

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 840105 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 840105

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/00

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 12.01.1984

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 12.01.1984

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 19.07.1984

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

18.01.1983 US 458803

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kovacevic, Steven, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Miller, James Robert, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Fayerman, Jeffery Tobin, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Richardson, Mark Alan, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä homologisen Bacillus- promoottorin ja yhdistetyn luonnon tai modifioitun, ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin käyttö Streptomyces:ssä.

Förfarande för användning av en homolog Bacillus promotor och en förenad naturlig eller modifierad DNA-sekvens, som innehåller ribosombindningsställe, i Streptomyces.

Menetelmä homologisen Bacillus-promoottorin ja yhdistetyn luonnon tai modifioidun, ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin käyttö Streptomyces:essä

5 Keksinnön kohteena on menetelmä homologisen Bacillus-promoottorin ja yhdistetyn luonnon tai modifioidun, ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin käyttö funktionaalisen polypeptidin ekspressoimiseksi Streptomyces:essä. Keksinnön kohteena ovat edelleen transformantit, jotka
10 tarvitaan edellä mainitun menetelmän käyttämiseksi.

Tämä keksintö antaa menetelmän funktionaalisten polypeptidien ekspressoimiseksi Streptomyces-isäntäsoluissa yhdistelmä-DNA-teknologian avulla. Tähän asti yhdistelmä-DNA-teknologian kehittäminen ja hyväksikäyttö Strepto-
15 myces:essä on hidastunut ja tehty erityisen vaikeaksi, mikä johtuu sopivien kloonauk- ja ekspressoimisvektoreiden yleisestä puutteesta. Tämä ekspressoimisvektoreiden harvakuisuus selittyy osaksi saatujen vieraiden transkriptio- ja translaatioaloitussignaalien tunnistamisen puutteesta
20 Streptomyces:essä. Niinmuodoin hyvin tunnettua trp-(Hallewell, R. A. ja S. Emtage, 1980, Gene 9:27), lac-(Guarante, L. et al., 1980, Cell 20:543 ja Roberts, T. M. et al., 1979, Proc. Nat. Acad. Sci USA 76:5596), lpp-(Lee, N. et al., 1981, J. of Bacteriol. 146:861;
25 Zwiebel, L. J. et al., 1981, J. of Bacteriol. 145:654 ja Natamura, K. ja M. Inouye, 1979, Cell 18:1109) ja Bacteriophage λ_{P_L} -(Derom, C. et al., 1982, Gene 17:45; Remaut, E. et al., 1981, Gene 15(1):81 ja Bernard, H. et al., 1979, Gene 5:59) transkriptiota ja translaatiota
30 ohjaavat promoottorisysteemit eivät ole toiminnallisia Streptomyces:essä. Siten joitakin vieraita ja käytännöllisesti ei ollenkaan eukaryoottisia geenejä on ekspressoitu Streptomyces-isäntäsystemissä.

Streptomyceksen äärimmäisen rajoitettu kyky tunnistaa vieraita transkriptio- ja translaatio-signaaleja tekee
35 välttämättömäksi vaihtoehtoisten tunnistettavien signaalien

kehittämisen. Niinmuodoin rakenneltiin *Bacillus subtilis*-promoottori- ja translaatiosignaalin sisältävä sekvenssi ja sen tiettyjä muunnoksia olemaan käyttökelpoisia itse-asiassa minkä tahansa polypeptidin ekspressoitumisen ohjaamiseksi *Streptomyces*:essä. Tämä menetelmä polypeptidien ekspressoimiseksi *Streptomyces*:essä edustaa merkittävää edistymistä ja etua tekniikan alalla ja laajentaa suuresti yhdistelmä-DNA-teknologian käyttöä gram-positiivisissa mikro-organismeissa.

