

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 982070 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **982070**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **24.03.1997**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.09.1998**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.10.1998**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **24.03.1997 PCT/US1997/004982**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

26.03.1996 US 622679

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • University of Hawaii, 2800 Woodlawn Drive, Suite 280 Honolulu, HI 96822, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Stiles, John I., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Moisyadi, Istefo, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Neupane, Kabi Raj, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Puhdistetut proteiinit, yhdistelmä-DNA-sekvenssit ja menetelmät kofeiiniä sisältämättömien juomien valmistamiseksi

Renade proteiner, rekombinanta DNA-sekvenser och förfaranden för framställning av drycker utan koffein

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Keksintö koskee puhdistettuja proteiineja, niiden ilmentymistä koodattavia DNA-sekvenssejä sekä yhdistelmä-DNA-molekyylejä, mukaan lukien mainituilla transformoituja isäntiä, kahvikasvien transformoimiseksi kofeiinin ilmentymisen suppresioimiseksi. DNA-sekvensseille ja yhdistelmä-DNA-molekyyleille on karakteristista, että ne koodittavat kahvikasvin kofeiinisynteesireitin jonkin entsyymin ilmentymistä. Keksintö koskee myös kahvikasveja, jotka on transformoitu DNA-molekyyleillä, jotka koodittavat mRNA:n transkriptiota, joka on antisense mRNA:han nähden, joka koodittaa kofeiinibiosynteesireitin ainakin yhden entsyymin ilmentymistä. Uppfinning avser renade proteiner, DNA-sekvenser, vilka kodar deras förekomst, samt kombinations-DNA-molekyler, vilka inkluderar med dessa transformerade värdar, för transformering av kaffeväxter för att undertrycka förekomsten av koffein. DNA-sekvenserna och kombinations-DNA-molekylerna karakteriseras av, att de kodar något entsyms förekomst i en kofeinbiosyntesrutten hos en kaffeväxt. Uppfinningen avser även kaffeväxter, vilka har transformerats med DNA-molekyler, vilka kodar en transkription av mRNA, vilken utgör en antisense gentemot den mRNA, vilken kodar förekomsten av minst ett ensym i kofeinbiosyntesrutten.

Puhdistetut proteiinit, yhdistelmä-DNA-sekvenssit ja menetelmät kofeiinia sisältämättömien juomien valmistamiseksi

Tämä patenttihakemus koskee puhdistettuja proteiineja, yhdistelmä-DNA-sekvenssejä, niillä transformoituja isäntiä sekä menetelmiä kofeiinia sisältämättömien juomien ja elintarvikkeiden tuottamiseksi. Tarkemmin ottaen tämä patenttihakemus koskee puhdistettuja proteiineja ja yhdistelmä-DNA-sekvenssejä, jotka suppressoivat kofeiinin ilmentymistä kahvikasveissa sekä niiden korjatuissa hedelmissä. Keksinnön avulla saadaan stabiileja kofeiinia sisältämättömiä kahvikasviliinjoja, joiden hedelmistä voidaan paahtamisen ja jauhamisen jälkeen valmistaa kofeiinia sisältämätöntä kahvia. Arvellaan, että keksintöä voidaan käyttää kofeiinisynteesin suppressoimiseksi teessä (Camellia sinensis) ja kolassa (Cola acuminata) sekä sukulaisalkaloidien synteesin suppressoimiseksi suklaassa (Theobroma cacao).

Keksinnön tausta

Kahvia valmistetaan suvun Coffea kasvien paahtetuista ja jauhetuista pavuista, yleensä lajista C. arabica. Kahvikasvit tuottavat kofeiinialkaloideja, jota esiintyy niiden kuivatuissa hedelmissä, kahvipavuissa. Koska monet kahvinjuojat suosivat kofeiinia sisältämätöntä kahvia, on kehitetty lukuisia menetelmiä kofeiinin poistamiseksi kahvipavuista. Kaikki nämä menetelmät johtavat muidenkin aineiden kuin kofeiinin poistumiseen pavuista, millä on kielteinen vaikutus käsitellyistä pavuista keitetyn kahvin makuun. Vaikka joitakin luonnollisesti esiintyviä kofeiinia sisältämättömiä kahveja ja sukulaislajeja (Mascarocoffea spp. ja Coffea bengalensis) tunnetaan, ei niillä ole kaupallista arvoa (Charrier ja Berthaud, "Variation of Caffeine Content in the Coffea Genus", Cafe' Cacao The' 14 (1975) 251 - 264). Näin muodoin kofeiinittomien kahvipapujen tuottamiseksi tarvitaan menetelmä, joka ei johda muiden aineiden kuin kofeiinin poistamiseen pavuista.

Kofeiini on luonnollisesti esiintyvä puriini-alkaloidi, jota tuottavat muun muassa kahvi- ja teekasvit. Kofeiinisynteesin arvellaan suojaavan kasveja hyönteisiltä. Kahvikasvit syntetisoivat kofeiinia xantosiininukleosidista neljässä peräkkäisessä reaktiossa, jotka esitetään kuviossa 1. Katsauksen osalta katso Suzuki, T., Ashihara, H., ja Waller, G.R., Phytochemistry 31 (1992) 2575. Reitillä ensimmäinen vaihe on xantosiininukleosidin metylointi S-adenosyyylimetioniinilla, jota reaktiota katalysoi entsyymi xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi (XMT). Tuote, 7-metyylixantosiini, hydrolysoidaan (riboosi poistuu) 7-me-

tyylixantiiniksi, joka metyloidaan edelleen teobromiiniksi ja kofeiiniksi. Odotusten mukaan tämän synteesireaktiosarjan katkaisu salpaa kofeiinisynteesin.

Täten eräs strategia kofeiinin selektiiviseksi poistamiseksi kahvikasveista on kofeiinin biosynteesireitin spesifisten entsyymien synteesin estäminen. Tämän keksinnön yhdessä suoritusmuodossa suoritetaan kahvikasvien geneettistä muuntelua XMT:n synteesin estämiseksi. Tällä hetkellä edullisena pidetyssä suoritusmuodossa XMT-synteesi suppressoidaan transformoimalla kahvikasvit DNA-sekvenssillä, joka koodittaa sellaisen lähetti-RNA:n (mRNA) transkriptiota, joka on antisense (ei tietoa sisältävä) XMT:n ilmentymistä koodittavaan mRNA:han nähden. Keksintöä voidaan soveltaa yleisesti muidenkin kofeiinia sisältämättömien juomien ja elintarvikkeiden, mukaan lukien teen, kaakaon ja muiden suklaapohjaisten juomien tai ruoka-aineiden tuottamiseksi.

Keksinnön yhteenveto

Julkistetaan puhdistettuja proteiineja, niiden ilmentymistä koodittavia DNA-sekvenssejä ja yhdistelmä-DNA-molekyylejä, mukaan lukien näillä transformoituja isäntiä, kahvikasvien transformoimiseksi kofeiinin ilmentymisen suppressoimiseksi. DNA-sekvensseille ja yhdistelmä-DNA-molekyyleille on karakteristista, että ne koodittavat entsyymin, xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin (XMT), ilmentymistä, joka esiintyy kahvin kofeiinisynteesireitin ensimmäisessä vaiheessa. Käyttöön annetaan tämän DNA:n emäsekvenssi sekä siitä johdettu XMT:n aminohapposekvenssi.

Kahvikasvit transformoidaan DNA-molekyyleillä, jotka koodittavat mRNA-sekvenssin transkriptiota, joka on antisense mRNA:han nähden, joka koodittaa kofeiinibiosynteesireitin ainakin yhden entsyymin ilmentymistä. Antisense-RNA sitoutuu XMT-mRNA:han inaktivoiden siten kofeiinisynteesireitin ensimmäisessä vaiheessa esiintyvän koodittavan mRNA:n. Tuloksena tästä transformoidut kasvit eivät kykene syntetisoimaan kofeiinia, vaikka niiden metabolia on muutoin ennallaan.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 esitetään kaaviopiirros kofeiinisynteesireitistä Coffea arabicassa.

Kuvio 2 on valokuva puhdistetun xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin hopealla värjätystä SDS-PAGE-geelistä.

Kuviossa 3 on densitometrinen kromatogrammi, joka esittää puhdistetusta xantosiini- N^7 -metyylitransferaasista trypsiinillä pilkkomalla saatuja ja HPLC:llä erotettuja fragmentteja.

Kuviossa 4 esitetään oligonukleotidialukkeet, joita käytettiin xantosiini- N^7 -metyylitransferaasia koodittavan cDNA-kirjasto-cDNA:n seulontaan.

Kuviossa 5 esitetään xantosiini- N^7 -metyylitransferaasia koodittavan cDNA:n emässekvenssi.

Kuviossa 6 esitetään xantosiini- N^7 -metyylitransferaasille päätelty aminohapposekvenssi.

10 Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Seuraava yksityiskohtainen kuvaus esitetään tässä kuvatun keksinnön tekemiseksi ymmärrettävämmäksi, ja kuvauksessa käytetään seuraavia ilmauksia:

Nukleotidi: Monomeerinen DNA- tai RNA-yksikkö, joka koostuu sokeriosasta (pentoosi), fosfaatista ja typpipitoisesta heterosyklisestä emäksestä. Emäs on sidottu sokeriosaan glykosidihiilen (pentoosin hiili 1') välityksellä, ja emäksen ja sokerin tätä yhdistelmää kutsutaan nukleosidiksi. Emäs karakterisoi nukleotidin. Kyseeseen tulevat neljä DNA-emästä ovat adeniini ("A"), guaniini ("G"), sytosiini ("C") ja tymiini ("T"). Kyseeseen tulevat neljä RNA-emästä ovat A, G, C ja urasiili ("U").

DNA-sekvenssi: Lineaarinen sarja nukleotidejä, joita yhdistävät toisiinsa vierekkäisten pentoosien 3'- ja 5'-hiilten väliset fosfodiesterisidokset.

Kodoni: Kolmen nukleotidin muodostama DNA-sekvenssi (tripletti), joka koodittaa mRNA:n välityksellä aminohappoa, translaation aloitussignaalia tai translaation päättävää signaalia. Esimerkiksi nukleotiditripletit TTA, TTG, CTT, CTC, CTA ja CTG koodittavat aminohappoa leusiini ("Leu"), TAG, TAA ja TGA ovat translaation stop-signaaleja ja ATG on translaation aloitussignaali, joka koodittaa myös aminohappoa metioniini ("MET").

Polypeptidi: Lineaarinen sarja aminohappoja, joita yhdistävät toisiinsa vierekkäisten aminohappojen amino- ja karboksiryhmien väliset peptidisidokset.

Genomi: Solun tai viruksen koko DNA. Se sisältää muun muassa aineen polypeptidejä koodittavan rakennegeenin sekä promoottorikohdan, transkription ja translaation aloitus- ja päätöskohdat.

Geeni: DNA-sekvenssi, joka koodittaa templaatti- tai lähetti-RNA:nsa ("mRNA") välityksellä spesifiselle polypeptidille karakteristista aminohapposekvenssiä.

Transkriptio: Prosessi, jossa geenistä tai DNA-sekvenssistä muodostuu mRNA:ta.

Translaatio: Prosessi, jossa mRNA:sta muodostuu polypeptidi.

Ilmentyminen: Prosessi, jonka tuloksena geenistä tai DNA-sekvenssistä muodostuu polypeptidi. Se on transkription ja translaation summa.

Plasmidi: Kaksisäikeinen ei-kromosomi-DNA-sekvenssi, joka käsittää koskemattoman "replikonin", jolloin plasmidi voi replikoitua (monistua) isäntäsolussa. Kun plasmidi sijoitetaan yksisoluiseen organismiin, plasmidin DNA voi johtaa organismin ominaisuuksien muutokseen tai transformaatioon. Esimerkiksi tetrasykliiniresistenssigeenin (TETR) käsittävä plasmidi transformoi aiemmin tetrasykliinille herkän solun soluksi, joka on tetrasykliiniresistentti.

Plasmidilla transformoitua solua kutsutaan "transformantiksi".

Faagi tai bakteriofagi: Bakteerivirus; monet näistä koostuvat proteiini-kuoreen suljetuista (kapsidoiduista, "kapsidi") DNA-sekvensseistä.

Kloonauksen kuljetin: Plasmidi, faagi-DNA, kosmidi tai muu DNA-sekvenssi, joka pystyy replikoitumaan isäntäsolussa ja jota karakterisoi yksi tai useampi endonukleasitunnistuskohde, josta tällainen DNA-sekvenssi voidaan leikata ennalta määrätyllä tavalla ilman DNA:n tästä seuraavaa oleellisen biologisen funktion menetystä, esim. replikaation, kuoriproteiinien tuotannon tai promoottori- tai sitoutumiskohtien menetystä, ja joka sisältää transformoitujen solujen identifiointiin käytettäväksi sopivan merkin, joka on esimerkiksi tetrasykliini- tai ampicilliiniresistenssi(geeni). Kloonauksen kuljetinta kutsutaan usein vektoriksi.

Kloonaaminen: Prosessi, jossa saadaan organismien tai DNA-sekvenssien populaatio yhdestä tällaisesta organismista tai sekvenssistä asexuaalisella reproduktiolla.

Yhdistelmä-DNA-molekyyli tai hybridi-DNA: Molekyyli, joka koostuu eri genomeista peräisin olevista DNA-segmenteistä, jotka on liitetty päittäin toisiinsa elävien solujen ulkopuolella ja joita voidaan ylläpitää elävissä soluissa.

cDNA: DNA-säie, joka on komplementaarinen mRNA:han nähden, joka koodittaa jotain nimenomaista polypeptidiä.

Vaikka strategiaa kofeiinittoman kahvin tuottamiseksi voidaan soveltaa yleisesti kofeiinisynteesireitin muihin entsyymeihin kahvi- ja muissa kofeiinia tuottavissa kasveissa, tämän keksinnön tällä hetkellä edullisena pidetyssä suoritusmuodossa suppressoidaan reitin ensimmäisen yksittäisen entsyymin, xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin (XMT), ilmentyminen. Vaikka XMT:n rooli kofeiinisynteesissä on selvitetty radioleimaamalla prekursoreita, tähän mennessä entsyymiä ei ole puhdistettu eikä sen aminohapposekvenssiä ole määritetty. Tämä keksintö kattaa tämän vuoksi oleellisesti puhdistetun XMT:n. Keksintö kattaa edelleen puhdistetusta XMT:stä trypsiinillä pilkkomalla eristettyjen fragmenttien aminohapposekvenssin.

