikana D-alaniinin läsnä-
 ollessa ja klooriamfenikolin puuttuessa, plasmidivapaa kanta
 DN1280 säilyi Dal⁻:na. Southern blotting-analyysit kromosomi-
 DNA:n DN1280:sta osoitti, että se todella suojeli oletettua
 dal-poistoa. Tämä dal⁻-poistettu isäntä, kanta DN1280, siirret-
 tiin dal⁺-plasmidin kanssa (esim. pDN1090), joka suojeli sekä
 lopullista dal⁺-geeniä että osia, jotka ovat homologisia DNA:n
 kanssa, jotka sivuavat molempia kromosomin poistetun osan sivu-
 ja. dal⁺-geenin siirto plasmidista kromosomiin homologisella
 rekombinaatiolla pystyi tämän vuoksi tapahtumaan, ja isäntä
 voitiin muuttaa dal⁺:ksi. Siten plasmidin säilyminen ei ollut
 enää ehtona Dal⁺-fenotyyppille, ja plasmidi menetettiin usein. dal⁺-
 plasmidi, pDN1277, valmistettiin sitten suojelemaan lopullista
 toiminnallista dal⁺-geeniä, mutta ei DNA-homologeja DNA:lle,
 jotka sivuavat isäntäkromosomin poistettua osaa, mikä selitet-
 tiin edellä. Siksi dal⁺:n siirto plasmidista kromosomiin homo-
 logisella rekombinaatiolla ei pystynyt tapahtumaan dal⁻-poiste-
 tun isännän transformaatioissa pDN1277:n kanssa. Siten DN1280
 on sopiva dal⁻-isäntä D-alaniinivapaalla elatusaineella dal⁺-
 plasmideille, jotka eivät suojele DNA:ta mukaanlukien EcoR5-
 osan, joka normaalisti sivuaa kromosomin dal-geeniä, mutta joka
 on poistettu DN1280:sta.

Jotta varmistuttaisiin, että tieteellisesti tai kaupallisesti
 kiinnostavat kloonatut geenit todellakin säilyvät plasmideissa
 D-alaniinivapaassa alustassa edellä esitetyllä isäntä-vektori-
 systeemillä, Bacillus C599 (NCIB 11837) maltogeeninen amylaasi-
 geeni siirrettiin dal⁺-plasmidiin. Kaksi plasmidia pDN1130 ja
 pDN1290 valmistettiin. Molemmat plasmidit suojelevat plasmidin
 PUB110:n replikointitoimintoja ja toiminnallisia dal- ja amyM-
 geenejä. Kumpikaan plasmideista ei anna millekään antibiootille
 vastustuskykyä. Plasmidit pDN1130 ja pDN1290 siirrettiin edellä
 mainittuun B. subtilis-kantaan DN1280. Kanta DN1280 suojelee
 edellä mainittua kromosomaalista poistettua osaa, joka sisältää
 sekä osan dal-geenistä, joka on välttämätön Dal⁺-fenotyyppin

syntymiselle että viereisen osan, jota ei vaadita Dal^+ -fenotyyppiin, se on osa dal -geeniä *sensu strictu* tai ei. $pDN1290$ ei suojele tätä jälkimmäistä poistettua osaa. Niinpä dal^+ -geeniä ei voida siirtää $pDN1290$:stä kromosomiin kaksinkertaisella, homologisella rekombinaatiolla. Plasmidi $pDN1130$ toisaalta suojelee molempia kokonaisia osia, jotka on poistettu kromosomista ja viereisistä osista. Tästä syystä dal^+ -geenin siirtoa plasmidista kromosomiin ja edelleen plasmidin häviämistä saattaa tapahtua.

Saadut transformoidut kannat $DN1297$ ($=DN1280$ $pDN1130$) ja $DN1300$ ($=DN1280$ $pDN1290$) testattiin plasmidin säilymistä viljelyn aikana (katso esimerkki 7). Viljeltäessä $DN1297$:ää tapahtui homologinen risteytys, joka palauttaa dal^+ -geenin kromosomin, ja sekä plasmidi että Amy^+ -fenotyyppi menetettiin usein.

Viljeltäessä $DN1300$:aa ei havaittu plasmidin tuottaman Amy^+ -fenotyypin häviämistä kasvun aikana D -alaniinia sisältämättömässä elatusaineessa. Jos D -alaniinia lisättiin elatusaineeseen, solut kuitenkin menettivät usein plasmidin ja muuttuivat Amy^- Dal^- :seksi. Näin todistettiin tärkeän ei-syntyperäistä geeniä suojelevan plasmidin pysyvä säilyminen antibioottivaapaassa elatusaineessa.

Jotta osoitettaisiin, että plasmidit säilyvät myös gram-negatiivisilla organismeilla D -alaniinin vaatimuksen lopettamisella *B. subtilis*in dal -geeni kloonattiin D -alaniinia vaativan *Escherichia coli*-mutantin plasmidiin, ja osoitettiin täydentämällä vaatimus.

Tämän keksinnön lähemmät yksityiskohdat ilmenevät seuraavista esimerkeistä.

Plasmidien ja kromosomi-DNA:n valmistaminen ja *Bacillus subtilis*in ja *E. coli*n transformointi tehtiin seuraavien, yleisten menetelmien mukaan. Eristäminen restriktioentsyymeillä, Bal 31-nukleaasikäsittely, oligo-DNA-sitojan liittäminen ja sitominen DNA:n $T4$ -ligaasin kanssa suoritettiin New England Biolabs'in

entsyymeillä toimittajan esittämissä olosuhteissa.

Kannat

Kaikki *Bacillus subtilis*-kannat oli johdettu *Bacillus subtilis* 168:sta (Spizizen, Proc. Natl. Acad. Sci., 44: 1072-78, 1958). RUB200: aroI906, amyE07, amyR2 saatiin tri. Frank Young'ilta, Rochester'in Yliopistosta, New York. SL438: trpC2 (itiöiden muodostuminen ja proteaasin puuttuminen) saatiin tri. Kim Hardy'ltä, Biogen, Geneve. DN497: amyE07, amyR2 on RUB200:n aro⁺-transformantti SL438 kromosomi DNA:n kanssa, QB1133: aroI906, metB5, sacA321, amyE saatiin tri. Georges Rapoport'ilta, IRBM, Pariisi. QB1130: dal, metB5, sacA331, amyE saatiin *Bacillus Genetic Stock Center*stä, Columbus, Ohio. DN608: dal-1. metB, sacA, amyE oli aro⁺, QB1133:n dal-1-transformantti QB1130:n kromosomi-DNA:n kanssa. MT120: leuB6, recE4 r_m⁻ m_m⁻ saatiin tri. Teruo Tanaka'ltä, Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, Tokio. DN773: dal-1, amyE, recE, sacA oli DN608:n met⁺ recE-transformantti MT120:n kromosomi-DNA:n kanssa. DN606 on DN608 transformoituna plasmidin pUB110 kanssa.