10 Geenikloonaus ja tuotteiden ekspressointi *Streptomyces*:essä ovat erittäin edullisia, koska organismi on pääasiallisesti ei-patogeeninen eikä tavallisesti tuota endotoksiineja. Lisäksi *Streptomyces*'tä on tutkittu laajasti ja on hyvin tunnettu ja ymmärretty antibiootti- ja fermentointiteollisuuksissa. Tämä menetelmä ja siihen liittyvät ekspressoimisvektorit ja transformantit ovat erityisen tärkeitä, koska ne sallivat näiden tärkeiden etujen kaupallisen hyväksikäytön.

Tämän keksinnön, kuten tässä selitetään ja vaaditaan, 20 tarkoituksia varten määritellään seuraavat termit seuraavasti.

Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori - mikä tahansa itsenäisesti replikoituva aine, joka käsittää, mutta rajoittumatta niihin, plasmideja, jotka käsittävät DNA-molekyylin, johon yksi tai useampia DNA-lisäsegmenttejä voidaan 25 lisätä tai on lisätty.

Transformointi - DNA:n tuominen vastaanottaja-isäntäsoluun, mikä muuttaa genotyyppin ja mistä sitten on seurauksena muutos vastaanottajasolussa.

30 Transformantti - vastaanottaja-isäntäsolu, jossa on tapahtunut transformointi.

Pilkontaosanen - kokonainen plasmidi tai kromosomaalinen DNA tai niiden lineaarinen osa, joka on kehitetty yhden tai useampien restriktioentsyymien toiminnalla.

35 Funktionaalinen polypeptidi - talteenotettava bioaktiivinen kokonaan heterologinen polypeptidi tai prekursori,

talteenotettava bioaktiivinen polypeptidi, joka sisältää heterologisen polypeptidin ja homologisen polypeptidin kokonaisena tai sen osan, tai talteenotettava bioinaktiivinen yhdistynyt polypeptidi, joka sisältää heterologisen polypeptidin ja bioinaktiivisen homologisen polypeptidin, joka voidaan spesifisesti lohkaista.

Yhdistynyt geenituote - talteenotettava heterologinen polypeptidi, joka on yhdistynyt kokonaisen homologisen polypeptidin tai sen osan kanssa.

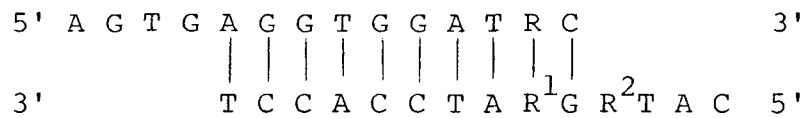
10 Insertionaalinen isomeeri - yksi kahdesta tai useammasta mahdollisesta yhdistelmä-DNA-molekyylistä, jotka ovat muodostuneet, kun DNA-osan insertoidaan yhteen kahdesta tai useammasta yhteensopivasta kohdasta vastaanottaja-DNA:lla.

15 Tämä keksintö on menetelmä funktionaalisen polypeptidin ekspressoimiseksi Streptomyces:essä ja se käsittää Streptomyces-isäntäsolun transformoimisen yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorilla, joka vektori käsittää

- 1) homologisen Bacillus-promoottorin,
- 20 2) luonnossa esiintyvän tai modifioidun Bacilluksen ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin ja
- 3) geenin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, ja tätä transformoitua Streptomyces-solua viljellään kasvuolosuhteissa, niillä rajoituksilla, että tämä vektori
- 25 replikoituu ja on valikoitavissa transformoidussa Streptomyces-solussa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi ohjaavat tämän geenin transkriptiota ja ekspressoitumista transformoidussa Streptomyces-isäntäsolussa. Keksintö käsittää edelleen transformantit, jotka tarvitaan edellä mainitun menetelmän käyttämiseksi.