Puhdistetuista entsyyminäytteistä saatuihin aminohapposekvenssin osiin perustuvia cDNA-koettimia syntetisoitiin ja osa geenistä monistettiin PCR:n avulla. PCR-tuotteilla seulottiin nuorista lehdistä saadusta mRNA:sta syntetisoitu cDNA-kirjasto XMT:tä koodittavien transkriptien identifioimiseksi. Positiiviset transkriptit sekventoitiin, jolloin saatiin noin 90 % XMT:tä koodittavasta geenistä.

XMT:n ilmentymistä koodittava DNA vietiin pBI-121-transformointivektoriin, joka sisälsi kanamysiiniresistenssigeenin. Vektorin onnistunutta inkorporaatiota kasvisoluihin monitoroitiin tarkkailemalla antibioottiresistenssin ilmentymistä. Saaduilla rakenteilla transformoitiin kahvikasvin somaattisia alkioita kudosiseläimessä. Transformoiduista alkioista kasvatettiin sitten uusia kahvikasveja, jotka eivät tuottaneet kofeiinia. Näiden uusien kasvien paahdetuista ja jauhetuista hedelmistä valmistettiin luonnollisesti kofeiinia sisältämättä kahvia.

Spesifisemmin tuore lehtikudos *C. arabican* nuorista lehdistä jauhettiin hienoksi ja siitä uutettiin proteiini. Uutteet puhdistettiin pylväsajossa ja entsyymiaktiivisuus määritettiin monitoroimalla xantosiinin metylaatiota C¹⁴-leimattua S-adenosyyylimetioniinia substraattina käyttäen. Reaktiotuote varmistettiin 7-metyylixantosiiniksi vertaamalla leimatun reaktiotuotteen migraatiota 3-metyylixantiinin, 7-metyylixantiinin, 8-metyylixantiinin, 7-metyylixantosiinin, xantiinin ja xantosiinin migraatioon kussakin neljästä eri kromatografiasysteemistä.

Proteiini-isolaattien puhtaus määritettiin käyttäen SDS-PAGE-elektroforeesia ja kaksisuuntaista geelielektroforeesia. Yksisuuntaisten SDS-PAGE-geelien hopeavärjäys osoitti dubletin läsnäolon, jolla oli XMT:n entsyymaattinen aktiivisuus ja jonka molekyylipaino oli 36 - 37 kilodaltonia (kD), ku-

ten esitetään kuviossa 2. Kukin proteiini erotettiin edelleen isoelektrisen foku-
soinnin avulla. Tulostiedot osoittivat XMT:n isotsyymien läsnäolon, jolloin iso-
tsyymit saattavat olla seurausta proteiinin translaation jälkeisestä modifikaai-
tiosta; vaihtoehtoisesti kyseessä on mahdollisesti XMT-entsyymejä kooditta-
vien geenien ryhmä.

Proteiinisekventoinnissa käytettiin SDS-PAGE-geeissä visualisoi-
tua dublettia. Puhdistettu XMT pilkottiin osittain trypsiinillä fragmenttien saami-
seksi jatkoanalyysiin; HPLC:llä saatiin erotetuksi kolme piikkiä. Sekventoinnin
suorittanut laboratorio oli the Protein Structure Laboratory, the University of
California, Davis; automatisoidussa pilkkomisessa käytettiin Edman-menetel-
mää (Edman, P., ja Begg, G., Eur. J. Biochem. 1 80). Erotetuksi saatiin kaksi
yksittäistä sekvenssiä, joista rakennettiin alukkeet koetinsynteesiin. Kahvikas-
vin lehdistä uutettiin RNA, josta puhdistettiin poly(A⁺)-sekvenssejä sisältävä
mRNA. Poly(A⁺)-mRNA:sta valmistettiin cDNA-kirjasto käänteiskopiojaentsyy-
min avulla. DNA-polymeraasi-I:tä käyttäen valmistettiin kaksisäikeinen DNA,
joka otettiin talteen saostamalla. cDNA fraktioitiin ja insertoitiin faagiin monis-
tamista varten. cDNA-kirjasto seulottiin PCR:llä syntetisoidulla koettimella, joka
oli valmistettu käyttäen alukkeita, jotka perustuivat puhdistetun XMT:n amino-
happosekvenssistä oletetulle DNA-sekvenssille. Identifioitiin kaikki XMT:tä
koodittavat sekvenssit sisältävää cDNA:ta tuottava klooni.

XMT:tä koodittavaa geeniä vastaavalla cDNA:lla transformoitiin kah-
vikasvin alkioita, jolloin transformoivana vektorina käytettiin plasmidia pBI-121.
XMT:n ilmentymistä koodittavaa DNA:ta vastaavat sekvenssit insertoitiin
plasmidiin käänteisessä suuntauksessa kukkakaalimosaiikkivirus-35S-pro-
moottorin viereen. Näistä transkriptiolla tuotettu RNA on komplementaarinen
XMT:n aminohapposekvenssiä koodittavaan mRNA:han nähden. Täydelliset
rakenteet monistetaan bakteeri-isännissä. Isäntäsolut rikotaan ja monistettu
vektori kiinnitetään kolloidisiin kultahiukkasiin. Kultahiukkaset kiinnittyneine
vektoreineen insertoidaan kahvikasviprotoplasteihin suuntaamalla hiukka-
set suurella nopeudella soluihin, kuten kuvataan US-patenttijulkaisussa
5 107 065. Onnistuneesti transformoidut nuoret kasvit identifioidaan antibiootti-
resistenssin perusteella. Transformoidut kasvit eivät tuota kofeiinia.

Esimerkkejä

A. Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin puhdistaminen Guatemalan C. arabica L. cv -kahvikasvin lehdistä

Nuoria, alle 5 mm:n pituisia lehtiä (vastaa B3-vaihetta; Frischknecht, P.M., Ulmer-Dufek, J., ja Baumann, T.W., Phytochemistry 25 613) kerättiin tutkimusasemalla the University of Hawaii Waimanalo Research Station, Oahu, Hawaiji, kasvatetuista pensaista. Lehdet upotettiin välittömästi nestetyyppeen (nestemäinen N₂) ja varastoitettiin -70 °C:ssa käyttöön asti. Kaikki sitten suoritettut menettelyt tehtiin 4 °C:ssa ellei toisin ole mainittu. Lehtikudos (150 g) jauhettiin hienoksi käyttäen huhmarettia ja survinta nestemäisessä N₂:ssa, minkä jälkeen se siirrettiin edelleen jäisenä ennalta jäähdytettyyn kotikäyttökahvimyllyyn, jossa sitä jauhettiin pienen palan kanssa kuivajäätä noin 30 sekunnin ajan. Jauhettu kudos vietiin astiaan, joka sisälsi 1,5 l jääkylmää 80-%:ista asetonia, 5 mM tiourea ja 12,5 mM β-merkaptotoetanoli. Sekoitettiin magneettisekoittajan avulla 45 minuutin ajan, minkä jälkeen kudos otettiin talteen tyhjäsuodattamalla Whatman nro 1 -suodatinpaperin käsittävässä Büchner-suppilossa. Kudos pestiin 2,5 l:lla jääkylmää 80-%:ista asetonia, joka sisälsi tioureaa ja β-merkaptotoetanolia kuten edellä, ja sitä kuivattiin ilmassa 20 minuutin ajan, minkä jälkeen sitä kylmäkuivattiin 48 tunnin ajan.

Saatu asetonijauhe homogenisoitiin sekoittajassa 400 ml:n uuttopuskurin (EB) kanssa (0,1 M PIPES [pH 7,0], 0,5 mM Na₂EDTA, 0,5 mM Na₂EGTA, 5 % askorbiinihappoa, 5 mM ditiotreitoli [DTT], 5 mM tiourea, 12 mM L-kysteiini-HCl, 1 % polyetyleeniglykoli [PEG] 20 000 -valmistetta, 0,1 mM fenyylimetyylisulfonyylifluoridia [PMSF] ja 20 g polyvinyyli-pylopyrrolidonia [PVPP]). Lietettä homogenisoitiin 10 minuutin ajan keskimääräisellä nopeudella, minkä jälkeen se siirrettiin 250 ml:n sentrifugiputkiin ja sentrifugoitiin 23 000 x g:ssä 30 minuutin ajan käyttäen GSA (Dupont-Sorvall) -roottoria.

Saatua 350 ml:n raakasupernatanttia kyllästettiin 40-%:iseksi ammoniumsulfaatilla (AS) 30 minuutissa lisäämällä hitaasti 79,86 g AS-jauhetta samalla sekoittaen jäähauteen ympäröimässä astiassa. Seos siirrettiin taas 250 ml:n sentrifugiputkiin ja sentrifugoitiin 23 000 x g:ssä 30 minuutin ajan kuten edellä. Saatua 350 ml:n supernatanttia panostettiin 40 ml:n Macro-Prep (Bio-Rad) -metyyli-HIC-pylvääseen (HIC = hydrofobisen vuorovaikutuksen kromatografia) virtausnopeudella 2,5 ml/min. Kaikista pylväsfraktioista määrätettiin proteiini käyttäen absorbanssia A₂₈₀ (nm). HIC-pylvästä pestiin esitasapainoituspuskurilla, jossa oli 1,7 M AS, 20 mM bis-tris-propaani (pH 6,8) ja

5 mM DTT, kunnes pohjataso oli lähellä nollaa. Sitten pylvästä eluoitiin puskurilla, jossa oli 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT, 1 mM MgCl_2 . Ensimmäiset pylvästä tulleet 15 ml heitettiin pois, ja loput eluaatista (200 ml) panostettiin painovoimaa käyttäen 100 ml:n Affi-Gel Blue -affiniteettigeeli (100 - 200 mesh, Bio-Rad) -pylvääseen, jossa väri Cibacron Blue F3GA oli kovalenttisesti kiinnitetty matriisiin. Geeliä esitasapainoitettiin panostuspuskurilla, jossa oli 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT, 1 mM MgCl_2 . Pylvästä pestiin perusteellisesti tällä panostuspuskurilla, kunnes pohjataso stabiloitui lähelle nollaa, minkä jälkeen sitoutuneet proteiinit eluoitiin puskurilla, jossa oli 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT ja 1,5 M natriumkloridia (NaCl).

142 ml:sta Affi-Gel Blue Gel -pylväseluaattia tehtiin 1,7 molaarinen (1,7 M) AS:n suhteen lisäämällä hitaasti 31,8 g AS-jauhetta 30 minuutissa sekoittaen samalla jäähauteen ympäröimässä astiassa. Lietettä sentrifugoitiin 250 ml:n sentrifugipulloissa 23 000 x g:ssä 30 minuutin ajan kuten edellä, ja saatu supernatantti panostettiin FPLC Phenyl-Sepharose -pylvääseen XK 26/20 (Pharmacia) 23 °C:ssa. Pylvästä esitasapainoitettiin puskurilla, jossa oli 20 mM bis-tris-propaania (pH 6,8), 5 mM DTT ja 1,7 M AS. Pohjatason vakiinnuttua lähelle nollaa proteiinit eluoitiin pylvästä käyttäen 40 minuutin käänteistä gradienttia 1,7 M AS:stä 0 M AS:ään virtausnopeuden ollessa 5 ml/min; kerättiin 1 min fraktioita. 0 M AS-eluutiopuskuri sisälsi 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT ja 1 mM MgCl_2 .

Kerättyjen fraktioiden aktiivisuusmääritykset osoittivat, että valtaosa xantosiini- N^7 -metyyli-metyylitransferaasin entsyymaattisesta aktiivisuudesta oli keskittynyt fraktioihin 49 - 54. Nämä fraktiot yhdistettiin pooliksi, jonka lopputilavuus oli 30 ml, minkä jälkeen pooli panostettiin 6 ml:n ATP-agarosi-pylvääseen (Sigma Chemicals, A2767) painovoiman avulla 4 °C:ssa. Pylvästä esitasapainoitettiin puskurilla, jossa oli 10 mM tris (pH 7,0), 5 mM DTT ja 1 mM MgCl_2 . Pohjatason stabiloiduttua pylvästä eluoitiin 20 ml:lla esitasapainoituspuskuria, joka sisälsi 100 μM xantosiinia, ja se pestiin vielä 40 ml:lla esitasapainoituspuskuria. Nämä kaksi pylväseluaattia yhdistettiin pooliksi, joka panostettiin 23 °C:ssa Mono-P HR 5/20 FPLC (Pharmacia) -pylvääseen, jota oli esitasapainoitettu puskurilla, jossa oli 25 mM bis-tris (pH 6,0) ja 9 % betaiinia. Pohjatason stabiloiduttua pylvästä eluoitiin 100 ml:lla Polybuffer 74 -puskuria (10 ml:90 ml H_2O , v/v) (pH 4,0) (Pharmacia), joka sisälsi 9 % betaiinia, virtausnopeuden ollessa 1 ml/min. Keräysputket sisälsivät 100 μl 0,5 M trisiinipuskuria (pH 7,0) ja 50 mM DTT, jolloin loppupitoisuus 1 ml:ssa oli 50 mM trisiini (pH

7,0) ja 5 mM DTT 1 minuutin fraktioita kerätessä. Tämä itse asiassa stabiloi lopulliset pH-olosuhteet lievästi happamassa pH:ssa Mono-O-pylväästä eluoiduille proteiineille. Trisiiniä sisältämättömissä keräysputkissa pääosa xantosiini-N⁷-metyylitransferaasiaktiivisuudesta todettiin gradienttifraktioissa 15 ja 16, jotka eluoutuivat pylväästä pH:ssa 5,42 ja vastaavasti 5,35. Huomiota tuli kiinnittää siihen, ettei proteiininäytteitä päästetty jäätymään puhdistuksen missään vaiheessa, koska tällä oli huomattavan kielteinen vaikutus xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin aktiivisuuden tilaan.