Escherichia coli-kanta TKL10: thr-1 leuB6 codA1 trp-64 pyrF101 his-108 thyA6 argG66 ilvA634 thi-1 alr-1 deoC1 lacY1 tonA21 tsx95 supE44 (Wijsman, Genet. Res., Camb. 20: 269-77, 1972) saatiin tri. Barbara Bachmann'ilta *E. coli Genetic Stock Center* Connecticut, U.S.A, (CGSC 5466).

Plasmidit

2,7 kb:n pUC9 antaa vastustuskyvyn ampisilliinille ja johdettiin pBR322:sta (Vieira et al., Gene 19: 259-68, 1982). 4,4 kb:n pBR322 antaa vastustuskyvyn ampisilliinille ja tetrasykliinille (Bolivar et al., Gene 2: 95-113, 1977).

Plasmidit pUB110 ja pBD64 (Gryczan et al., J. Bacteriol. 134: 318-329, 1978, ja Gryczan et al., J. Bacteriol. 141: 246-53, 1980) eristettiin *B. subtilis*-kannoista BD366 ja BD624, kukin erikseen. pUB110 ja pBD64 molemmat antavat vastustuskyvyn kanamysiiniin, ja pBD64 myös klooriamfenikoliin. *B. subtilis*-kannat BD366 ja BD624 voidaan saada *Bacillus Genetic Stock Center*'istä,

Columbus, Ohio, USA (kantakokoelman numero BGSC1E6 ja 1E22). 7,6 kb:n plasmidi pDN452 antaa vastustuskyvyn klooriamfenikoliin ja kanamysiisiin ja suojaa rakenteellista geeniä *Bacillus subtilis* NCIB 11837 maltogeeniselle amylaasille. pDN452:n rakenne on kuvattu EP-patenttihakemuksessa n:o 84301994.4.

I. *B. subtilis* transformointi

Vaaditut *Bacillus subtilis*-solut valmistettiin Yasbinin et al. mukaan (J. Bacteriol. 121: 296 - 304, 1975). Solut otettiin talteen sentrifugoimalla (7000 kierr/min, 3 min), suspendoitiin uudelleen yhteen kymmenenteen tilavuusosaan supernatanttia sisältäen 20 % glyserolia, jäädytettiin nestemäisellä typellä ja varastoitettiin -70°C :ssa. Transformointia varten, jäädytetyt solut sulatettiin 42°C :ssa ja sekoitettiin yhden tilavuusosan puskurin kanssa (Spizizen'in minimaalinen elatusaine (Spizizen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44: 1072 - 78, 1958)) 0,4 % glukosin, 0,04 M MgCl_2 :n ja 0,002 M EGTA:m kanssa). DNA lisättiin ja seos inkuboitiin ravistelemalla 37°C :ssa 20 minuutin ajan. Sitten solut valettiin maljalle sopivalla selektiivisellä elatusaineella.

II. *E. coli* transformaatio

Yön yli viljelty *E. coli* K-12-kanta n:o 802 LB:ssa (10 g Bacton tryptonia, 5 g Bacton hiivauutetta ja 10 g NaCl:a per litra vettä, pH 7,0), laimennettiin 100-kertaisesti 500 ml LB:lla ja kasvatettiin 37°C :ssa arvoon $\text{OD}_{450} = 0,4$. Viljelmä jäädytettiin, jätettiin jäiden päälle 15 minuutin ajaksi, pyöritettiin 15 min 3000 kierr/min:ssa (Sorvall'in GS3 roottorilla), suspendoitiin uudestaan 200 ml:aan kylmää 0,1 M CaCl_2 :a, pidettiin jäissä 20 min, pyöritettiin 10 min 300 kierr/min:ssa, suspendoitiin uudestaan 5 ml:aan kylmää 0,1 M CaCl_2 :a ja pidettiin jäissä 20 h. Sitten lisättiin kylmää glyserolia 10 %:iin ja tasaosat jäädytettiin nestemäisellä typellä ja varastoitettiin -70°C :ssa. Jäätäneet solut sulatettiin jäillä, DNA lisättiin, seosta inkuboitiin 45 min jätten päällä, kaksi min 37°C :ssa ja sitten valettiin sopivalle selektiiviselle kasvualustalle.

III. Plasmidien valmistus *E. colista*

E. colia kasvatettiin yli yön 250 ml LB:ssa, 0,4 % glukosissa

ja sopivassa antibiootissa. Solut otettiin talteen sentrifugomalla ja uudelleensuspendoitiin 4 ml puskuria 1 (0,025 M Tris·HCl, pH = 8,0, 0,01 M EDTA, 0,05 M glukosia, 2 mg/ml lysotsyymiä). Suspensiota inkuboitiin 0°C:ssa 15 min ajan ja sitten sekoitettiin 8 ml puskurin 2 kanssa (0,2 M NaOH, 1 % SDS). Sitten 6 ml puskuria 3 (3 M natriumasetaattia, pH = 4,8) lisättiin, seosta pidettiin 0°C:ssa 60 min, jonka jälkeen sentrifugoitiin 20 min ajan 19 000 kierr/minuutissa (noin 45 000 g Sorvall'in SS34 roottorilla). Supernatantti saostettiin 0,6 tilavuudella kylmällä isopropanolilla ja suspendoitiin uudelleen 1,2 ml 5TE:hen (0,05 M Tris·HCl, pH = 8,0, 0,005 M EDTA), ynnä 20 µl keitettyä RNAasia A (Boehringer) (2 mg/ml). 30 min myöhemmin liuos laitettiin kerrokseksi 4,0 ml puskurin 4 (80 g CsCl ynnä 56 ml 5TE) päälle ja 0,1 ml EtBr (10 mg/ml etidiumbromidi) VTi65-puskurissa. Seosta sentrifugoitiin 45 000 kierr/minuutissa 20 h. Plasmidi poistettiin sitten putkesta, dialysoitiin ja uutettiin kuten kappaleessa VI.

IV. Plasmidin valmistus B. subtiliksesta

Plasmidi valmistettiin kuten kuvatut E. coli-kannat (katso kappale III), mutta seuraavin muutoksin. Kasvatus oli LB:ssa sisältäen 0,01 M kaliumfosfaattia, pH = 7,0 ja sopivaa antibioottia (esim. 6 µg/ml klooriamfenikolia) ja jos vaadittiin 100 µg/ml D-alaniinia. Talteenoton jälkeen solut inkuboitiin 37°C:ssa lysotsyymin kanssa. Puskuri 2 korvattiin seoksella jossa oli yksi tilavuus puskuria 2 ja kolme tilavuutta puskuria 5 (0,2 M glysiini, 0,2 M NaCl ja 1 % SDS). Seuraavat kohdat olivat samoja kuin kappaleessa III.