30 Erityisesti tämän keksinnön edellä mainitusta menetelmästä annetaan esimerkki transformoimalla Streptomyces-isäntäsolu yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorilla, joka käsittää

- 35 1) ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin:



jossa

- 5 A on deoksiadenyyli,
 G on deoksiguanyyli,
 C on deoksisytosyyli,
 T on tymidyyli,
 R on G tai C,
 10 R¹ on G tai C, ja
 R² on G tai T,
 2) Bacillus subtiliksen veg-promoottorin ja
 3) geenin, joka koodaa funktionaalista polypepti-
 diä, ja viljelemällä tätä transformoitua Streptomyces-solua
 15 kasvuolosuhteissa, sillä lisärajoituksella, että (1) R ja
 R¹ eivät samanaikaisesti ole sama deoksiribonukleotidi,
 ja (2) kun R² on T, silloin R on G ja R¹ on C.
- Ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi,
 jossa R ja R¹ ovat G tai C, jossa R² on G ja johon veg-
 20 promoottori ja geeni ovat liittyneet, voidaan syntetisoida
 tavanomaiseen tapaan modifioidulla fosfotriesteri-menetel-
 mällä käyttäen täysin suojattuja trideoksiribonukleotidi-
 rakenneryhmiä, pääasiallisesti Itakura'n et al., 1977,
 Science 198:1056 ja Crea'n et al., 1978, Proc. Nat. Acad.
 25 Sci. USA 75:5765 menetelmien mukaisesti. veg-Promoottori
 voidaan joko syntetisoida suoraan tai saada plasmidin
 pMS480 EcoRI-SfaNI-uutolla. Syntynyt n. 0,38 kb:n EcoRI-
 SfaNI-osanen sisältää veg-promoottorin sekä myös lisä-
 deoksiribonukleotidejä koodaavan säikeen 5'-päässä (EcoRI-
 30 komplementaarisen pään vieressä). veg-Promoottorin ja
 ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi, jossa R²
 on T voidaan saada plasmidin pMS480 EcoRI-BamHI-uutolla.
 Syntynyt n. 0,48 kb:n EcoRI-BamHI-osanen sisältää edellä
 mainitut lisä-deoksiribonukleotidit sekä myös deoksiribo-
 35 nukleotidit koodausrihman 3'-päässä, jotka koodaavat homolo-
 gisen Bacillus subtilis-polypeptidin osaa. Plasmidi pMS480

käsittää n. 4,8 kb ja voidaan eristää tavanomaisesti E. coli Kl2 JA221/pMS480:sta, kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa plasmidin pMS480 edullisena lähteenä ja varastosäiliönä saantinumeroilla NRRL B-15258.

Mukavuuden ja rakentamisen helppouden kannalta veg-promoottori saatiin plasmidin pMS480 EcoRI-SfaNI-uutolla. Saatu osanen liitettiin sitten edellä kuvattuun ribosomin sitomiskohdan sisältävään DNA-sekvenssiin, jossa R ja R¹ ovat G tai C ja jossa R² on G. Tämä sekvenssi suunniteltiin sisältämään SfaNI- ja NcoI-komplementaariset päät. Sekvenssi sallii siten polypeptidin suoran ekspressoimisen sen jälkeen, kun siihen on samanaikaisesti liitetty sekä NcoI-pilkottu geeni että edellä mainittu n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-veg-promoottorin sisältävä osanen. Suora ekspressoituminen tapahtuu, koska NcoI-komplementaaristen päiden liittäminen palauttaa NcoI-pilkotun geenin ATG-translaationaalisen aloituskolmikon. Synteettinen sekvenssi on sen tähden hyödyllinen minkä tahansa geenin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, yleistä suoraa ekspressoimista varten Streptomyces:essä Bacillus subtilis-veg-promoottorin säätelyn alaisena.

Vaikka geenit, jotka luonnostaan sisältävät NcoI-kohdan translaation aloituskohdassa, ovat edullisia, voidaan käyttää myös geenejä, joista tällaiset kohdat puuttuvat. Jälkimmäisessä tapauksessa geeni voidaan pilkkoa restriktioentsyymillä ja sitten rekonstruoida synteettisesti (Itakura et al., 1977 ja Crea et al., 1978), niin että se sisältää halutun NcoI-komplementaarisen pään. Vaihtoehtoisesti, riippuen rakentelun mukavuudesta ja helppoudesta, modifioitu geeni voi olla kokonaan synteettinen. Kummassakin tapauksessa modifioitu geeni voidaan liittää edellä mainitun ribosomin sitomiskohdan sisältävän sekvenssin NcoI-komplementaariseen päähän palauttaen siten ATG-metioniinia

koodaava aloituskolmikko ja sallien siten halutun tuotteen suora ekspressoituminen *Streptomyces*:essä.