B. Entsyymiaktiivisuuden määrittäminen

100 µl:n standardimääritysseos käsitti pitoisuudet 50 mM trisiini (pH 7,0), 1 200 µM xantosiini, 5 mM DTT, 7,5 µM S-adenosyyli-L-(metyyli-¹⁴C)-metioniini (SAM) (60 mCi/mmol; DuPont NEN) ja 1 mM Na₂EDTA. Reaktioseosta (50 µl ilman entsyymiä) esi-inkuboitiin 10 minuutin ajan 25 °C:ssa, minkä jälkeen reaktio käynnistettiin lisäämällä 50 µl entsyymiliuosta ja sen annettiin edetä 25 °C:ssa 1 tunnin ajan. Inkubointiajan kuluttua umpeen reaktioseoksesta otettiin kolme 30 µl:n näyte-erää, joissa reaktio keskeytettiin lisäämällä 8 µl 0,6 M perkloorihappoa (HClO₄). Sama tehtiin nolla-aikaverrokeille, jotta voitaisiin todeta todellinen entsyymiaktiivisuus. Tätä seosta sentrifugoitiin mikrosentrifugissa 5 minuutin ajan, ja 19 µl saatua supernatanttia sekoitettiin 1,0 µl:aan 33 mM 7-metyylixantosiinia. Näitä seoksia sijoitettiin täpliksi Whatman nro 1 -kromatografiapaperille, ja ajettiin n-butanoli-etikkahappo-H₂O:lla (n-BuOH-HOAc-H₂O; 4:1:1). 7-metyylixantosiinin asema määritettiin sen sinisestä fluoresenssista lyhyen aallonpituuden UV-valossa. Tämä alue leikattiin irti kromatogrammeista ja radioaktiivisuus määritettiin tuikelaskennalla, jossa käytettiin 3 ml Scinti-verse-tuikenestettä (Fisher Scientific). Laskentateho oli 74,7 %. Tuloksista vähennettiin tausta sekä ei-spesifinen säteily, joka todettiin nolla-ajankohdan näytteiden 7-metyylixantosiinialueella.

C. Reaktiotuotteen identifiointi

Metyloitkohta xantiinirenkaassa identifioitiin hydrolysoimalla sokeri metyloidusta xantosiinireaktiotuotteesta ja erottamalla neljällä eri kromatografiasysteemillä. Tuote kahdesta 100 µl:n edellä kuvatun mukaisesti suoritetusta reaktiosta, joka sisälsi 6 µl 33 mM 7-metyylixantosiinia kantajana, panostettiin nauhana Whatman nro 1 -paperikromatografiapaperin alkukohtaan. Kromatogrammi ajettiin käyttäen n-BuOH-HOAc-H₂O:ta (4:1:1). Kromatogrammin metyloitua xantosiinia vastaava alue todettiin kuten edellä, se leikeltiin pieniksi

palasiksi, jotka sijoitettiin steriiliin putkeen, jossa niitä inkuboitiin 35 ml:n deionisoitua vettä kanssa 37 °C:ssa ravistellen yön yli. Saatu uute suodatettiin 2 kerroksen Mira-kangasta ja sitten 0,22 µm:n huokoskoon suodattimen läpi ja kylmäkuivattiin sitten. Kuivattu uute uudelleensuspendoitiin 1,0 ml:aan deionisoitua vettä, suspensio sijoitettiin lasiseen uuttoampulliin ja kylmäkuivattiin. Näyte uudelleensuspendoitiin 400 µl:aan 1,0 M HCl:ää ja inkuboitiin 1 tunnin ajan 100 °C:ssa. Uute kylmäkuivattiin, se uudelleensuspendoitiin 400 µl:aan 3 mM 7-metyylixantiinia ja kylmäkuivattiin jälleen. Uute uudelleensuspendoitiin 40 µl:aan deionisoitua vettä, ja 10 µl:lla suoritettiin kromatografia-ajo kullakin neljällä eri systeemillä. Kuhunkin kromatografia-ajoon sisällytettiin vertailun vuoksi 1-metyylixantiini, 3-metyylixantiini, 7-metyylixantiini, 8-metyylixantiini, 7-metyylixantosiini, xantiini ja xantosiini. Käytettiin seuraavia kromatografia-systeemejä: Whatman nro 1 -paperi, joka ajettiin *n*-BuOH-HOAc-H₂O:ssa (4:1:1), sekä C8-ohutkerroslevyt (Whatman KC18F), jotka ajettiin yhdellä seuraavista: isoamyylialkoholi-H₂O-asetonitrili (41:4:5), etanoli-H₂O (4:1) tai *tert*-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:1). Kuivaamisen jälkeen kromatogrammit suihkutettiin En³Hance-valmisteella (DuPont NEN) ja kuivattiin taas, minkä jälkeen niitä valotettiin 30 päivän ajan esivalotetulle Fuji RX_{GU}-röntgenfilmille -70 °C:ssa.

D. Proteiinien identifiointi geielektroforeesilla

Edellä kuvatun mukaisesti valmistetuista utteista valmistettiin yksisuuntaiset (1D) SDS-PAGE-minigeelit (päägeeli: 12,5 % akryyliamidia, 0,8 % metyleenibisakryyliamidia; panostusgeeli: 7,5 % akryyliamidia, 0,21 % metyleenibisakryyliamidia) sekoittamalla Laemmlin näytepuskuriin (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680) sekä kaksisuuntaiset (2D) mini-IEF/SDS-PAGE-geelit O'Farrellista et al. modifioidulla menetelmällä (O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H., Cell 12 (1977) 1133). Kaksisuuntainen elektroforeesi tehtiin mahdolliseksi saostamalla proteiinit 50 tilavuudella 100-%:ista etanolia 1 tunnissa ja uudelleenliuottamalla proteiinit sitten isoelektrisen fokuksionnin (IEF) näytepuskuriin, joka sisälsi 5 % amfoliineja (1:1, v/v; pH 3 - 10: pH 5 - 7, LKB-Pharmacia). Alkuperäisen proteiiniuutteen ja IEF-näytepuskurin välinen suhde pidettiin vähintään arvossa 1:2 sen varmistamiseksi, etteivät kromatografiavaiheista mahdollisesti jääneet puskuriaineosat häirinneet IEF:ää. Samankokoiset kokonaisproteiininäytteet (< 20 µg) panostettiin esifokusoitujen, 5 % amfoliineja kuten edellä sisältävien putkigeelien (8,8 % akryyliamidia, 1,6 % metyleenibisakryyliamidia) alaosaan. Geelejä fokuksioitiin 10 000 V-tunnilla sekä vielä 2 tuntia 1 000 voltilla (V). Sokeafokusoidut geelit leikeltiin 5 mm:n paloiksi

ja inkuboitii 0,5 ml:ssa 100 mM CaCl_2 -liuosta 24 tunnin ajan, minkä jälkeen määritettiin segmenttien pH. Tämän analyysin perusteella IEF-geelin pH-gradientiksi arvioitiin 4,4 - 6,0.

Putkigeelit SDS-PAGE:a varten valmistettiin pesemällä pikaisesti vedellä ja sitten kolme kertaa (kulloinkin 10 min) kuumalla Laemmli-näytepuskurilla. Putkigeelit sijoitettiin SDS-PAGE-geelien (päägeeli: 12,5 % akryyliamidia, 0,8 % metyleenibisakryyliamidia; panostusgeeli: 7,5 % akryyliamidia, 0,21 % metyleenibisakryyliamidia) päälle, ja ne pidettiin paikoillaan 3 %:lla agarosia Laemmli-näytepuskurissa. Proteiinit visualisoitiin hopeavärjäyksellä.

1D-geeleissä Mono-P-fraktio 16, jonka entsyymiaktiivisuus oli suurin, osoitti hopeavärjäyksessä vain dubletin läsnäoloa (kuvio 2). Näiden proteiinien molekyylipainot (kD) olivat noin 37,6 ja 36,1 kD. 2D-geeleissä kukin proteiini erottui kahtena täplänä. Näistä happamamman isoelektrisen pisteen (IP) keskimääräinen arvo useasta geelistä oli 5,2, jolloin emäksisemmän vastaava arvo oli 5,3. Niiden keskimääräinen molekyylipaino oli kuitenkin nyt 43,5 kD korkeamman ja matalamman molekyylipainon peptidien fuusioituessa toisiinsa. Tämän vuoksi 1D- ja 2D-geelien välillä ilmenee selvä ero kD:ssä. Näiden kaikkien neljän peptidin samanlainen migraatio Mono-P-pylväissä, 1D- ja 2D-geeleissä osoittaa niiden olevan isotsyymejä, jotka ovat mahdollisesti modifioituja translaation jälkeen. Vaihtoehtoisesti ne on saattanut tuottaa geeniryhmä, jotka hienoisesti poikkeavat toisistaan rakenteeltaan, jolloin tuloksena ovat havaitut toisistaan poikkeavat isotsyymit.

E. Proteiinien sekventointi

Kokonaisproteiinimääritys Lowryn menetelmällä (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., ja Randall, R.J., *J. Biol. Chem.* **193** [1951] 265) Mono-P-fraktiolle 16 osoitti 1 ml fraktion sisältävän kaikkiaan 100 μg proteiinia. Kokemuksemme mukaan näin matalilla proteiinipitoisuuksilla Lowry-arvot ovat taipuvaisia liioittelemaan tosiasiallisesti läsnä olevaa määrää. Päätimme kompensoida tätä käyttämällä oleellisen osan tästä fraktiosta proteiinisekventointiin. 900 μl Mono-P-fraktiota 16, joka edusti siis 90 μg proteiinia, sijoitettiin steriiliin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen ja siihen lisättiin 216 μl 100-%:ista trikloorietikkahappoa (TCA). Sekoituksen jälkeen putken sisältöä inkuboitii jäissä yön yli, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 14 000 rpm nopeudella mikrosentrifugissa 30 minuutin ajan 4 °C:ssa. Supernatantti aspiroitiin pois ja pelletti pestiin kahdesti 1 ml:lla 75-%:ista etanolia, jolloin kummankin pesun jälkeen sentrifugoitiin. Pelletti kuivattiin sijoittamalla putki Speed-Vac-laitteeseen, jossa sitä

pyöritettiin 1 minuutin ajan tyhjössä. Sakkaan lisättiin 20 µl 2 x Laemmli-näytepuskuria, minkä jälkeen sitä keitettiin vesihauteessa 5 minuutin ajan ja mikrofugoitiin sitten 1 minuutin ajan. Kun putken lämpötila oli laskenut 23 °C:seen, koko sen sisältämä määrä panostettiin yhdeksi vyöhykkeeksi 12,5-%:iseen 1D-geeliin. Elektroforeesiajon päätyttyä proteiinit visualisoitiin värjäämällä 0,1 %:lla Coomassie R-250 -väriä vesiliuoksessa, jossa oli 50 % metanolia ja 10 % etikkahappoa (w/v/v), minkä jälkeen väri pestiin pois. Sama 37,6 ja 36,1 kD:n dubletti, joka havaittiin hopealla värjättyissä geeleissä, nähtiin myös Coomassie-värillä värjättyissä geeleissä. Tämän dubletin käsittävä alue leikattiin irti geelistä, ja sitä käytettiin proteiinisekventoinnissa automatisoidulla Edman-pilkkomisella.

Proteiinisekventoinnin suoritti laboratorio the University of California, Davis, Protein Structure Laboratory standardiprotokollaa käyttäen. Dubletin sisältävä geelipala pestiin 4 kertaan 15 ml:lla vettä ravistellen kevyesti 15 minuutin ajan edellisistä vaiheista jääneiden etikkahapon ja SDS:n poistamiseksi. Geelipalanen leikeltiin partakoneenterällä 2 mm:n neliöiksi, jotka sijoitettiin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Geelipaloja kuivattiin vedestä Speed-Vac-laitteessa 2 tunnin ajan, kunnes ne eivät enää tarttuneet putkeen. Sitten lisättiin 30 µl geelin rehydratointipuskuria (0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 0,05 % SDS), ja pH:ksi varmistettiin 8,0 tipauttamalla 0,5 µl:n näyte pH-paperille. Lisättiin pilkkomisentsyymi, Lys-C (0,2 µg) *Achromobacter lyticus* -organismista (Wako), sekä sen verran lisää rehydratointipuskuria, että geelipalaset täysin hydratoituivat ja jäljelle jäi pieni määrä ylimääräistä puskuria. Seosta inkuboitiin yön yli 30 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen supernatantti siirrettiin puhtaaseen steriiliin mikrosentrifugiputkeen ja varastoitiin. Lisättiin tarpeeksi vettä geelipalasten peittämiseksi, minkä jälkeen niitä inkuboitiin vielä 2 tunnin ajan 30 °C:ssa. Supernatantti poistettiin ja varastoitiin samaan mikrosentrifugiputkeen kuin edellä. Tämä pesuvaihe toistettiin vielä kerran yhdistäen supernatantit edellisistä kahdesta pesusta saatuihin eriin. Sitten geelipalaset peitettiin liuoksella, jossa oli 0,1 % trifluorietikkahappoa (TFA) 80-%:isessä asetonitrilissä, ja inkuboitiin 1 tunnin ajan 30 °C:ssa. Supernatantti otettiin talteen ja siirrettiin kaikki edelliset supernatantit sisältävään putkeen. Viimeinen pesu toistettiin vielä kerran ja yhdistetyt supernatantit kuivattiin Speed-Vac-laitteessa.

Kuivatut trypsiinipilkkomistuotteet liuotettiin 25 µl:aan 6 M guanidini-HCl:ää, 0,4 M tris (pH 8,2), ja pH tarkastettiin sijoittamalla 0,5 µl:n näyte pH-paperille. Lisättiin 1 µl 450 mM DTT:tä ja pilkkomistuotetta inkuboitiin 45 mi-

nuutin ajan 50 °C:ssa. Jäähdytyksen huoneenlämpötilaan jälkeen lisättiin 2 µl 500 mM jodoasetamidia, minkä jälkeen inkuboitiin edelleen 15 minuutin ajan 23 °C:ssa. Tämän inkuboinnin päätyttyä lisättiin 72 µl vettä, jolloin saatiin lop-
 pupitoisuudet 1,5 M guanidiini ja 0,1 M tris. Sitten näytettä sentrifugoitiin 5 mi-
 5 nuutin ajan 14 000 rpm nopeudella mikrosentrifugissa ja supernatantti siirret-
 tiin varovaisesti uuteen mikrosentrifugiputkeen. Saostuneeseen pellettiin lisät-
 tiin 25 µl 0,1-%:ista TFA:ta ja vorteksoitiin. Sitten putken sisältö sentrifugoitiin
 jälleen kuten edellä ja supernatantti lisättiin edellisestä vaiheesta saatuun.