V. Plasmidien pienen mittakaavan valmistus B. subtiliksesta

5 ml B. subtiliksen plasmidi LB:ssa (sisältäen 0,01 M fosfaattia pH = 7,0 ja sopivia antibiootteja ja D-alaniinia, jos tarvitaan) valmistettiin kuten kappaleessa IV, paitsi 1: puskuroiden tilavuutta vähennettiin nelinkertaisesti. 2: 0,5 ml fenolia ja 0,5 ml kloroformia lisättiin puskurin 3 jälkeen. 3: sentrifugoinnin jälkeen 19 000 kierr/minuutissa supernatantti saostettiin etanolilla, suspendoitiin uudelleen 400 µl puskuuriin 6 (0,05 M Tris·HCl pH = 8,0, 0,1 M natriumasetaatti), plasmidi saostettiin taas, suspendoitiin uudelleen 400 µl puskuuriin 6, saostet-

tiin, pestiin ja suspendoitiin uudelleen 100 μ l TE:hen (0,01 M tris, HCl, pH = 8,0, 0,001 M EDTA) 1 μ g/ml keitettyä RNAasia A (Boehringer).

VI. Kromosomi-DNA:n valmistus B. subtiliksesta

Jäätyneiden solujen pyörykkä noin 50 ml:n viljelmästä suspendoitiin uudelleen 1,1 ml puskuria (0,05 M Tris·HCl, pH = 7,4, 0,1 M NaCl, 25 % sakkaroosi). 100 μ l lysotsyymiä (25 mg/ml) ja 150 μ l EDTA:ta (0,5 M, pH = 8,0) lisättiin. Seosta inkuboitiin 37°C:ssa 30 min. 2 ml 0,2 % SDS:ää lisättiin, jonka jälkeen inkuboitiin 30 min 37°C:ssa. 1 g CsCl:ää ja 0,05 ml EtBr:a (10 mg/ml) lisättiin per 0,95 ml seosta ja seosta sentrifugoitiin 45 000 kierr/minuutissa, 15°C, 20 h VTi65-roottorissa (Beckman).

DNA sijoitettiin pitkäaaltoisen UV-lampun alle, ja poistettiin puhkaisemalla putki ruiskulla. EtBr uutettiin isopropanolilla ja liuosta dialysoitiin kaksi tuntia TEE:tä (0,01 M Tris·HCl, pH = 8,0, 0,01 M EDTA) vastaan. Liuosta säädettiin sitten 8 ml:aan TEE:llä ja uutettiin kahdesti fenolilla ja kerran kloroformilla. DNA saostettiin 0,1 M NaCl:lla ja kylmällä etanolilla ja liuotettiin 1 ml TE:hen (0,01 M Tris·HCl, pH = 8,0, 0,001 M EDTA). Kromosomi-DNA-liuos pidettiin 4°C:ssa.

Esimerkki 1

Plasmidin pDN1050 valmistaminen (kuvio 1)

Plasmidi pBD64 valmistettiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja SphI, ja 3,6 kb:n pala sidottiin E. coli-plasmidin pBR322 0,56 kb EcoRI-SphI-palalla. Saatu 4,2 kb:n plasmidi pDN691 antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille ja kanamysiinille. pDN691:n 0,4 kb Hind3-BamHI-pala korvattiin E. coli-plasmidin pUC9 0,02 kb Hind3-BamHI-palalla. Saatu plasmidi pDN720, 3,8 kb, antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille ja kanamysiinille.

pDN720:n 2,8 kb NcoI-NcoI-pala korvattiin pDN770:n 1,8 kb NcoI-NcoI-palalla. 3,6 kb pDN770 oli pBD64:n spontaani poisto ja antaa klooriamfenikolille vastustuskyvyn. Saatu 2,8 kb:n plasmidi pDN820 antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille. pDN820 avattiin yk

sinkertaisella HgiAl-osalla ja eristettiin Bal31:lla 30 sekunnin ajaksi 30°C:ssa, jonka avulla 0,1 kb:n pala siirrettiin. Saadut lineaariset palat sidottiin Bgl2-oligonukleotodiliittäjällä New England Nuclearista (n:o 1001). 2,7 kb:n plasmidi sisältää yhden Bgl2-liittäjän ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille, joka eristettiin tästä sidosseoksesta.

Esimerkki 2

Plasmidin pDN1122 valmistaminen (kuviot 2)

7,6 kb:n plasmidi pDN452 antaen vastustuskykyä klooriamfenikolille ja kanamysiinille ja suojellen *Bacillus* V599:n maltogeenisen amylaasin rakenteellista geeniä amyM eristettiin Aval'illa, käsiteltiin eksonukleasilla Bal31, sidottiin EcoRI-oligonukleotidiliittäjällä (Biolabs n:o 1004), eristettiin EcoRI:llä, sidottiin T4-sitojalla ja transformoitiin *B. subtilis* DN497:amyE valiten Cam^R. Yksi Amy⁺-transformantti sisälsi 6,6 kb plasmidin p520-20. p520-20:n amylaasisaanto ei ollut vähäisempi kuin pDN452:n saanto.

2,7 kb NcoI-pala p520-20:sta korvattiin sitten 1,7 kb NcoI-NcoI-palalla pDN770:stä (valmistettu esimerkissä 1). Saatu 5,6 kb plasmidi pDN808 suojelee amyM:ia ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille.

pDN808:n 2,6 kb EcoRI-SphI-pala korvattiin pDN1050:n 2,4 EcoRI-SphI-palalla (valmistettu esimerkissä 1). Saatu 5,4 kb plasmidi pDN1122 suojelee amyM:ia ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille.

Esimerkki 3

dal-geenin kloonaukset

Noin 3 µg kromosomi-DNA:ta *B. subtilis*-kannasta DN497 ja 1 µg plasmidia pDN691 Cam^R Kan^R eristettiin täydellisesti restriktioentsyymeillä BamHI ja SphI. Kromosomi- ja plasmidi-DNA sekoitettiin ja sidottiin T4-sitojalla ja transformoitiin kantaan DN606:dal⁻ pUB110:Kan^R. Noin 200 Dal⁺-transformanttien joukosta yhdestä oli samanaikaisesti tullut Cam^R kuin vihjeenä siitä,

että Dal^+ -fenotyyppi sidottiin rekombinanttiplasmidiin, joka oli johdettu pDN691:sta. Plasmidit valmistettiin tästä Dal^+ Cam^R -transformantista ja siirrettiin kantaan DN773 $dal^- recE^-$ valikoiden Dal^+ . Dal^+ -transformantit tulivat samanaikaisesti Cam^R :ksi ja Kan^R :ksi. Transformantit sisälsivät vain hyvin pieniä määriä plasmidia, noin 16 kb.

Tästä plasmidista 2,0 kb $Clal$ - $SphI$ -pala antaen Dal^+ -fenotyyppin kloonattiin $Clal$ - ja $SphI$ -osiin kannan DN608 plasmidissa pDN820: dal^- antaa rekombinanttiplasmidin, 4,6 kb pDN1000.

Restriktioentsyymipaikkojen kartta pDN1000:lla on esitetty kuviossa 3. Transformoitu kanta DN1000=DN608 pDN1000 talletettiin National Collection of Industrial Bacteria (Teollisten Bakteereiden Kansalliseen Kokoelmaan) (NCIB), Torry Research Station, Aberdeen, Skotlanti, 7. joulukuuta 1984 ja annettiin referenssinumero NCIB 12029. NCIB, joka on kansainvälinen säilytyspaikka, joka valtuutettiin Budapestin sopimuksessa 1977, sallii talletuksen esittämisen ja yleisen käsiteltävyyden sinne edellä mainitun sopimuksen sääntöjen 9 ja 11 mukaisesti, kummankin erikseen.