Funktionaalista polypeptidiä koodaavan geenin liittäminen n. 0,48 kb:n EcoRI-BamHI-osasen BamHI-pilkontakohdassa sallii yhdistetyn geenituotteen ekspressoimisen. Vaikka geenit, jotka luonnostaan sisältävät BamHI-kohdan translationaalisessa aloituspisteessä tai sen lähellä, ovat edullisia, voidaan käyttää myös geenejä, joista tällaiset kohdat puuttuvat. Jälkimmäisessä tapauksessa geeni voidaan pilkkoa restriktioentsyymillä ja sitten rekonstruoida synteettisesti niin, että se sisältää halutun BamHI-komplementaarisen pään.

Tämä menetelmä funktionaalisen polypeptidin ekspressoimiseksi *Streptomyces*:ssä edustaa merkittävää teknistä edistystä. Edellä mainittua *Bacillus*-promoottoria ja ribomin sitomiskohdan sisältävää DNA-sekvenssiä voidaan käyttää minkä tahansa polypeptidiä koodaavan geenin yleisekspressoimista varten *Streptomyces*:ssä.

Tätä keksintöä kuvaavia ekspressoimisvektoreita rakennettiin liittämällä plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-osanen, pre-proinsuliini-plasmidin pOW601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osanen ja edellä mainittu ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi. Syntynyt plasmidi, joka on nimitetty pOW10:ksi, on funktionaalinen *E. coli*:ssa ja sisältää funktionaalista polypeptidiä koodaavan geenin translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin kanssa. Plasmidi pOW10 on erityisen käyttökelpoinen ekspressoimisvektoreiden rakentamiseksi, jotka ovat funktionaalisia *Streptomyces*:essä ja siten tätä menetelmää kuvaavia.

Plasmidi pOW601, jota käytetään lähtöaineena plasmidin pOW10 rakentamista varten, käsittää n. 4,4 kb ja voidaan tavanomaisesti eristää *E. coli* K12 JA221/pOW601:stä, kannasta, joka on talletettu ja muodostaa osan pysyvästä varastoviljelykokoelmasta laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa edullisena plasmidin lähteenä ja varastosäilönä

saantinumerolla NRRL B-15259.

Kuvaavia vektoreita, jotka ovat funktionaalisia *Streptomyces*:essä, rakennetaan liittämällä EcoRI-uutettu plasmidi pOW10 EcoRI-uutettuun plasmidiin pBS1. EcoRI-
 5 uutetun plasmidin pOW10 liittämisestä EcoRI-uutettuun plasmidiin pBS1 on tuloksena kuvaavat n. 12,8 kb:n plasmidit pOW527 ja pOW528. Plasmidi pBS1 rakennetaan liittämällä plasmidin pHI-18 n. 3,9 kb:n BamHI-osanen plasmidin pEL105 n. 4,4 kb:n BamHI-osaseen. Plasmidi pHI-18 käsit-
 10 tää n. 3,9 kb ja sisältää klooriamfenikoli-resistenssi-geenin sekä myös replikaation aloituskohdan, joka on funktionaalinen *Bacillus*issa. Plasmidi pHI-18 rakennetaan plasmidin pHI-16 n. 0,7 kb:n HpaII-deleetiolla. Jälkimmäinen plasmidi on tunnetun kimeerisen plasmidin pBD12
 15 in vivo-deleetio (esittänyt Gryczan et al., 1980, *J. Bacteriology* 141(1):246), joka voidaan tavanomaisesti eristää *Bacillus subtilis* MI112/pHI-16:sta, rakennetusta kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional
 20 Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa plasmidin edullisena lähteenä ja varastosäilönä saantinumerolla NRRL B-12597. Plasmidi pEL105 rakennetaan liittämällä plasmidin pLR2 (rakennettu liittämällä HindIII-uutettu plasmidi pIJ6 (esittänyt Thompson et al.,
 25 1980, *Nature* 286:525) ja HindIII-uutettu plasmidi pBR322) n. 1,6 kb:n BamHI-osanen plasmidin pEL103 n. 2,8 kb:n BamHI-osaseen. Jälkimmäinen plasmidi voidaan eristää tavanomaisesti *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103:sta, kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää va-
 30 rastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on saatavissa plasmidin edullisena lähteenä ja varastosäilönä saantinumerolla NRRL 12549. Kummankin plasmidin pOW527 ja pOW528 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piir-
 35 rosten kuvassa 1.