Trypsiinillä pilkkomalla saadut fragmentit erotettiin toisistaan kor-
 10 keapainenestekromatografisesti (HPLC) C18 1 mm x 10 cm kapillaaripylvääs-
 sä, jolloin käytettiin 90 minuutin lineaarista gradienttia 5 % liuotinta A (0,1 %
 TFA) → 70 % liuotinta B (0,075 % asetonitrili) virtausnopeuden ollessa 100 µl
 minuutissa. UV-detektio asetettiin 210 nanometriin (nm) skaalan ollessa
 0 - 0,1 A. Saadut yksittäiset piikit osoittivat, että läsnä oli useita eri peptidejä,
 15 kuten esitetään kuviossa 3. Verrokiksi osalla alkuperäistä SDS-PAGE-geeliä,
 joka ei sisältänyt proteiinia, suoritettiin tämä pilkkomismenettely. Kuviossa 3
 esiintyvät täytetyt piikit olivat yhteisiä tälle verrokille ja näytteelle. Automatisoitu
 Edman-pilkkominen suoritettiin kolmelle, A:lla, B:llä ja C:llä merkitylle piikille.
 Piikeistä kahdelle (A ja B) saatiin toisiinsa limittyvät yksittäiset sekvenssit, jotka
 20 edustivat samaa proteiinifragmenttia (kuvio 2, fragmentit A ja B). Kolmannelle
 piikille (C) saatiin erilainen ainutkertainen sekvenssi (kuvio 2, fragmentti C).

F. Oligonukleotidi-DNA-alukkeiden synteesi xantosiini-N⁷-metyylitransfe- raasia varten

20-meerialukkeiden kemiallisen synteessin xantosiini-N⁷-metyyli-
 25 transferaasia pilkkomalla saatujen fragmenttien kahta aminohapposekvenssiä
 varten suoritti The Midland Certified Reagent Company. Valituilla fragmentti-
 alueilla nukleiinihappojen degeneraatio oli minimaalinen, ja silloin kun se oli
 mahdollista, vältettiin aminohappoja, joiden geneettinen koodi vaihtelee kovin
 paljon. Silloin kun tämä ei ollut mahdollista, syntetisoitiin samalle fragmentille
 30 enemmän kuin yksi aluke kaikkien mahdollisten vaihtoehtoisten kodoniyhdis-
 telmien mukaan ottamiseksi. Lisäksi syntetisoimme myös alukkeita, jotka olivat
 komplementaarisia kyseistä aminohapposekvenssiä koodittavien DNA-
 sekvenssien koodisäikeeseen nähden. Kolmen tai yli kolmen kolmannen ase-
 man nukleotididegeneraatiot kierrettiin käyttämällä inosiinia näissä asemissa.
 35 Nukleotididegeneraation ollessa kaksinkertainen kumpikin nukleotidi sisällytet-
 tiin alukkeen synteisiin (kuvio 3).

G. RNA:n uuttaminen B3-vaiheen nuorista kahvikasvilehdistä

Kaikki uutossa käytetty oli steriiliä, vapaata RN-aasista sekä valmistettu käsitellen 0,1-%:isella DEPC-vedellä. Kaikki sentrifugointivaiheet suoritettiin 4 °C:ssa ellei toisin ole mainittu.

- 5 B3-vaiheessa olevia nuoria kahvikasvin lehtiä kerättiin, ja ne varastoitiin kuten edellä on kuvattu. Kokonais-RNA eristettiin 100 g:sta tätä nuorta lehtikudosta jauhamalla nestetypessä ja siirtämällä sitten välittömästi esijäähdytettyyn kotikäyttökahvimyllyyn. Kudos jauhettiin jauheeksi pienen palasen kuivajäätä kanssa. Sitten kudos siirrettiin 200 ml:aan homogenisointipuskuria,
- 10 jossa oli 100 mM tris-HCl (pH 9,0), 200 mM NaCl, 15 mM Na₂EDTA, 0,5 % sarkosyyliä ja juuri lisätty 100 mM β-merkaptetaanoli. Tähän lisättiin 200 ml puskuritasapainoitettua fenolia ja 40 ml seosta, jossa oli kloroformia ja isomyylialkoholia (24:1, v/v). Sitten kudos homogenisoitiin lasiastiassa 2 minuutin ajan suurella nopeudella Polytron-homogenisaattorissa. Välittömästi homogenisoinnin päätyttyä lisättiin 14 ml 3 M natriumasetaattia (pH 4,0) ja sekoitettiin käyttämällä homogenisaattoria vielä 1 minuutin ajan. Homogenaattia pidettiin sitten jäissä 15 minuutin ajan, minkä jälkeen se siirrettiin kahteen polypropyleeniseen 250 ml:n sentrifugiputkeen. Sentrifugointi GSA (DuPont Sorvall)
- 15 -roottorissa 16 000 x g:ssä kesti 10 minuuttia. Vesifaasi (päälikerros) siirrettiin uuteen polypropyleeniseen 250 ml:n sentrifugiputkeen, johon lisättiin sitten sama tilavuus isopropanolia.

Tätä seosta inkuboitiin yön yli -20 °C:ssa, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 10 000 x g:ssä 10 minuutin ajan saostetun RNA:n ottamiseksi talteen.

- RNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla ja sentrifugoitiin toistamiseen 10 000 x g:ssä 5 minuutin ajan, minkä jälkeen etanoli dekantoiin eroon ja pellettiä kuivattiin tyhjässä 5 minuutin ajan. Sitten pelletti uudelleensuspendoitiin 15 ml:aan DEPC:llä käsiteltyä vettä. RNA-suspensio siirrettiin steriiliin kierrekorkilla varustettuun 40 ml:n sentrifugiputkeen ja ei-liukoinen materiaali poistettiin sentrifugoimalla 10 000 x g:ssä 5 minuutin ajan. Supernatantti siirrettiin uuteen kierrekorkilliseen 40 ml:n sentrifugiputkeen ja siihen lisättiin 5 ml
- 30 8 M LiCl-liuosta, jolloin LiCl:n loppupitoisuudeksi tuli 2 M. Putken sisältöä inkuboitiin yön yli 4 °C:ssa, minkä jälkeen RNA otettiin talteen sentrifugoimalla 14 000 x g:ssä 10 minuutin ajan. Sitten saatu RNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla, sentrifugoitiin 10 000 x g:ssä 5 minuutissa eroon ja kuivattiin pikaisesti tyhjässä. Pelletti uudelleensuspendoitiin 5 ml:aan DEPC:llä käsiteltyä
- 35 vettä ja suspensiota sentrifugoitiin 10 000 x g:ssä 5 minuutin ajan ei-liukoisen

materiaalin poistamiseksi. Supernatantti siirrettiin neljään steriiliin 1,5 ml mikrosentrifugiputkeen ja varastoitin jäihin. Kvantitointi 10 µl:sta kokonais-RNA-liuosta Shimadzu UV 160U -spektrofotometrillä 230 - 330 nm spektrialueella osoitti, että RNA:ta oli läsnä 42,8 mg. RNA:ta sisältävät putket varastoitin
5 -70 °C:seen.

H. Poly(A⁺)-mRNA:n puhdistaminen kokonais-RNA:sta

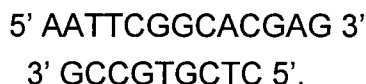
Kokonais-RNA-preparaattia rikastettiin poly(A⁺)-RNA:n (mRNA) suhteen käyttämällä PolyATtract II mRNA -eristyssysteemipakkausta (Promega Corporation). 5,1 mg vastaava 600 µl:n kokonais-RNA-erä mitattiin edellä mainitun pakkauksen sisältämään putkeen ja lopputilavuudeksi täytettiin 2,43 ml
10 lisäämällä RN-aasia sisältämätöntä vettä. Seosta kuumennettiin 65 °C:ssa 10 minuutin ajan, minkä jälkeen lisättiin 10 µl biotinyloidun oligo(dT):n liuosta, jossa pitoisuus oli 50 pmol/ml, ja 60 µl 20x SSC:tä (175,3 g/l NaCl; 88,2 g/l natriumsitraattia, pH 7,0), ja seoksen annettiin hitaasti jäähtyä huoneenlämpötilaan noin 30 minuutissa. Erä paramagneettisia streptavidinihiukkasia pestiin 3
15 kertaan 0,5x SSC:ssä (1,5 µl/pesu), ja uudelleensuspendoitiin 0,5 ml:aan 0,5x SSC:tä. Biotinyloitua oligo(dT):tä sisältävä RNA-liuos lisättiin pestyihin paramagneettisiin streptavidinihiukkasiin. 10 minuutin inkuboinnin huoneenlämpötilassa jälkeen paramagneettiset hiukkaset sitoutuneen mRNA:n kera vedettiin
20 putken seinään magneetin avulla. Supernatantti poistettiin ja hiukkaset pestiin 4 kertaan 0,1x SSC:llä (1,5 ml/pesu). mRNA otettiin talteen suspendoimalla hiukkaset 1,0 ml:aan RN-aasia sisältämätöntä vettä ja poistamalla vesi hiukkasten sitoutuessa putken seinään. Poistettu vesi sijoitettiin 500 µl:n erissä kahteen steriiliin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen. Lisättiin 1/10 tilavuus 3 M
25 natriumasetaattia (50 µl/putki), minkä jälkeen mRNA saostettiin samalla tilavuudella isopropanolia (550 µl/putki). Putkia pidettiin -20 °C:ssa yön yli, minkä jälkeen niiden sisältöä sentrifugoitiin 14 000 x g:ssä 30 minuutin ajan 4 °C:ssa. Pelletti pestiin 500 µl:lla 75-%:ista jääkylmää etanolia ja sentrifugoitiin toistamiseen. Etanoli dekantoiin eroon ja pelletti kuivattiin pikaisesti tyhjässä.
30 mRNA liuotettiin 60 µl:aan DEPC:llä käsiteltyä, nukleaaseja sisältämätöntä steriiliä vettä. Kvantiointi suoritettiin 15 µl:sta mRNA-liuosta samoin kuin kuvattiin kokonais-RNA:lle. 5 mg:sta kokonais-RNA:ta saatiin noin 9,6 µg mRNA:ta.

I. cDNA-kirjaston rakentaminen

Ensimmäisen ja toisen säikeen cDNA syntetisoitiin käyttäen ZAP-
35 cDNA-synteesipakkausta (Stratagene). 4 µg:aa mRNA:ta 25 µl:ssa vettä inku-

- boitiin 65 °C:ssa 5 minuutin ajan. Lisättiin 3 µl 100 mM metyylielohopealiuosta ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan. Lisättiin 4 µl 700 mM β-merkaptetoetanolia ja inkubointia jatkettiin vielä 5 minuutin ajan. Denaturoituun mRNA:han lisättiin 5 µl 10x 1. säikeen puskuria, 5 µl 100 mM DTT-liuosta, 3 µl
- 5 nukleotidiseosta (10 mM kutakin dATP, dGTP, TTP ja 5-metyyli-dCTP), 2 µl liittäjä-alkueliosta, jossa pitoisuus oli 1,4 µg/ml ja jonka sekvenssi oli: (5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT3'), 1 µl RN-aasisalpaajaa sekä 5 µl vettä. Reaktioseosta inkuboitiin huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan alukkeen juottamiseksi mRNA:han ja 2,5 µl
- 10 M-MuLV-käänteiskopioijaentsyymiliuosta, jossa pitoisuus oli 20 U/µl, lisättiin. 5 µl tätä reaktioseosta erotettiin putkeen, jossa oli 0,5 µl 800 Ci/mmol (α-³²P)dCTP-liuosta (DuPont NEN). Kumpaakin reaktioseosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Radioaktiivisesti leimattu reaktioerä jäädytettiin -20 °C:ssa myöhempää geelianalyysiä varten.
- 15 45 µl:n pääreaktioseokseen lisättiin 40 µl 2. säikeen puskuria, 15 µl 100 mM DTT-liuosta, 6 µl nukleotidiseosta (10 mM dATP, dGTP, TTP ja 26 mM dCTP), 268,3 µl vettä ja 2 µl 800 Ci/mmol (α-³²P)dCTP-liuosta. Sekoituksen jälkeen lisättiin 4,5 µl 1 U/µl RN-aasi-H-liuosta sekä 19,2 µl 5,2 U/µl E. coli DNA-polymeraasi-I-liuosta, ja reaktioseosta inkuboitiin 16 °C:ssa 2,5 tunnin
- 20 ajan. Reaktioseosta uutettiin 400 µl:lla fenoli-kloroformia (1:1) ja muodostuneet faasit erotettiin sentrifugoimalla. Vesifaasi siirrettiin uuteen putkeen ja uutettiin toistamiseen kloroformilla. Vesifaasi otettiin talteen kuten edellä. Kaksisäikeinen cDNA otettiin talteen saostamalla yön yli -20 °C:ssa, kun oli ensin lisätty 33,3 µl 3 M natriumasetaattia ja 867 µl 100-%:ista etanolia. Sakka otettiin tal-
- 25 teen sentrifugoimalla mikrosentrifugissa 4 °C:ssa 60 minuutin ajan. Sakka pestiin 1 µl:lla 80-%:ista etanolia ja otettiin talteen sentrifugoimalla huoneenlämpötilassa täydellä nopeudella mikrosentrifugissa. Supernatantti poistettiin, sakka kuivattiin tyhjässä ja liuotettiin 45 µl:aan vettä. 3 µl uudelleensuspendoitua kaksisäikeistä cDNA:ta erotettiin ja jäädytettiin -20 °C:ssa geelielektroforeettista analyysiä varten.
- 30 Loppuihin 42 µl:aan kaksisäikeisen cDNA:n liuosta lisättiin 5 µl 10x Klenow-puskuria (puskuri numero 3), 2,5 µl 2,5 mM nukleotidiliuoksia (dCTP, dGTP, dATP ja TTP) sekä 0,5 µl 5 U/µl Klenow-fragmenttiliuosta. 30 minuutin 37 °C:ssa kuluttua lisättiin 50 µl vettä ja reaktioseosta uutettiin samalla tilavuudella fenoli-kloroformia (1:1) ja sitten kloroformilla kuten edellä on kuvattu. Li-
- 35 sättiin 7 µl 3 M natriumasetaattia ja 226 µl 10-%:ista etanolia, minkä jälkeen