Seuraavat havainnot varmistivat sen, että kloonattu kromosomi-osa todella sisältyi dal -geeniin (kuten määritettiin dal -1-mutaatiolla), ja mikään muu geeni ei pysty estämään D-alaniinin tarvetta:

1: Linearisoitunut (ei-kopioituva) plasmidi transformoi dal^- -vastaanottajan Dal^+ :ksi, mutta ei Cam^R :ksi merkkinä homologi-sesta rekombinaatiosta kromosomin dal -geenin ja kloonatun kromosomiosan kanssa.

2: Noin 0,2 % isäntäbakteerista, jolla on dal -1 kromosomissaan, valmistetuista plasmideista oli dal^- (kuitenkin restriktio-entsyymin rakenne on erottumaton alkuperäisestä dal^+ -plasmidista). Nämä dal^- -plasmidit eivät voi täydentää kromosomaalista dal -1-mutaatiota merkkinä siitä, että kromosomimutaatio olisi siirtynyt dal^- -plasmideihin homologisella rekombinaatiolla.

3: Kromosomi-B. subtilis-DNA:n Southern blotting-analyysillä osoitettiin, että kromosomin Clal-SphI-pala risteytyi samaa kokoa olevan osan kanssa pDN1000:sta. Täten dal-geenin suurempia uudelleen järjestelyitä ei voinut esiintyä ennen sen kloonausta pDN1000:lla.

Esimerkki 4

Plasmidin pDN1130 valmistaminen (kuviot 3 ja 4)

pDN1000 (esimerkistä 3) suojellen dal⁺-geeniä avattiin Clal-osalla, eksonukleaasi eristettiin Bal31:lla ja sidottiin BamHI-oligonukletidisitojalla (n:o 1017 Biolabs'ilta). Saatu plasmidi pDN1090 suojelee dal⁺-geeniä ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille.

pDN1122 (esimerkistä 2) leikattiin SphI:llä ja Bgl2:lla, ja 4,4 kb:n osa sidottiin 2,0 kb pDN1090:n SphI-BamHI-palalla.

Saatu plasmidi pDN1130 suojelee amyM⁺:aa ja dal⁺-geeniä, mutta ei anna vastustuskykyä klooriamfenikolille.

Esimerkki 5

Plasmidin pDN1290 valmistaminen (kuviot 3 ja 4)

Plasmidin pDN1110 dal⁺ Cam^R, 4,5 kb, valmistettiin eksonukleaasilla Bal31 eristeellä, joka oli eristetty pDN1000:sta SphI:llä, ja liittämällä sekä Bgl2- ja sacI-oligonukleotidiliittäjällä (n:o 1001 ja n:o 1005 Biolabs'ilta, kumpikin erikseen).

pDN1110 avattiin yksinkertaisella EcoR5-osalla, eksonukleaasi eristettiin Bal31:llä ja sidottiin kahdella Bgl2-oligonukleotidiliittäjällä (n:o 1001 Biolabs'ilta). Liittäjän yhteensulaminen yhden plasmidin päätteen kanssa sai aikaan BclI-osan. Saatu plasmidi pDN1222 suojelee dal⁺-geeniä, ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille.

0,7 kb pDN1222:n BclI-BclI-pala sidottiin 3,5 kb BamHI-BclI-palan pDN1090:stä kanssa (esimerkissä 4). Saatu plasmidi pDN1277, 4,2 kb, suojelee dal⁺-geeniä ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille. Plasmidi pDN1277 siirrettiin kantaan DN1280

(katso esimerkki 6) ja saatu kanta DN1517 (=DN1280 pDN1277) tallennettiin National Collection of Industrial Bacterian koelmaan, Torry Research Station, Aberdeen, Skotlanti, 7. joulukuuta 1984 ja annettiin referenssinumero NCIB 12030.

pDN1090 edelleen siirrettiin 4,5 kb plasmidiin pDN1120 dal^+ Cam^R korvaamalla 2,6 kb SphI-BamHI-pala 2,5 kb SphI-BamHI-palalla pDN1050:stä (valmistettiin kuten kuvattiin esimerkissä 1).

pDN1265 amyM^+ Cam^R valmistettiin pDN1120:lta eristetyltä Bal31-eksonukleaasilla eristetty EcoR5:llä ja edelleen eristettiin SphI:llä. 2,9 kb:n pala sidottiin SacI-oligonukleotidiliittäjällä (Biolabs n:o 1005) ja 2,9 kb:n pDN1130-palan kanssa, joka oli saatu eristämällä EcoRI:llä ja Bal31-eksonukleaasikäsitteyllä, ja edelleen eristämällä SphI:llä.

Saatu plasmidi pDN1265, 5,8 kb, suojelee amyM^+ -geeniä ja antaa vastustuskyvyn klooriamfenikolille.

Sitten pDN1265 katkaistiin SphI-Bgl2:lla ja 4,7 kb-pala sidottiin 1,6 kb pDN1277:n SphI-Bgl2-palan kanssa.

Noin 6,3 kb saatu plasmidi pDN1290 suojelee amyM^+ :ia ja dal^+ -geeniä, mutta ei antibiootin vastustuskyvyn merkitsijää.

Esimerkki 6

Isännän, jolla on vajausta dal-geenissä, valmistaminen (kuvio 5)

Katkaisemalla 5 g kloonatun dal^+ -geenin pDN1090:stä restriktioentsyymeillä EcoRI ja EcoR5, ja edelleen eristämällä palat eksonukleaasilla Bal31 60 sekunniksi yhdistäen ja siirtäen

DN608:dal-1:aan, saatiin aikaan vajausta, joka tuhosi plasmidin Dal^+ -fenotyyppin. Kannan DN497 transformaatio yhden näiden vajaitten plasmidien pDN1274 Cam^R dal^- , ja Cam^R :n valinta antoi noin 0,1 % transformanteista, jotka olivat ilmeisesti Dal^- johdun kromosomin dal^+ -geenin korvaamisesta dal^- -vajauksella

pDN1274:stä. Spontaanisti tapahtuneen menetyksen pDN1274 jälkeen, transformantista tuli Cam^R , mutta säilyi Dal^- . Tämän kannan, DN1280, kromosomi-DNA:n Southern blotting-analyysit osoittivat,

että se todellakin suojelee oletettua dal-vajetta. Mutaatioiden esiintymistiheys, mikä saattaisi aiheuttaa tämän dal-vajemutan-
tin palautumisen DAL⁺-fenotyyppiksi, oli vähemmän kuin 10⁻⁸.
DN1280 suojeleva plasmidi pDN1277 = DN1517 (katso esimerkki 5)
tallennettiin.