tylppäpäinen kaksisäikeinen DNA otettiin talteen saostamalla 30 minuutin inkuboinnilla jäissä ja sitten mikrosentrifugoimalla täydellä nopeudella 4 °C:ssa 60 minuutin ajan. Pelletti pestiin 300 µl:lla 80-%:ista etanolia, sentrifugoitiin ja kuivattiin kuten edellä. Kuivattuun cDNA:han lisättiin 7 µl *EcoRI*-liittäjien 5 0,4 µg/µl liuosta. *EcoRI*-liittäjien rakenteet ovat seuraavat:



cDNA:n uudelleensuspendoimiseksi vorteksoidaan, minkä jälkeen lisätään 1 µl 10x ligatointipuskuria, 1 µl 10 mM ATP-liuosta ja 1 µl 4 Weiss U/µl 10 T4-DNA-ligaasiliuosta, ja reaktioseosta inkuboidaan yön yli 8 °C:ssa. Ligaasi inaktivoitiin kuumentamalla 70 °C:ssa 30 minuutin ajan. cDNA:han kiinnittyneiden *EcoRI*-liittäjien 5'-päät fosforyloitiin polynukleotidikinaasia käyttäen. Ligatointireaktioseokseen lisättiin 1 µl 10x puskuria numero 3, 2 µl 10 mM ATP-liuosta, 6 ml vettä ja 1 ml 10 U/ml T4-polynukleotidikinaasiliuosta. 30 minuutin 15 37 °C:ssa kuluttua kinaasireaktio inaktivoitiin kuumentamalla 70 °C:seen 30 minuutiksi.

“Tahmeat” *XhoI*-päät muodostettiin mRNA:n 3'-päästä vastaavaan cDNA-päähän pilkkomalla *XhoI*-kohdasta liittäjä-alukkeessa (katso edellä). cDNA:han lisättiin 28 µl *XhoI*-puskuria ja 3 µl 40 U/ml *XhoI*-liuosta, ja reaktioseosta inkuboitii 37 °C:ssa 1,5 tunnin ajan. cDNA, jossa oli tahmeat *EcoRI*-päät 5'-päässä ja tahmeat *XhoI*-päät 3'-päässä (suhteessa alkuperäiseen mRNA:han), fraktioitiin koon mukaan käyttämällä se Sephacryl S-400-spinpylväessä seuraavasti. Lisättiin 5 µl 10x STE:tä (100 mM tris [pH 7,0], 5 mM EDTA ja 100 mM NaCl), ja panostettiin cDNA Sephacryl S-400:aa sisältävän 25 1 µl:n ruiskun yläpäähän. 500 µl:n mikrosentrifugiputki sijoitettiin ruiskun alaosan ja pylväs sijoitettiin sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin noin 400 x g:ssä 2 minuutin ajan. Ruiskun yläosaan lisättiin 60 µl 10x STE:tä, uusi mikrosentrifugiputki asetettiin alle ja pylväs sentrifugoitiin jälleen kuten edellä. Tätä menettelyä toistettiin, kunnes oli kerätty 6 fraktiota.

Noin 10 % kustakin fraktiosta ajettiin elektroforeettisesti 1-%:isessa agarosigeelissä kunkin fraktion käsittämän cDNA:n kokojakauman määrittämiseksi. Loppuosaa kustakin fraktiosta uutettiin samalla tilavuudella fenolikloroformia ja sitten kloroformilla kuten edellä on kuvattu, minkä jälkeen suoritettiin saostaminen lisäämällä 2 tilavuutta 100-%:ista etanolia. Yön yli kestäneen inkuboinnin -20 °C:ssa jälkeen cDNA otettiin talteen sentrifugoimalla 35 14 000 x g:ssä 4 °C:ssa 60 minuutin ajan mikrosentrifugissa. cDNA pestiin

200 µl:lla 80-%:ista etanolia kuten edellä kuvattiin ja kuivattiin. cDNA liuotettiin 5 µl:aan vettä, ja 0,5 µl erotettiin cDNA-pitoisuuden määrittämiseksi fluorografisesti Hoefer TKO 100 DNA Fluorometer -laitetta käyttäen. Loput 4,5 ml fraktiosta 1, joka sisälsi suurimmat cDNA-molekyylit, sisälsi noin 304 ng cDNA:ta.

- 5 100 ng cDNA:ta fraktiosta 1 ligatoitiin 1 µg:aan Uni-Zap-vektoria, joka on lambda-bakteriofagi-ZAP-vektori ja jota oli pilkottu *EcoRI*:llä ja *XhoI*:llä (Stratagene). Fraktio 1 -cDNA (2,9 µl) lisättiin seokseen, jossa oli 0,54 µl 10x ligatointipuskuria, 0,5 µl 10 mM ATP-liuosta, 1 µl 1 µg/µl Uni-Zap XR -vektori-liuosta ja 0,5 µl 4 Weiss U/µl T4-DNA-ligaasiliuosta. Reaktioseosta inkuboitiin
- 10 8 °C:ssa noin 44 tunnin ajan. 1 µl:n erä ligatointireaktioseoksesta lisättiin yhteen erään "Freeze-Thaw"-uutetta Gigapack II Gold -pakkauspakkauksesta (Stratagene). 15 µl sonikoitua uutetta lisättiin ja seosta sekoitettiin kevyesti. Pakkaus suoritettiin huoneenlämpötilassa. 2 tunnin kuluttua pakkausreaktio-
- 15 seokseen lisättiin 500 µl SM-puskuria (0,01 M tris-HCl pH 7,5, 0,01 M MgCl₂, 0,1 mM Na₂EDTA) ja 20 µl kloroformia, jäte poistettiin sentrifugoimalla pikaisesti mikrosentrifugissa ja pakatut faagit varastoitiin 4 °C:seen odottamaan käyttöä.

J. Primaarikirjaston titraaminen

- 1 µl 500 µl:n primaarikirjastosta sekoitettiin 9 µl:aan SM-puskuria
- 20 1/10-laimennoksen saamiseksi. 1 µl:lla tätä laimennosta tartutettiin 200 µl *E. coli* XL1-Blue MRF' -soluja, jotka oli kasvatettu tiheyteen, joka vastasi OD₆₀₀-arvoa 0,5. Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa 15 minuutin ajan kevyesti ravistellen. Tartutetut solut sekoitettiin sitten 2,5 ml:aan 48 °C pinta-agaria, joka sisälsi
- 25 15 µl 0,5 M IPTG-liuosta, ja 50 µl:aan X-gal:in 250 mg/ml liuosta, minkä jälkeen ne maljattiin 100 x 15 mm NZY-maljoihin (5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄·7H₂O, 5 g/l hiiva-uutetta, 10 g/l NZ-amiinia [pH 7,5] ja 15 g/l Difco-agaria). Maljoja inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Taustaplakit olivat sinisiä kun taas yhdistelmä-DNA-plakit olivat valkoisia. Kolmesta tällaisesta maljasta saatu keskiarvo osoitti, että
- 30 1 µl:sta primaarikirjastoa saatiin 1 930 valkoista yhdistelmä-DNA-plakkia ja 65 sinistä plakkia. 500 µl:n primaarikirjaston kokonaisuudessaan laskettiin edustavan 965 000 yhdistelmä-DNA-plakkia.

K. Primaarikirjaston monistaminen

- 20 steriiliin putkeen mitattiin 300 µl *E. coli* XL1-Blue MRF' -soluja, jotka oli kasvatettu tiheyteen OD₆₀₀ = 0,5. Kuhunkin putkeen lisättiin 12,5 µl
- 35 primaarivarastokirjastoa ja 90 µl SM-puskuria ja putkien sisältöä inkuboitiin

37 °C:ssa 15 minuutin ajan. Kuhunkin putkeen lisättiin 2,5 ml 48 °C pinta-
 agaria, ja solut maljattiin 100 x 15 mm NZY-maljoihin. Maljoja inkuboitin yön
 yli 37 °C:ssa. Kuhunkin maljaan lisättiin 5 ml SM-puskuria, ja maljoja inkuboi-
 tiin vielä 8 tunnin ajan 4 °C:ssa. SM-puskuri kerättiin pois steriilin pipetin avulla
 5 ja varastoitin 250 ml:n sentrifugiputkeen. Kukin malja pestiin noin 4 ml:lla tuo-
 retta SM-puskuria, ja erä lisättiin aiemmin kerättyyn materiaaliin. Monistettuun
 kirjastoon lisättiin kloroformia 5 %:n lopputilavuuteen. Sitten kirjastoa inkuboi-
 tiin huoneenlämpötilassa 15 minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin
 2 000 x g:ssä 10 minuutin ajan solujätteen poistamiseksi. Supernatantti (114,5
 10 ml) otettiin talteen ja sijoitettiin steriiliin polypropyleeniputkeen. Kloroformia li-
 sätettiin 0,3 %:n lopputilavuuteen ja monistettu kirjasto varastoitin 4 °C:seen.

L. Monistetun kirjaston titraaminen

1 µl monistetun kirjaston 10⁻¹¹-laimennosta SM-puskurissa sisälsi
 192 yhdistelmä-DNA-plakkia, kun maljaus suoritettiin edellä kuvatun mukai-
 15 sesti. 50 000 yhdistelmä-DNA-plakin saamiseksi 25 µl:lla 10⁻⁷-laimennosta tar-
 tutettiin 600 µl *E. coli* XL1-Blue MRF' -soluja, jotka oli kasvatettu optiseen ti-
 heyteen (OD₆₀₀) 0,5 ja joita sitten inkuboitin 37 °C:ssa 15 minuutin ajan. Näihin
 soluihin lisättiin 6,5 ml 48 °C pinta-agaria, ja kirjasto maljattiin 150 x 15 mm
 NZY-maljoihin. Valmistettiin neljä tällaista 200 000 yhdistelmä-DNA-plakkia
 20 edustavaa maljaa, joita inkuboitin sitten 37 °C:ssa yön yli. Maljoja jäähdytettiin
 sitten 4 tunnin ajan 4 °C:ssa, minkä jälkeen niitä käytettiin kirjaston DNA-
 seulontaan.

M. Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi-cDNA:n monistaminen polymeraasi- ketjureaktiolla (PCR)

25 Ensimmäisen säikeen cDNA syntetisoitiin kuten kuvattiin edellä
 Stratagene-protokollan yhteydessä. Trypsiinillä pilkkomalla saatujen kahden
 yksittäisen peptidisekvenssin avulla voitiin syntetisoida kuviossa 4 esitetyt de-
 generoituneet alukkeet. Suoritettiin näiden alukeparien (1-6, 2-6, 3-5 tai 4-5)
 välinen polymeraasiketjureaktio (PCR) (Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.,
 30 Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., ja Erlich, H.A., *Science* 239
 [1988] 487), jossa käytettiin 4 ng cDNA:ta, 1 µl 20 µM alukeliuoksia, 0,5 µl
 kunkin deoksiribonukleotiditriofosfaatin 1 mM liuosta, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 µl Taq-
 DNA-polymeraasia (5 000 U/ml), 2,5 µl 10x PCR-puskuria (10 mM tris-HCl [pH
 9,0], 0,1 % Triton X-100 -valmistetta) sekä steriiliä vettä 25 µl:n lopputilavuu-
 35 teen. PCR:n olosuhteet olivat 94 °C 4 minuutin ajan (1 sykli); 94 °C 1 minuutin

ajan, 43 °C 1 minuutin ajan, 72 °C 1 minuutin ajan (35 sykliä); 72 °C 5 minuutin ajan (1 sykli). Reaktiot suoritettiin 500 µl:n steriileissä mikrosentrifugiputkissa käyttäen Perkin Elmer DNA 480 -lämpökierrätinlaitetta. Vain alukeyhdistelmästä 1-6 saatiin yksi yksittäinen tuote 43 °C:n juottamislämpötilassa. Tuotteen kooksi mitattiin elektroforeettisesti agarosigeelissä SeaPlaque-agarosia (FMC) käyttäen noin 750 emäsparia. Kaupallisesti saatavana olevaa 100 emäsparin sarjaa käytettiin kokomerkkinä (Promega Corporation).

M. Kahville spesifisen xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi-PCR-geenituotteen kloonaminen

10 Alukkeita 1 ja 6 (kuvio 4) käyttäen saatuun 750 emäsparin fragmenttiin 50 µl:ssa PCR-reaktioseosta lisättiin 50 µl kloroformia ja 100 µl steriiliä vettä. Seos vorteksoitiin, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin mikrosentrifugissa 14 000 rpm nopeudella 2 minuutin ajan. DNA:n sisältävä, päällä oleva vesifaasi poistettiin ja siirrettiin steriiliin putkeen. Kvantitointi etidiumbromidilla
15 levyllä värjäämällä osoitti, että läsnä oli noin 5 ng PCR:llä monistettua DNA:ta/µl. PCR-tuote ligatoitiin sitten TA Cloning Kit pCR II -vektoriin (Invitrogen Corporation) 10 µl:ssa ligatointireaktioseosta, jossa oli 1 µl 10x ligatointipuskuria, 2 µl pCR II -vektoria (25 ng/µl), 3 µl vastavalmistettua PCR-tuotetta (5 ng/µl), 1 µl T4-DNA-ligaasia ja 3 µl steriiliä vettä. Ligatointireaktiota
20 inkuboitiin 14 °C:ssa yön yli. Ligatointireaktioseoksia sentrifugoitiin 14 000 rpm nopeudella 2 minuutin ajan, minkä jälkeen ne sijoitettiin jäihin. Sulatettiin ampullinen transformoitumiskelpoisia *E. coli* XL1-Blue -soluja, niihin lisättiin välittömästi 2 µl 0,5 M α-merkaptotetanolia ja sekoitettiin kevyesti pipetin kärjellä. 2 µl ligatointireaktioseosta pipetoitiin soluille ja sekoitettiin kevyesti pipetin
25 kärjellä. Sitten ampullia inkuboitiin jäissä 30 minuutin ajan, minkä jälkeen aiheutettiin tasan 30 sekunnin lämpöshokki 42 °C lämpövaraajassa ja sijoitettiin ampulli jäihin. Kahden minuutin kuluttua siihen lisättiin 450 µl steriiliä SOC-kasvualustaa (20 g/l tryptonia, 5 g/l hiiva-uutetta, 0,5 g/l NaCl, 10 ml/l 250 mM kaliumkloridi, 10 ml/l MgCl₂, 20 ml/l 1 M glukoosi [pH 7,0]). Ampullia ravisteltiin
30 sitten 225 rpm nopeudella pyöröravistelijassa 1 tunnin ajan, minkä jälkeen se sijoitettiin jäihin.