Esimerkki 7

dal⁺ amyM⁺-plasmidien stabiilisuus dal⁻-isännässä

Jotta osoitettaisiin sekä isäntä-plasmidi-yhdisteen DN1300(= DN1280 pDN1290) stabiilisuus että ristiinmenevän kromosomin puut-
tuminen ja kromosomin vajetta sivuavien plasmidi-DNA-osien tär-
keys, seuraava koe suoritettiin:

Kantojen DN1297(=DN1280 pDN1130) ja DN1300(=DN1280 pDN1290)
yksittäiset pesäkkeet suspendoitiin uudelleen L-lihaliemeen li-
sättynä 10 mM kaliumfosfaattipuskuria pH 7,0 ja 0,2 % glukoosia.
Puolet jokaisesta suspensiosta ympättiin edellä esitettyyn
elatusaineeseen, ja toinen puoli täysin samaan elatusaineeseen,
johon oli lisätty 200 µg/ml D-alaniinia. Liuottamalla viljel-
mät joko 100- tai 1000-kertaisesti, kantoja kasvatettiin useiden
sukupolvien ajan 37°C:ssa hyvällä ilmastuksella joko D-alaniinin
läsnäollessa tai puuttuessa elatusaineesta. Jokaisessa laimen-
nuksessa, ei vähemmän kuin 10⁷ soluja siirrettiin. Yhden päivän
välein, Amy⁺-pesäkkeiden esiintymistiheys (kokonaisuudessaan
noin 100) testattiin L-lihaliemimaljoilla joko D-alaniinin kans-
sa tai ilman riippuen kasvuolosuhteista. Tulokset on esitetty
taulukossa 1. 10 satunnaisesti valittua Amy⁻-pesäkettä eivät
osoittaneet sisältävänsä yhtään plasmidia.

Taulukko 1

Amy⁻-solujen esiintymistiheys kasvun jälkeen LB-elatusaineessa
joko D-alaniinin kanssa tai ilman.

Kannat	plasmidi	sukupolvet		
		51	68 % Amy ⁻	85
DN1297	pDN1130	2 %	20 %	-
DN1297 + D-ala ¹	pDN1130	60 %	-	-
DN1300	pDN1290	0 %	0 %	0 %
DN1300 + D-ala ¹	pDN1290	60 %	90 %	-

¹ Ensimmäiset 20 sukupolvea ilman D-alaniinia

Tulokset taulukossa 1 osoittavat, että plasmidi pDN1290 on hyvin pysymätön valikoimattomissa olosuhteissa (D-alaniinin li-säys kasvualustaan), mutta muuttuu pysyväksi kasvun aikana selektiivisessä elatusaineessa (ilman D-alaniinin lisäystä). Edelleen osoitettiin, että homologinen, kaksinkertainen ris-teytys palauttaa dal^+ -geenin isäntäkromosomiin ja edelleen plas-midin häviämistä ei tapahtunut DN1300:ssa (ei Amy^- -soluja 85 sukupolven kasvatuksen jälkeen), kun taas Amy^- -solujen esiinty-mistiheys oli 20 %, DN1297:n 68 sukupolven jälkeen kasvaneena D-alaniinia sisältämättömässä elatusaineessa, ilmeisesti joh-tuen dal^+ -geenin siirtymisestä plasmidista kromosomiin ja edel-leen plasmidin menetyksestä.

Esimerkki 8

Plasmidin pDN1800 valmistaminen (kuvio 6)

pDN1284 valmistettiin yhdistämällä 1,4 kb Bgl2-Bgl2-pala pDN1222:sta (katso kuvio 3) 1,5 kb BamHI-Bgl2-palan pDN1050:stä kanssa (katso kuviota 3).

pDN1284:stä dal^+ -geeni siirrettiin 1,4 kb Bgl2-Sall-palalla klas-siseen E. colin plasmidivektoriin pBR322, joka on katkaistu BamHI:llä ja Sall:llä. Rekombinanttiplasmidi, pDN1800: Amp^R (ampisilliiniresistantti) siirrettiin E. coli-kantaan TKL10 valiten Amp^R saamaan kannan DN1800:pDN1800. Kanta DN1800 tal-lennettiin NCIB:ssä 22. marraskuuta 1985 ja annettiin referens-sinumero NCIB 12181. Sen mukaisesti talletteen esittäminen ja yleinen luoksepäästävyys sinne on varmistettu (vide supra). TKL10 osoittaa D-alaniinia vaativan fenotyypin $42^{\circ}C$:ssa, mutta DN1800:ssa tämä vaatimus on hävinnyt. Siten, pDN1800 suojellen B. subtiliksen dal -geeniä pystyy täydentämään D-alaniinivaati-muksen E. coli-kannassa, joka on puutteellinen alaniinin rase-maattiaktiivisuudessa (Wild et al., Molec. Gen. Genet. 198: 315-22, 1985).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä plasmidien stabiloimiseksi isäntäbakteerissa viljelyn aikana, tunnettu siitä, että plasmidiin viedään DNA-jakso, joka koodaa D,L-alaniinirasemaattia, ja transformoidaan isäntäbakteeri plasmidilla, joka sisältää mainitun DNA-jakson, ja käytetään isäntäbakteeria, jolta puuttuu kromosomaalinen dal-geeni D,L-alaniinirasemaatille.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että isäntäbakteerissa on mutaatio kromosomaalisessa dal-geenissä D,L-alaniinirasemaatille, tai deleetio sisältäen vähintään osan dal-geenistä.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mutaatio on deleetio, joka poistaa sekä osan dal-geenistä, joka on välttämätön Dal⁺-fenotyypin ilmaisulle, sekä osan suoraan sivuavaa DNA:ta, joka ei ole välttämätön DAL⁺-fenotyypin ilmaisulle, oli se osa dal-geeniä tai ei.
4. Transformoitu bakteeri, tunnettu siitä, että se on johdettu isäntäbakteerista, jolla on puutteellisuutta kromosomaalisessa dal-geenissä D,L-alaniinirasemaatille, ja että se sisältää plasmidin, joka sisältää DNA-jakson, joka koodaa D,L-alaniinirasemaattia.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen transformoitu bakteeri, tunnettu siitä, että se sisältää mutaation dal-geenissä D,L-alaniinirasemaatille tai deleetion sisältäen vähintään osan dal-geenistä.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen transformoitu bakteeri, tunnettu siitä, että siinä on deleetio sekä osassa dal-geeniä, joka on välttämätön Dal⁺-fenotyypin ilmaisulle, että osassa suoraan sivuavaa DNA:ta, joka ei ole välttämätön Dal⁺-fenotyypin ilmaisulle, oli se osa dal-geeniä tai ei, ja että se sisältää plasmidin, joka sisältää osan dal-geenistä, joka on riittävä Dal⁺-fenotyypin ilmaisulle, mutta joka ei sisällä

segmenttejä, jotka ovat sille DNA:lle homologisia osia, joka sivuaa vähintään toista puolta kromosomin deleetiosta.

7. Menetelmä halutun tuotteen valmistamiseksi transformoidulla bakteerilla, tunnettu siitä, että viljellään sopivalla ravintoalustalla bakteereita, joilla on deleetio kromosomaalisessa dal-geenissä ja jotka sisältävät plasmidin, joka sisältää DNA-jakson, joka koodaa D,L-alaniinirasemaattia, sekä DNA-jakson, joka koodaa mainittua haluttua tuotetta, ja otetaan talteen haluttu tuote viljelyalustalta.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että isäntäbakteerissa on mutaatio dal-geenissä D,L-alaniinirasemaatille tai deleetio, joka käsittää ainakin osan dal-geenistä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että isäntäbakteerissa on deleetio sekä osassa dal-geeniä, joka on välttämätön Dal'-fenotyypin ilmaisulle, että osassa suoraan sivuavaa DNA:ta, joka ei ole välttämätön Dal'-fenotyypin ilmaisulle, oli se osa dal-geeniä tai ei, ja että plasmidi sisältää osan dal-geeniä, joka riittää Dal'-fenotyypin ilmaisulle, mutta ei sisällä segmenttejä, jotka ovat homologisia DNA:lle, joka sivuaa vähintään toista puolta kromosomin deleetiosta.

Patentkrav

1. Förfarande för stabilisering av plasmider i en värd bakterie under odling, kännetecknat av att i plasmiden införs en DNA-sekvens, som kodar för D,L-alaninrasemas, och att värd bakterie transformeras med plasmiden som innehåller nämnda DNA-sekvens, och används en värd bakterie med en defekt i den kromosomala dal-gen för D,L-alaninrasemas.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, kännetecknat av att värd bakterien har en mutation i den kromosomala dal-genen för D,L-alaninrasemas, eller en deletion omfattande i det minsta en del av dal-genen.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** av att mutationen är en deletion av båda en del av dal-genen, som är nödvändig för uttryckelse av Dal'-fenotypen och en del av direkt flankerande DNA, som är onödvändig för otryckning av Dal'-fenotypen, var den en del av dal-genen eller inte.

4. Transformerad bakterie, **kännetecknad** av att den är avlett från en värd bakterie, som har en defekt i den kromosomala dal-genen för D,L-alaninrasemas, och att den innehåller en plasmid som innehåller en DNA-sekvens som kodar för D,L-alaninrasemas.

5. Transformerad bakterie enligt patentkravet 4, **kännetecknad** av att den innehåller en mutation i dal-genen för D,L-alaninrasemas eller en deletion, som omfattar minst en del av dal-genen.

6. Transformerad bakterie enligt patentkravet 5, **kännetecknad** av att den har en deletion av båda en del av dal-genen, som är nödvändig för uttryckning av Dal'-fenotypen, och av en del av direkt flankerande DNA, som är onödvändig för uttryckning av Dal'-fenotypen, var den en del av dal-genen eller inte, och att den innehåller en plasmid innehållande en del av dal-genen, som är tillräckligt till uttryckning av Dal'-fenotypen, men inte innehåller segmenter, som är homologiska till den DNA, som flankerar minst den ena sidan av deletionen på kromosomet.

7. Förfarande för framställning av en önskad produkt i en transformerad bakterie, **kännetecknat** av att bakterier som har en defekt i den kromosomala dal-genen och innehåller en plasmid innehållande en DNA-sekvens, som kodar för D,L-alaninrasemas, samt en DNA-sekvens, som kodar för den önskade produkten, odlas i ett lämpligt näringsmedium, och den önskade produkten utvinns från näringsmediet.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att värd bakterien innehåller en mutation i dal-genen för D,L-

alaninrasemas eller en deletion, som omfattar minst en del av dal-genen.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, kännetecknat av att värd bakterien har en deletion av båda en del av dal-genen, som är nödvändig för uttryckning av Dal⁺-fenotypen, och av en del av direkt flankerande DNA, som är onödvändig för uttryckning av Dal⁺-fenotypen, var den en del av dal-genen eller inte, och att plasmiden innehåller en del av dal-genen som är tillräcklig till uttryckning av Dal⁺-fenotypen, men inte innehåller segmenter, som är homologiska till den DNA, som flankerar minst den ena sidan av deletionen på kromosomet.