Transformoidut solut maljattiin pipetoimalla 50 µl ja/tai 200 µl solususpensiota yhdelle kahdesta LB-maljasta (10 g/l tryptonia, 5 g/l hiiva-uutetta, 10 g/l NaCl, 15 g/l Difco-agaria, pH 7,5), jossa kasvualusta sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä ja 40 µg/ml X-Gal:ia. Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa 20 tunnin ajan,
35 minkä jälkeen ne siirrettiin 4 °C:seen 3 tunniksi värin kehittämiseksi. Kuudesta

valkoisesta transformanttipesäkkeestä analysoitiin PCR-fragmentin läsnäolo ja suuntaus.

N. Plasmidi-miniprep-valmisteen keittäminen

Kutakin transformanttipesäkettä kasvatettiin 5 ml:ssa steriiliä Terrific-lientä (12 g/l tryptonia, 24 g/l hiiva-uutetta, 4 ml/l glyserolia, 100 ml/l 10x TB-fosfaattia [0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4]), jota oli täydennetty 50 μg :lla/ml ampisilliiniä. Putkien sisältöä inkuboitiin yön yli pyöröravistelijassa 37 °C:ssa. 3 ml kutakin pesäkesuspensiota siirrettiin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen, 1 ml kerrallaan, ja solut pellettoitiin sentrifugoimalla 14 000 rpm nopeudella 2 minuutin ajan. Supernatantti kaadettiin kullakin kerralla pois jättäen solupelletti niin kuivaksi kuin mahdollista. Solut pestiin yhden kerran 1 ml:lla steriiliä vettä sentrifugoiden kuten edellä. Supernatantti heitettiin pois, ja solupelletti uudelleensuspendoitiin 320 μl :aan STET-puskuria (8 % sakkaroosia, 0,5 % Triton X-100 -valmistetta, 50 mM EDTA, 10 mM tris-HCl, pH 8,0). Näihin soluihin lisättiin 32 μl lysotsyymiin 10 mg/ml liuosta TE-puskurissa (10 ml/l 1 M tris-HCl pH 8,0, 2 ml/l 0,5 M EDTA pH 8,0) ja sekoitettiin kääntelemällä putkia ylösalaisin useaan kertaan. Putket sijoitettiin kiehuvaan vesihauteeseen 5 minuutiksi, minkä jälkeen ne siirrettiin välittömästi jäihin. Putkien sisällön jäähtyttyä sentrifugoitiin 30 minuutin ajan 14 000 rpm nopeudella 4 °C:ssa. Kustakin putkesta poistettiin pelletti steriilillä hammastikulla. Supernatanttiin lisättiin 170 μl 7,5 M NH_4OAc -liuosta ja 550 μl jääkylmää isopropanolia, minkä jälkeen DNA:ta saostettiin yön yli -20 °C:ssa. Putkien sisältöä sentrifugoitiin 14 000 rpm nopeudella 4 °C:ssa 30 minuutin ajan, pelletti pestiin 75-%:isella etanolilla ja sitä kuivattiin 1 minuutin ajan Speed-Vac-laitteessa. DNA uudelleensuspendoitiin 50 μl :aan steriiliä vettä, joka sisälsi 1 μl :n RN-aasi-A:n 5 mg/ml liuosta.

O. Pilkkominen restriktioentsyymeillä insertin leikkaamiseksi pCR II -plasmidista

25 μl :n reaktioseos valmistettiin sekoittamalla keskenään 15 μl edellä kuvatus mukaisesti saatua plasmidi-miniprep-DNA:ta, 2,5 μl puskuria H (90 mM tris-HCl [pH 7,5], 10 mM MgCl_2 , 50 mM NaCl), 1 μl *EcoRI*:tä (8 - 12 U/ μl) sekä 6,5 μl steriiliä vettä. Seosta inkuboitiin ravistellen vesihauteessa 37 °C:ssa 1 tunnin ajan, minkä jälkeen sitä keitettiin vesihauteessa 1 minuutin ajan. Putkien sisältöä sentrifugoitiin 14 000 rpm nopeudella 15 sekunnin ajan, minkä jälkeen putkien sisältöineen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan. Kaksi μl panostusväriliuosta lisättiin 10 μl :aan kutakin seosta, ja pilkkomistuotteet

analysoitiin elektroforeettisesti 1,5-%:isessa agarosigeelissä käyttäen erittäin puhdasta agarosia (GibcoBRL) sekä 100 emäsparia sarjaa kokomerkinä (Promega Corporation).

- Vain yhdestä kaikkiaan kuudesta reaktiotuotteesta osoitettiin noin
- 5 750 emäsparin pilkkomistuiteinsertin läsnäolo. Alkuperäinen bakteeripesäke, joka vastasi 750 emäsparin xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi-PCR-tuotteen käsittävää plasmidia, siirrostettiin 250 ml:n erlenmeyerkolviin, jossa oli 50 ml steriiliä LB-kasvualustaa (10 g/l tryptonia, 5 g/l hiiva-uutetta, 10 g/l NaCl, pH 7,5) täydennettynä 50 µg/ml ampisilliiniä. Kolvia inkuboitiin pyöröravisteli-
- 10 jassa 30 °C:ssa yön yli. 18 ml saatua solukasvualustaa pelletoititiin 1,5 ml mikrosentrifugiputkissa kuten edellä on kuvattu.

- Plasmidi-DNA puhdistettiin käyttäen QIAGEN Plasmid Mini Kit -menettelyä (Qiagen Inc.). Pesty bakteeripelletti uudelleensuspendoitiin 0,3 ml:aan puskuria P1, joka sisältää oheistetun RN-aasin. Tähän lisättiin 0,3 ml alkalisen
- 15 lyysin puskuria P2, putken sisältö sekoitettiin kevyesti putkea keinuttamalla ja inkuboitiin korkeintaan 5 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Sitten lisättiin 0,3 ml jäähdytettyä puskuria P3 ja sekoitettiin kääntämällä putki ylösalaisin kuudesti. Uutetta pidettiin jäissä 10 minuutin ajan, minkä jälkeen sitä sentrifugoitiin 14 000 nopeudella 15 minuutin ajan mikrosentrifugissa. Supernatantti
- 20 poistettiin ja panostettiin QIAGEN-tip 20 -pylvääseen, joka oli edeltäpäin tasapainoitettu virrattamalla painovoiman avulla sen läpi 1 ml QBT-puskuria. Panostetun solu-uutesupernatantin annettiin myös mennä pylväshartsiin painovoimalla. Sitten kun pylväsvirtaus oli pysähtynyt, QIAGEN-tip 20 -hartsi pestiin 4 kertaan 1 ml:lla QC-puskuria. DNA eluoiitiin pesemällä QIAGEN-tip 20
- 25 -pylvästä 0,8 ml:lla QF-puskuria ja saostettiin sitten huoneenlämpötilassa lisäämällä 0,7 tilavuutta (560 µl) isopropanolia. Putken sisältöä sentrifugoitiin välittömästi 14 000 rpm nopeudella 30 minuutin ajan, minkä jälkeen supernatantti poistettiin varovaisesti. Saostunut DNA pestiin 1 ml:lla jääkylmää 70-%:ista etanolia, sentrifugoitiin kuten edellä ja kuivattiin ilmassa 5 minuutin
- 30 ajan. DNA uudelleensuspendoitiin 100 µl:aan steriiliä vettä. UV-spektrofotometrisesti edellä kuvatun mukaisesti 1 µl:sta DNA-suspensiota osoitettiin puhdistetun pCRII-plasmidi-DNA:n pitoisuudeksi 55 µg/100 µl.

- pCRII-plasmidi-insertin automatisoitu DNA-sekventointi lähtien 5'-päästä suoritettiin käyttäen M13-käänteisaluketta, joka sitoutuu pCRII:ssa referenssikohtaan, joka on juuri PCR-tuotteen insertointikohdan vieressä.
- 35 Sekventointi suoritettiin yliopiston the University of Hawaii bioteknologian palvelu-

keskuksessa. Sekventointireaktio sisälsi 1 µg:n plasmiditemplaattia sekä 3,2 pmol M13-aluketta. Saatu sekvenssi osoitti PCR-tuotteen koodittavan DNA-sekvenssin ensimmäisille 6 aminohapolle peptidifragmenteista A ja B (kuvio 4), joiden sekvenssin perusteella valmistettiin degeneroituneet DNA-alukkeet 1 ja 2 (kuvio 4). Lisäksi sekvenssi kooditti myös seuraavat 7 aminohappoa peptidifragmentista, jonka DNA-sekvenssiä ei käytetty alukerakenteissa. Näin muodoin oli itse asiassa kloonattu oikean proteiinin DNA-sekvenssi.

P. Satunnaispohjustetun koettimen valmistaminen cDNA-seulontaan PCR-tuotetta käyttäen

10 Suoritettiin kaksi pilkkomista 25 µl:n tilavuudessa restriktioentsyymillä *EcoRI* kahdelle 17,5 µl:n erälle puhdistettua pCRII-plasmidia edellä kuvatun mukaisesti. Tuotteet erotettiin 1-%:isessa agarosigeelissä edellä kuvatun mukaisesti ja 750 emäsparin insertti leikattiin aseptisesti irti kahdesta geelivyöhykkeestä. Geelipalat, jotka painoivat 0,65 g, siirrettiin steriiliin 40 ml:n
15 polypropyleeniputkeen, jossa ne puhdistettiin GeneClean II Kit -pakkausta (BIO 101, Inc.) käyttäen. Geelisiivuihin lisättiin 4 ½ tilavuutta NaI-varastoliuosta (2,93 ml). TBE-modifioijaa lisättiin ½ geelitulavuutta (325 µl) ja putken sisältöä inkuboitiin 45 °C:ssa 5 minuutin ajan. Tähän lisättiin 15 µl lasimaitosuspensiota ja inkuboitiin vielä 5 minuutin ajan. Lasimaito/DNA-kompleksi pellettoitiin
20 sentrifugoimalla 10 sekunnin ajan 1 000 rpm nopeudella ja supernatantti poistettiin. Lasimaitopelletti pestiin 3 kertaan 1 ml:lla New Wash -liuosta ja DNA eluoiitiin 50 µl:aan steriiliä vettä. Etidiumbromidilevyvärjäys osoitti DNA-pitoisuudeksi 10 ng/µl.

Satunnaispohjustettu koetin syntetisoitiin 30 ng:sta (3 µl) puhdistettua DNA:ta. 3 µl DNA:ta lisättiin 27 µl:aan steriiliä vettä ja DNA denaturoitiin kumentamalla kiehuavassa vesihauteessa. Tähän 50 µl:n lopputilavuuteen lisättiin valmistajan Promega Corporation Prime-a-Gene Kit -pakkauksen aineosat (10 µl 5x leimauspuskuria, 2 µl ei-leimattuja dNTP:itä [20 µM pitoisuus
25 kutakin dCTP:tä, dGTP:tä, TTP:tä], 2 µl asetyloidun BSA:n 1 mg/ml liuosta, 1 µl Klenow-entsyymin 5 U/µl liuosta) sekä 5 µl [α -³²P]dATP-liuosta (50 µCi, 3 000 Ci/mmol; DuPont NEN), ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Reaktio keskeytettiin lisäämällä 2 µl 0,5 M Na₂EDTA-liuosta (loppupitoisuus 20 mM) ja kumentamalla 2 minuutin ajan kiehuavassa vesihauteessa.
30

Q. Monistetun kirjaston seulominen satunnaispohjustetulla koettimella

Neljä 150 x 15 mm NZY-maljaa, joissa oli noin 50 000 yhdistelmä-DNA-kloonia maljaa kohden, jäähdytettiin 4 °C:seen (maljaus- ja kasvuolosuhteiden osalta katso edellä), ja yhdistelmä-DNA-plakkien nostaminen suoritettiin esiliottamalla ensin 132 mm Magna-nylonsiirtomembraaneja (MSI Corporation) 5x SSC-puskurilla kyllästetyllä kromatografiapaperilla 10 sekunnin ajan. Membraanit sijoitettiin yhdistelmä-DNA-plakit sisältäville maljoille 5 minuutiksi, minkä jälkeen suoritettiin nosto ja sijoitettiin membraanit, faagit sisältävä puoli ylöspäin, 2 minuutiksi kromatografiapaperille, joka oli kyllästetty 0,5 M NaOH- ja 1,5 M NaCl-liuoksilla. Membraanit neutraloitiin siirtämällä ne 5 minuutiksi kromatografiapaperille, joka oli kyllästetty 0,5 M tris-HCl (pH 8,0) ja 1,5 M NaCl-liuoksella. Sitten ne asetettiin 20 sekunniksi kromatografiapaperille, joka oli kyllästetty 2x SCC-puskurilla, 0,2 M tris-HCl (pH 7,5), ja paineltiin sitten imupaperilla kuiviksi. Yhden tunnin ilmakeivauksen jälkeen DNA ristikytettiin membraaneihin altistamalla 12 000 mikrojoulelle UV-säteilyä käyttäen UV Stratalinker 1800 -laitetta (Stratagene Corporation). Neljää membraania esihydridoitiin 65 °C:ssa 2 tunnin ajan 100 ml:n tilavuudessa, joka käsitti 6x SSPE:tä (52,2 g/l NaCl, 8,3 g/l NaH₂PO₄·H₂O, 2,2 g/l Na₂EDTA [pH 7,4]), 5x Denhardtin liuosta (1 g/l Ficoll-valmistetta, 1 g/l polyvinyylipyrrolidonia, 1 g/l BSA:ta [pentax-fraktio V]), 0,5 % SDS:ää ja 100 µg/ml denaturoitua sillinsperma-DNA:ta, Hybrid Mark II -hybridisaatio-uunissa.