Fig.1

85876

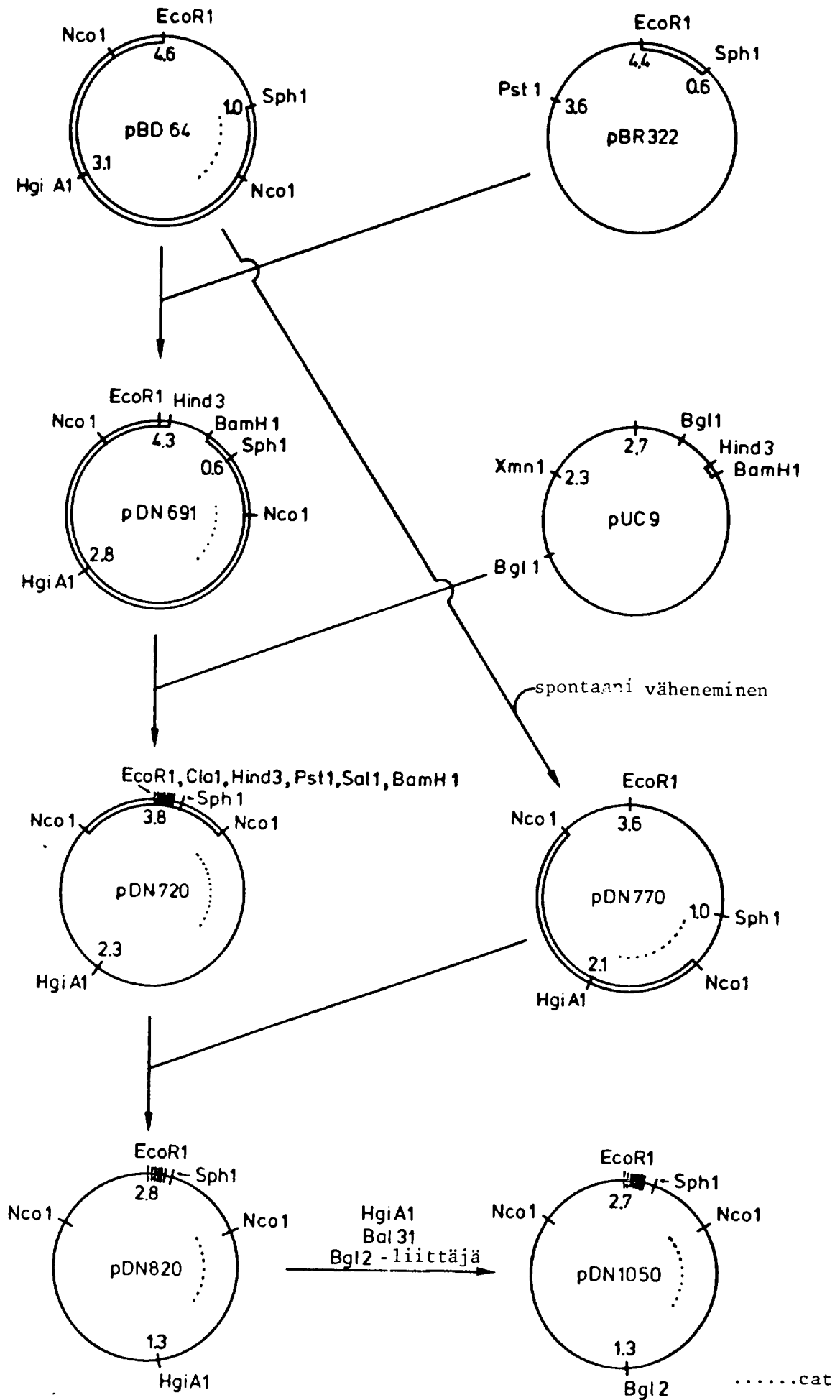
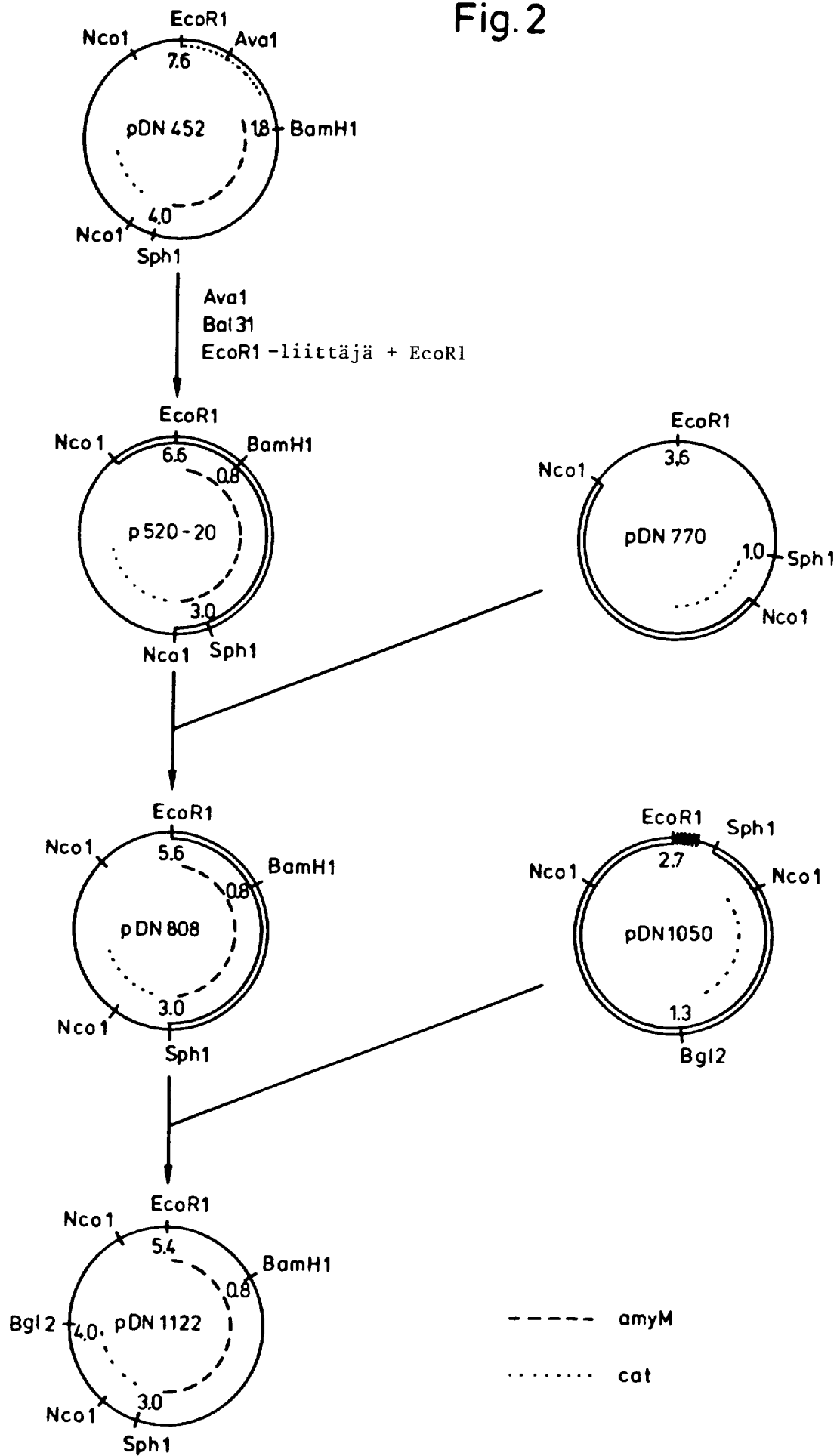
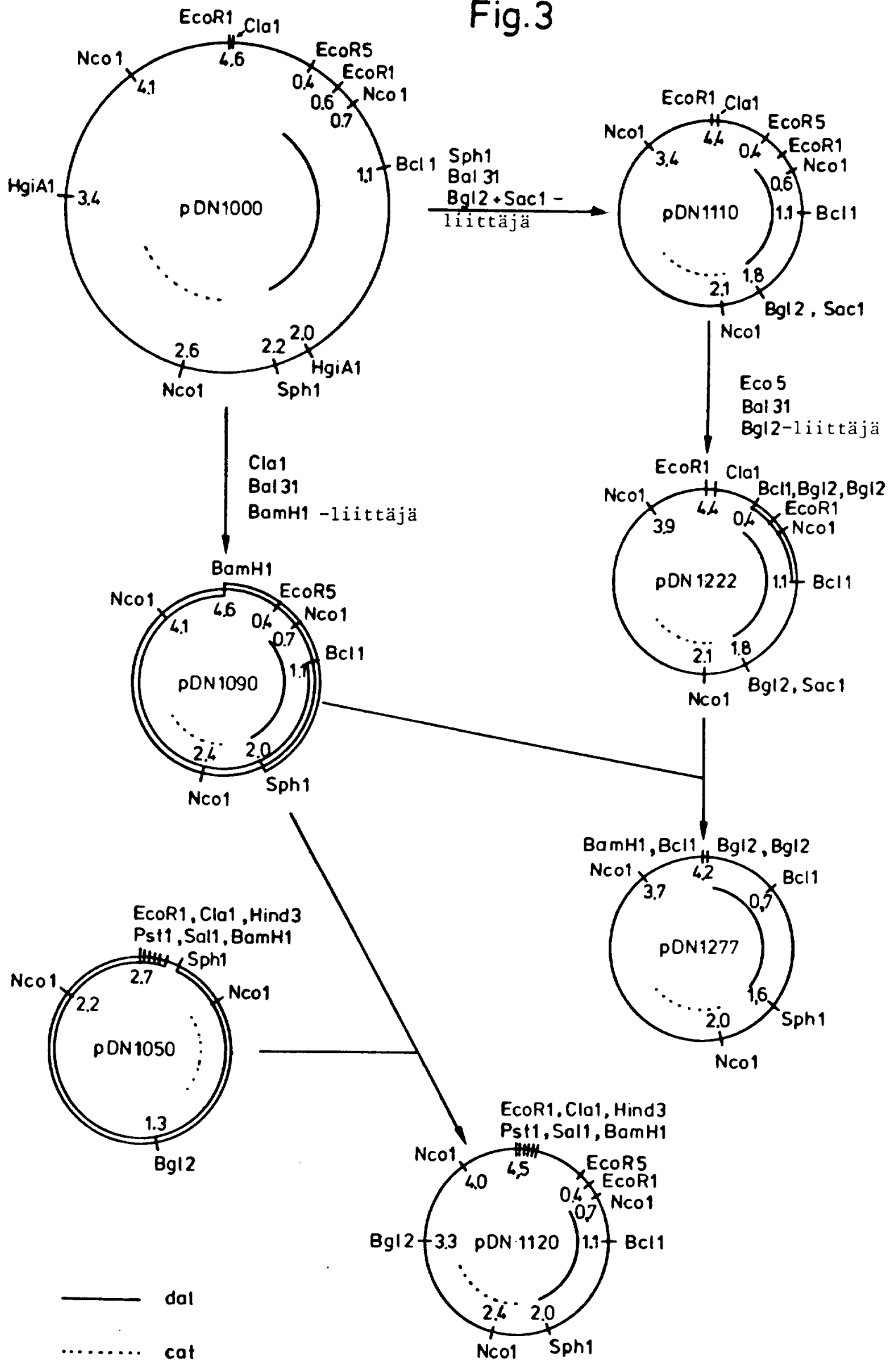


Fig. 2



85876

Fig.3



85876

Fig. 4

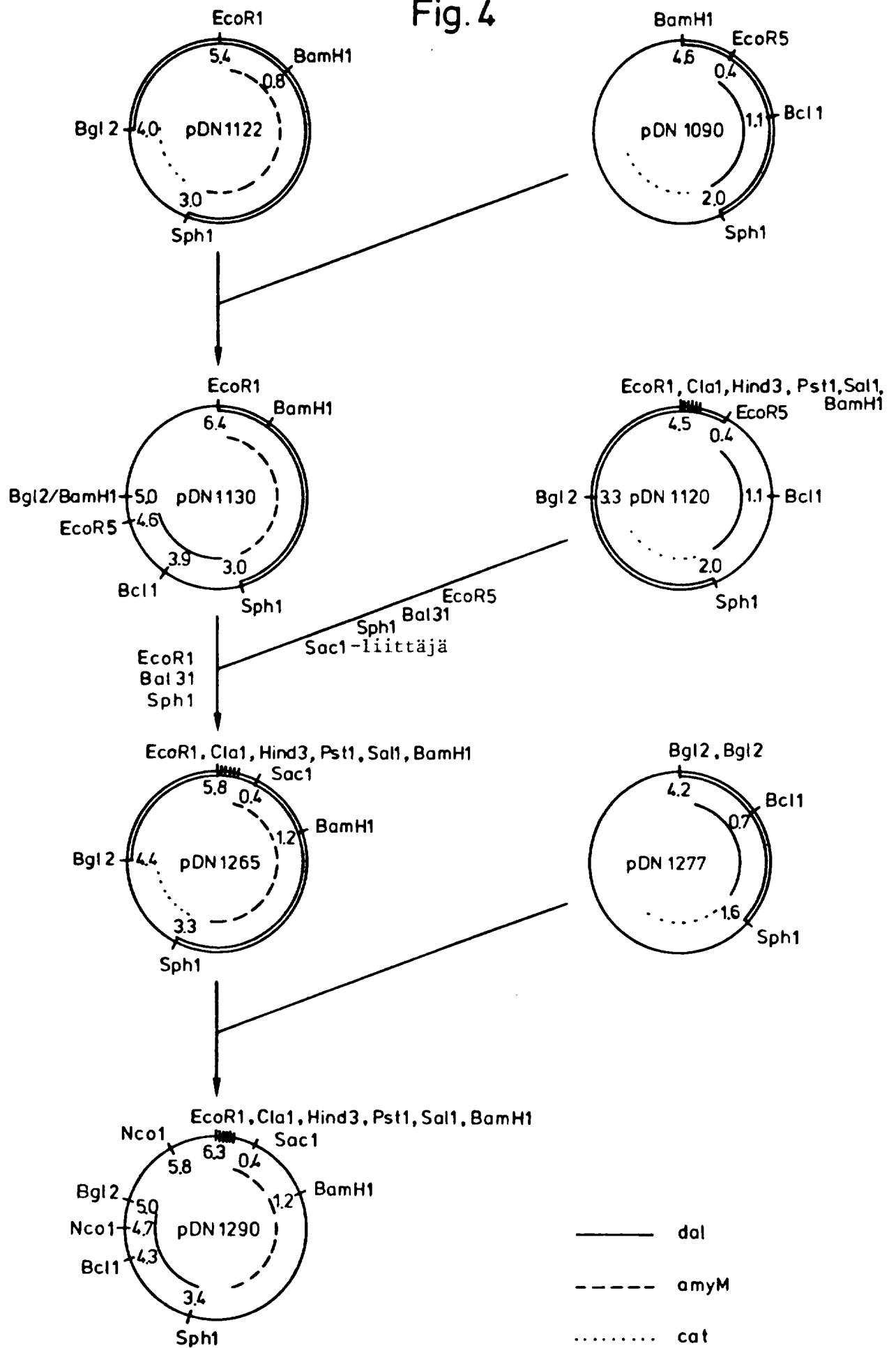


Fig.5

85876

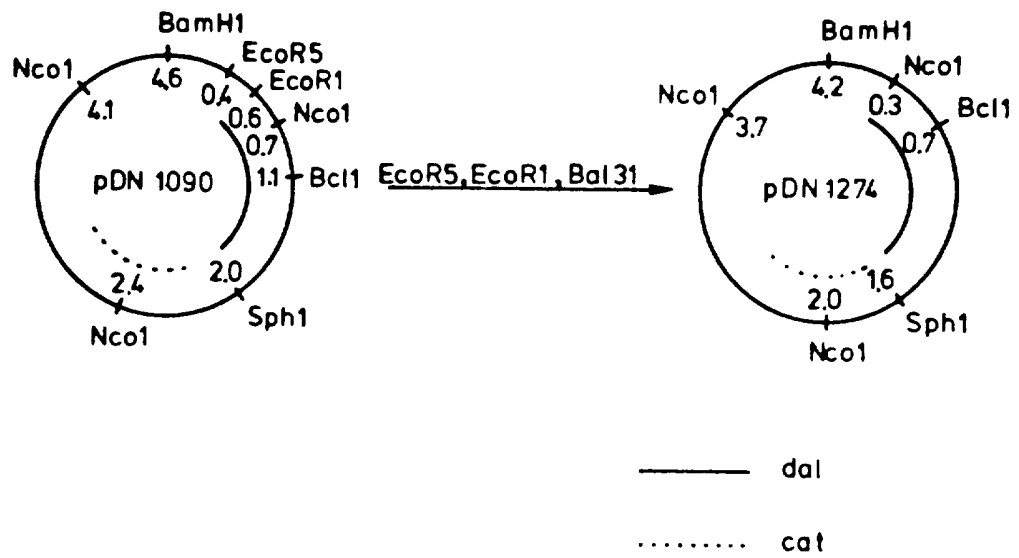


Fig.6

85876