Hybridointi suoritettiin 65 °C:ssa 12 tunnin kestoisena 10 ml:n tilavuudessa, joka käsitti 6x SSPE:tä, 0,5 % SDS:ää, 100 µg/ml hienoksi jauhettua/denaturoitua sillinsperma-DNA:ta ja 52 µl edellä kuvattua satunnaispohjustettua koetinta, jonka aktiivisuus oli 15 x 10⁶ dpm/ml. Hybridoinnin päätyttyä koetin poistettiin, ja membraanit pestiin pikaisesti 30 sekunnissa 100 ml:lla 2x SSC:tä 65 °C:ssa, joka sisälsi 0,5 % SDS:ää. Sitten membraaneja pestiin vielä 30 minuutin ajan tuoreella puskurilla, jonka määrä ja pitoisuudet olivat samat. Membraaneja pestiin vielä kahdesti 30 minuutin ajan kulloinkin 65 °C:ssa 100 ml:lla 0,2x SSC:tä, 0,5 % SDS:ää, minkä jälkeen ne käärittiin sellofaaniin ja valotettiin esivalotetulle Fuji RX_{GU}-röntgenfilmille -70 °C:ssa 24 tunnin ajan. Saatiin 15 positiivista kloonia. Nämä plakit noukittiin talteen ja siirrettiin 1 ml:aan SM-puskuria, joka sisälsi 20 µl kloroformia (faagivarastoliuos). Näistä 11 prosessoitiin sekundaari- tai tertiaariseulontaan, kunnes saatiin yksittäisiä plakkeja.

R. Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi-cDNA-kloonien karakterisointi

- Oletettujen xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi-cDNA-kloonien koot määritettiin polymeraasiketjureaktiolla käyttäen alukkeita, jotka ovat homologia kloonausvektorissa esiintyviin ja cDNA:n insertiokohtaa sivuaviin T3- ja T7-promoottoreihin nähden. Polymeraasiketjureaktion olosuhteet olivat edellä kuvatu-
 5 vatun mukaiset paitsi, että sykli oli 35 sykliä 95 °C:ssa 1 minuutin ajan, 50 °C:ssa 1 minuutin ajan ja 72 °C:ssa 2 minuutin ajan. Analyysi suoritettiin elektroforeettisesti agarosigeelissä kuten edellä. Saatuihin kolmeen suurimpaan klooniiin kohdistettiin eksisio *in vivo* sekoittamalla steriilissä putkessa
 10 200 µl yhden plakin faagivastoliuosta 200 µl:aan tuoreita XL1-Blue MRF'-soluja, jotka oli kasvatettu tiheyteen OD₆₀₀ = 1,0. Tähän seokseen lisättiin 1 µl ExAssist-apufagia (Stratagene Corporation) (> 1 x 10⁶ pmy/µl), ja putkia inkuboit-
 15 37 °C:ssa 15 minuutin ajan. Lisättiin 3 ml steriiliä LB-lientä, ja inkubointia jatkettiin 3 tunnin ajan 37 °C:ssa ravistellen. Viljelmiä kuumennettiin 70 °C:ssa vesihauteessa 20 minuutin ajan, minkä jälkeen putkien sisältöä
 20 sentrifugoitiin 1 000 x g:ssä 15 minuutin ajan. 1 ml supernatanttia, joka sisälsi leikatun pBluescript-fagimidin rihmaisena faagipartikkelina pakattuna, siirrettiin steriiliin 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkeen ja varastoitettiin 4 °C:seen varastoliuokseksi. 25 µl varastoliuosta lisättiin 200 µl:aan OD₆₀₀-arvoon 1 kasvatettuja *E.*
 25 *coli* Solar -soluja mikrosentrifugiputkessa. 15 minuutin inkuboinnin 37 °C:ssa jälkeen kyseiset 200 µl soluja maljattiin 100 x 15 mm NZY-agarmaljoihin, joissa kasvualusta sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä. Maljoja inkuboitettiin yön yli 37 °C:ssa, kunnes pesäkkeitä ilmaantui. Yksittäinen pesäke siirrostettiin
 30 10 ml:aan steriiliä LB-lientä, joka sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä, ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa ravistellen. Solut saadusta 10 ml:sta soluviljelmää pelletoitettiin 1,5 ml:n steriilissä mikrosentrifugiputkessa, ja pelletoiduille soluille suoritettiin QIAGEN-plasmidipuhdistus aiemmin kuvatulla tavalla. Puhdistettu plasmidi-DNA uudelleensuspendoitiin 50 µl:aan steriiliä vettä. Automatisoidut DNA-sekventointireaktiot suoritettiin sekoittamalla 8 µl tätä DNA-näytettä (0,8 µg)
 35 4 µl:aan joko T3- tai T7-sekventointialukeliuosta (0,8 pmol/µl). Loput menettelystä oli kuten aiemmin on kuvattu. Kustakin sekventointireaktiosta saatiin noin 350 sekvenssiemästä. Sekvenssi esitetään kuviossa 5. Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin aminohapposekvenssi pääteltynä cDNA:n emässekvenssistä esitetään kuviossa 6.
- Edeltävät esimerkit on esitetty ainoastaan havainnollistamistarkoituksessa eikä niiden tule tulkita rajoittavan hakijan keksinnön suojapiiriä, joka ilmenee oheisista patenttivaatimuksista.

Patenttivaatimukset

1. Oleellisesti puhdas xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi, **tunnettu** siitä, että:

a) xantosiini on metyloitu puriinirenkaan asemassa 7 S-adenosyyli-
5 limetioniinia substraattina käyttäen;

b) se käsittää trypsiinillä pilkkomalla saatuja fragmentteja, joiden aminohapposekvenssit ovat:

(1) Ile, Asn, Tyr, Ala, Ser, Gly, Ala, Ser, Gly,

Ile, Leu, Asp, Gln, Thr; ja
10

(2) Gly, Tyr, Val, Pro, Cys, Tur, Phe, (Thr/Asp)

Phe, Ile, Asp, Asp, Gln, Asp.

2. Oleellisesti puhdas xantosiini-N⁷-metyylitransferaasi, joka koostuu oleellisesti seuraavasta aminohapposekvenssistä:

15 1Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile

14Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala

27Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly

20 40Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn

53Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp

66Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg

25 79Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp

92Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp

105Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly

30 118Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe

131Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile

144Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr

35 157Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu

170Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 183Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 5 209Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 10 235Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile AsnGlu Glu Val
 248Leu Leu Phe Asn Asp Lys LeuLys Pro Leu Val Asp Glu
 261Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val
 15 274Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
 287Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val
 300Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
 20 313Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
 326Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
 339Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu AspAla
 25 352Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
 365His Asp Lys Val Lys Ile Gln.

3. Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin ilmentymistä koodittava oleellisesti puhdas nukleiinihapposekvenssi, joka käsittää seuraavat:

30 a) 1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
 51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
 101 GTGGTTGTCT GTTCTTGAA ACCAATTGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
 151 TTGCTACTTC ATTTTGGAG ACTCACAAGA TGACAATGGC AACAAATATC
 35 201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAATTATC CACCTTACCG CATTGATTTC

251 CCAGAAGGTC CAACTGGTCG CTTACCAAT GGTGAAATC ATGCAGACTT
 301 CATTGGTGAG CTCCTTGGAT TTGACAGCTA CATACTCCA TTGCAAATA
 351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
 401 GGAATCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GCGATCTCT TCAGCTTCAA
 451 CGAACAAATG CACAATCAG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGGTTGA
 501 TTGGAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
 551 GTTGCAATGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
 601 TTATCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTGCC AGCTTGTTAA
 651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGGCAAGA
 701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
 751 ATCTACAGAT GGTAAGTGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
 801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
 851 GGTGCACAAT TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
 901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCAACGTGT
 951 CTGCAGCAGT TGCTGGTGGA CAGTGTATTC CTGGGCAAAT TCCCTGCAGC
 1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
 1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TCGTTATCC TCATTACTTG
 1101 ATGCTGATCC TCTTGCCATT GGCGGCCTAA CAGGCAAAAA CTGTCATGAT
 1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA
 1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AAATCAATG TAATAAACT TGAGAGTCCG
 1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAAACAATA TGTTATCATT
 1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA;

b) DNA-sekvenssejä, jotka hybridoituvat edelliseen DNA-sekvenssiin, jolloin mainitut hybridoituvat sekvenssit koostuvat oleellisesti sekvensseistä, jotka ovat komplementaarisia edelliseen DNA-sekvenssiin nähden;
ja

c) DNA-sekvenssejä, jotka ovat degeneroituneita edellisiin DNA-sekvensseihin nähden.

4. Menetelmä kofeiinittomien kahvipapujen tuottamiseksi, joka menetelmä käsittää:

a) kahvikasvien transformoinnin DNA-sekvenssillä, joka on antisense seuraavaan DNA-sekvenssiin nähden:

5 1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
101 GTGGTTGTCT GTTCTTGAA ACCATTTGCC CTAGGCGAAC AACAGGTCCC
151 TTGCTACTTC ATTTTGGAG ACTCACAAGA TGACAATGGC AACAATAATC
10 201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAATTATC CACCTTACGG CATTGATTTC
251 CCAGAAGGTC CAACTGGTCG CTTACCAAT GGTGAAATC ATGCAGACTT
301 CATTGGTGAG CTCCTGGAT TTGACAGCTA CATACCTCCA TTGCAAATA
351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
15 401 GGAATTCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GCGATCTCT TCAGCTTCAA
451 CGAACAATTG CACAATCAG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGGTTGA
501 TTGGAAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
20 551 GTTGCAITGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTGCC AGCTTGTTAA
651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGCAAGA
701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
25 751 ATCTACAGAT GGTAAGTGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
851 GGTGCACAA TTTTATATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCAACGTGT
30 951 CTGCAGCAGT TGCTGGTGA CAGTGATTC CTGGGCAAAT TCCCTGCAGC
1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TCGTTATCC TCATTACTTG
1101 ATGCTGATCC TCTTGCCATT GGCGGCCTAA CAGGCAAAAA CTGTCATGAT
35 1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA

1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AACTCAATG TAATAAACT TGAGAGTCCG

1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAAACATA TGTATCATT

1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAA AAAAAAAAAA AAAAAA ; ja

5

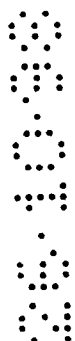
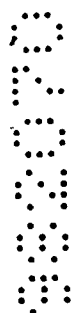
b) otetaan talteen transformoitujen kahvikasvien hedelmät.

5. Menetelmä kofeiinittomien kahvipapujen tuottamiseksi, joka menetelmä käsittää:

10 kahvikasvien transformoinnin DNA-sekvenssillä, joka on antisense DNA-sekvenssiin nähden, joka koodittaa seuraavan sekvenssin ilmentymistä:

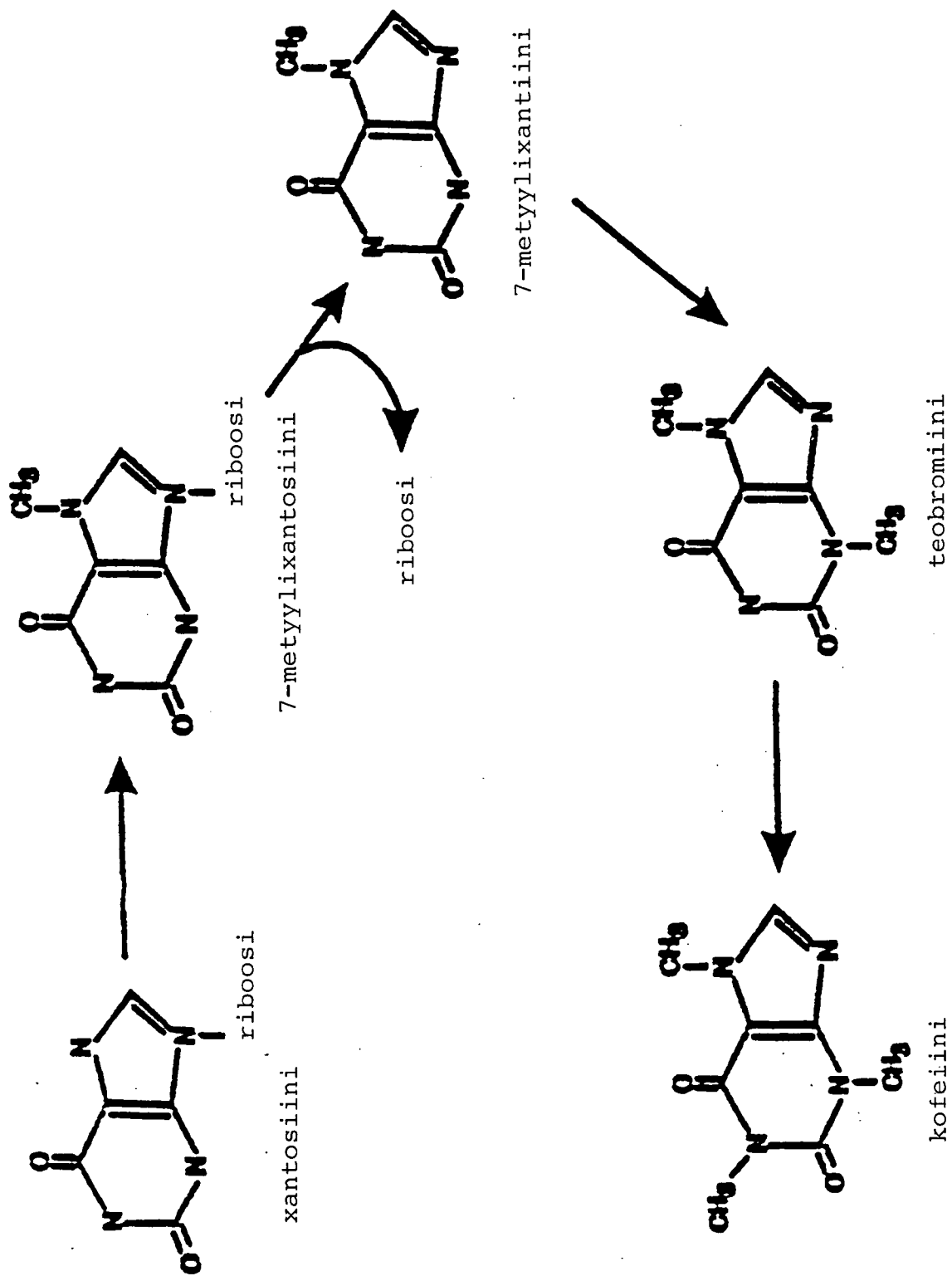
1 Met Ala Phe Val Ala Arg Gln Trp Phe Leu Leu Ser Ile
 14 Ile Asn Val Val Val Val Cys Phe Leu Lys Pro Phe Ala
 27 Leu Gly Glu Gln Gln Val Pro Cys Tyr Phe Ile Phe Gly
 15 40 Asp Ser Gln Asp Asp Asn Gly Asn Asn Asn His Leu Asn
 53 Thr Thr Ala Arg Ala Asn Tyr Pro Pro Tyr Gly Ile Asp
 66 Phe Pro Glu Gly Pro Thr Gly Arg Phe Thr Asn Gly Arg
 79 Asn His Ala Asp Phe Ile Gly Glu Leu Leu Gly Phe Asp
 20 92 Ser Tyr Ile Pro Pro Phe Ala Asn Thr Lys Gly Arg Asp
 105 Ile Thr Lys Gly Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly
 118 Ile Leu Asp Gln Thr Gly Arg His Leu Gly Asp Leu Phe
 131 Ser Phe Asn Glu Gln Leu His Asn His Glu Arg Ala Ile
 25 144 Ser Arg Ile Val Arg Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Thr
 157 Lys Glu Tyr Leu Ala Lys Cys Leu Tyr Thr Val Ala Leu
 170 Gly Asn Asn Asp Tyr Ile Asn Asn Tyr Leu Leu Pro Glu
 30 183 Tyr Tyr Pro Thr Ser His Leu Tyr Thr Pro Arg Glu Phe
 196 Ala Ser Leu Leu Ile Arg His Tyr Ser Gln Gln Leu Arg
 209 Thr Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Arg Lys Ile Ala Val Phe
 222 Gly Leu Gly Trp Leu Gly Cys Ile Pro Ala Glu Leu Ser
 35 235 Thr Asp Gly Asn Cys Val Asp Ser Ile Asn Glu Glu Val
 248 Leu Leu Phe Asn Asp Lys Leu Lys Pro Leu Val Asp Glu
 261 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Gly Ala Gln Phe Leu Tyr Val

274 Asp Val Ile Ala Ile Asn Leu Asn Asn Leu Ser Thr Pro
287 Ala Glu Ile Thr Ile Gly Asn Ala Pro Cys Cys Asn Val
300 Ser Ala Ala Val Ala Gly Gly Gln Cys Ile Pro Gly Gln
5 313 Ile Pro Cys Ser Asn Arg Asn Gln Tyr Tyr Phe Trp Asp
326 Asp Phe His Pro Ser Glu Val Val Asn Glu Ala Tyr Ser
339 Arg Leu Ala Tyr Ser Ala Leu Ser Ser Leu Leu Asp Ala
352 Asp Pro Leu Ala Ile Gly Gly Leu Thr Gly Lys Asn Cys
10 365 His Asp Lys Val Lys Ile Gln.





Kuvio 1. Kofeiinin biosynteesireitti



Kuvio 2.

Puhdistetun xantosiini-N⁷-metyylitransferaasin
polyakryyliamidigeeli

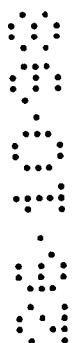
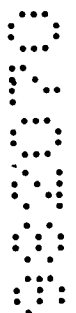
94 kD •

67 kD •

43 kD • 

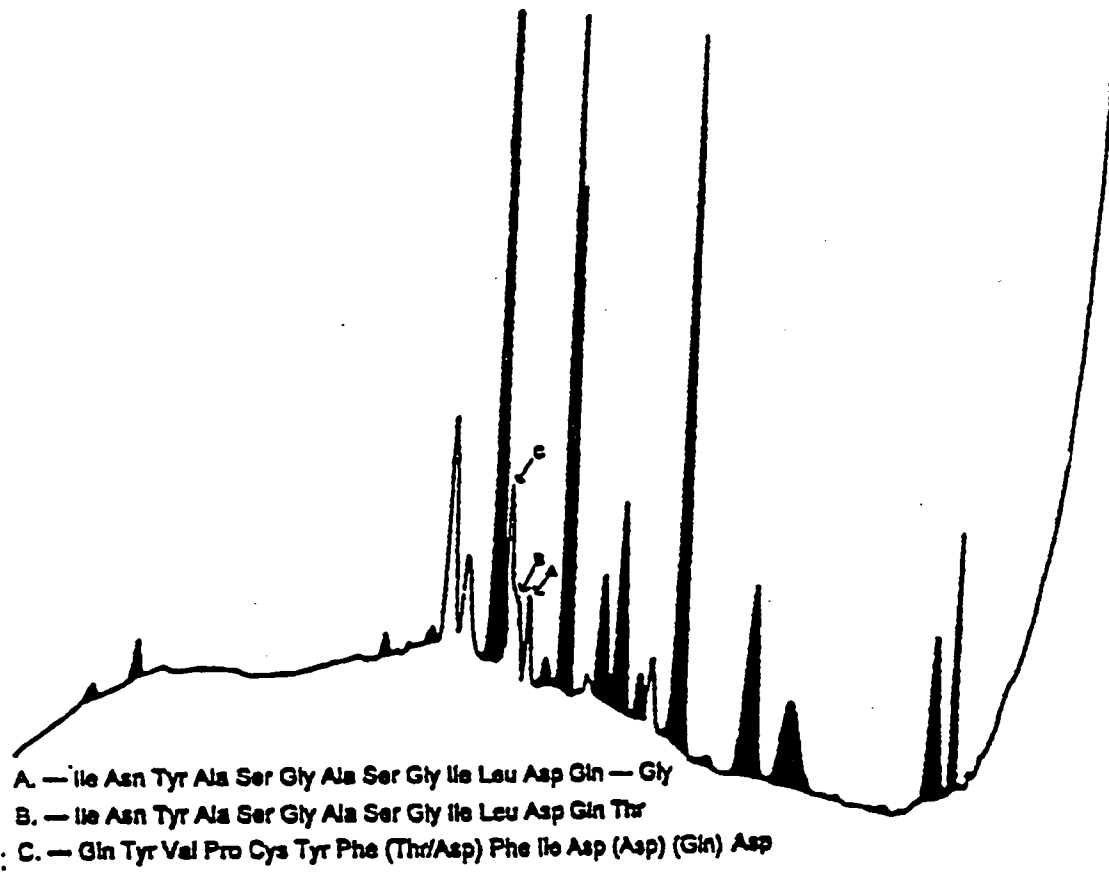
30 kD •

14,4 kD •



Kuvio 3.

Xantosiini-N⁷-metyylitransferaasia trypsiinillä pilkkomalla
saatujen fragmenttien erottaminen HPLC:llä



Kuvio 4.

Oligonukleotidisynteesi peptideistä

Fragmentti A — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln — Gly

Fragmentti B — Ile Asn Tyr Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Leu Asp Gln Thr

Aluke 1 5'AT^C AA^C TA^C GCI TCI GGI GC

Aluke 2 5'AT^C AA^C TA^C GCI AG^C GGI GC

Aluke 3 3TAI TT^G AT^G CGI AGI CCI GC

Aluke 4 3TAI TT^G AT^G CGI TC^G CCI GC

Fragmentti C — Gln Tyr Val Pro Cys Tyr Phe^{Thr} Phe Ile Asp (Asp) (Gln) Asp
Asp

Aluke 5 5'CA^G TAT GTI CCI TGT TAT TT

Aluke 5 3'GTT AT^G CAI GGI AC^G AT^G AA

1 CCTCTGACTT GCTAAACCTA CCATTACCTT TTTCTTCTTG TCATCTGCAT
51 TCATGGCTTT TGTAGCCAGG CAATGGTTTC TCCTATCCAT CATTAAATGTA
101 GTGGTTGTCT GTTTCTTGAA ACCATTTGCC CTAGGCCAAC AACAGGTCCC
151 TTGCTACTTC ATTTTTGGAG ACTCACAAGA TGACAATGGC AACATAATC
201 ACCTGAACAC CACTGCCAGG GCAAATTATC CACCTTACGG CATTGATTTT
251 CCAGAAGGTC CAACTGGTCG CTTACCAAT GGTGAAATC ATGCAGACTT
301 CATTGGTGAG CTCCTTGGAT TTGACAGCTA CATACCTCCA TTTGCAAATA
351 CAAAAGGCCG GGATATCACT AAAGGCATTA ATTATGCTTC GGGAGCATCT
401 GGAATTCTTG ATCAGACCGG TCGTCACCTG GCGATCTCT TCAGCTTCAA
451 CGAACAATTG CACAATCAG AGAGAGCAAT TTCGCGCATC GTGCGTTGA
501 TTGGAAACAG ATCTGCAACA AAAGAATATC TAGCCAAATG TCTGTACACT
551 GTTGCATTGG GGAATAATGA TTACATCAAC AACTACTTGT TGCCAGAATA
601 TTATCCTACC AGCCACCTAT ATACTCCAAG AGAATTTGCC AGCTTGTTAA
651 TTAGGCATTA TTCTCAGCAA CTACGGACTT TGTACAGATT GGGGGCAAGA
701 AAAATAGCCG TTTTGGGCT TGGTTGGCTT GGCTGCATAC CTGCTGAGTT
751 ATCTACAGAT GGTAAGTGTG TGGATTCTAT TAACGAGGAA GTTCTGTTAT
801 TCAATGACAA GCTCAAGCCA CTGGTTGATG AACTGAATAC CGAGTTAAGC
851 GGTGCACAAT TTCTTTATGT AGATGTGATA GCAATCAATT TGAACAATTT
901 ATCCACCCCT GCAGAAATTA CAATTGGCAA TGCACCATGC TGCAACGTGT
951 CTGCAGCAGT TGCTGGTGGA CAGTGTATTC CTGGGCAAAT TCCCTGCAGC
1001 AACAGGAACC AATATTATTT TTGGGATGAT TTCCATCCCA GTGAAGTAGT
1051 CAATGAAGCA TATTCAAGAT TAGCATATTC TCGTTATCC TCATTACTTG
1101 ATGCTGATCC TCTTGCCATT GCGGCCTAA CAGGCAAAAA CTGTCATGAT
1151 AAAGTGAAGA TACAATAGAC TGTATCTATG TGTCCCATGA TATTTCTATA
1201 TTCCAAGTTT CCGACAAGTC AACTCAATG TAATAAACT TGAGAGTCCG
1251 AATGTGCTAG TGTGATGTTA TCTCCTCAAT GGAAACAATA TGTTATCATT
1301 AATCTCAGAC TATTTATAAT TACTATTAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

6/6

Kuvio 6

1	Met	Ala	Phe	Val	Ala	Arg	Gln	Trp	Phe	Leu	Leu	Ser	Ile
14	Ile	Asn	Val	Val	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Lys	Pro	Phe	Ala
27	Leu	Gly	Glu	Gln	Gln	Val	Pro	Cys	Tyr	Phe	Ile	Phe	Gly
40	Asp	Ser	Gln	Asp	Asp	Asn	Gly	Asn	Asn	Asn	His	Leu	Asn
53	Thr	Thr	Ala	Arg	Ala	Asn	Tyr	Pro	Pro	Tyr	Gly	Ile	Asp
66	Phe	Pro	Glu	Gly	Pro	Thr	Gly	Arg	Phe	Thr	Asn	Gly	Arg
79	Asn	His	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Glu	Leu	Leu	Gly	Phe	Asp
92	Ser	Tyr	Ile	Pro	Pro	Phe	Ala	Asn	Thr	Lys	Gly	Arg	Asp
105	Ile	Thr	Lys	Gly	Ile	Asn	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly
118	Ile	Leu	Asp	Gln	Thr	Gly	Arg	His	Leu	Gly	Asp	Leu	Phe
131	Ser	Phe	Asn	Glu	Gln	Leu	His	Asn	His	Glu	Arg	Ala	Ile
144	Ser	Arg	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	Ala	Thr
157	Lys	Glu	Tyr	Leu	Ala	Lys	Cys	Leu	Tyr	Thr	Val	Ala	Leu
170	Gly	Asn	Asn	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Leu	Leu	Pro	Glu
183	Tyr	Tyr	Pro	Thr	Ser	His	Leu	Tyr	Thr	Pro	Arg	Glu	Phe
196	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Arg	His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Arg
209	Thr	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Lys	Ile	Ala	Val	Phe
222	Gly	Leu	Gly	Trp	Leu	Gly	Cys	Ile	Pro	Ala	Glu	Leu	Ser
235	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Val	Asp	Ser	Ile	Asn	Glu	Glu	Val
248	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Lys	Leu	Lys	Pro	Leu	Val	Asp	Glu
261	Leu	Asn	Thr	Glu	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Phe	Leu	Tyr	Val
274	Asp	Val	Ile	Ala	Ile	Asn	Leu	Asn	Asn	Leu	Ser	Thr	Pro
287	Ala	Glu	Ile	Thr	Ile	Gly	Asn	Ala	Pro	Cys	Cys	Asn	Val
300	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Gln	Cys	Ile	Pro	Gly	Gln
313	Ile	Pro	Cys	Ser	Asn	Arg	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Asp
326	Asp	Phe	His	Pro	Ser	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser
339	Arg	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala
352	Asp	Pro	Leu	Ala	Ile	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Lys	Asn	Cys
365	His	Asp	Lys	Val	Lys	Ile	Gln						