Plasmidit pOW527 ja pOW528 ovat funktionaalisia

Streptomyces:essä, käsittävät funktionaalisen pre-proinsuliinia koodaavan geenin translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin ja ribosomin sitomiskohdan sisältävän synteettisen DNA-sekvenssin kanssa, jossa R on G, R¹ on C ja R² on G, ja ovat siten käyttökelpoinen esimerkki tästä keksinnöstä. Muita käyttökelpoisia vektoreita esimerkkeinä tästä keksinnöstä rakennettiin 1) uuttamalla plasmidia pOW10 NcoI- ja plasmidia pMC1403 BamHI-restriktioentsyymillä; 2) täyttämällä syntyneet komplementaariset päät DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla; 3) uuttamalla täytettyjä osasia EcoRI-restriktioentsyymillä ja 4) liittämällä syntyneet kaksi osasta vastaavista EcoRI- ja tylypistä päistään. Plasmidi pMC1403, jota käytetään lähtöaineena näitä rakenteluja varten, käsittää n. 9,9 kilobäistä ja sisältää osan lacZ-geenistä. Plasmidi voidaan eristää tavanomaisesti E. coli K12 BE904/pMC1403:sta, kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa plasmidin edullisena lähteenä ja varastosäilönä saantinumeroilla NRRL B-15213. Edellä mainittu liitانتä palauttaa sekä NcoI- että BamHI-pilkontakohdat ja siitä on siten seurauksena plasmidi, joka on nimetty plasmidiksi pOW303, joka sisältää osan lacZ-geenistä translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin ja ribosomin sitomiskohdan sisältävän synteettisen DNA-sekvenssin kanssa.

Plasmidia pOW303 uutettiin EcoRI-restriktioentsyymillä ja liitettiin EcoRI-uutettuun plasmidiin pBS1 antamaan kuvaavat plasmidit pOW529 ja pOW530. Plasmidit pOW529 ja pOW530 ovat funktionaalisia Streptomyces:essä, käsittävät funktionaalista polypeptidiä koodaavan geenin translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin ja edellä mainitun DNA-sekvenssin kanssa, jossa R on G, R¹ on C ja R² on G ja ovat siten edullisia tämän keksinnön edelleen valaisemiseksi. Edellä mainittujen

vektoreiden isäntäsoluille antamaa β -galaktosidaasi-aktiivisuutta voidaan käyttää valikoitavana merkitsijänä tehden vektorit yleisesti käyttökelpoisiksi molekyylikloonausta varten. Plasmidien pOW529 ja pOW530
 5 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

Plasmidit pOW539 ja pOW540 rakennettiin yhdistetyn geenituotteen ekspressoimisen valaisemiseksi Streptomyces:essä homologisen Bacillus-promoottorin ja
 10 luonnossa esiintyvän Bacilluksen ribosomin sitomiskohdan säätelyn alaisena. Siten plasmidin pMS480 edellä mainittu n. 0,48 kb:n EcoRI-BamHI-osanen liitettiin plasmidin pMC1403 n. 9,9 kb:n EcoRI-BamHI-osaseen, mistä syntyi plasmidi pOW301. Jälkimmäinen plasmidi BamHI-uutet-
 15 tiin, käsiteltiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-osasella ja liitettiin sitten antamaan plasmidi pOW302. Plasmidi pOW302 on funktionaalinen E. colissa ja käsittää lacZ-geenin osan translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin, luonnossa esiintyvän ribosomin sitomiskoh-
 20 dan ja osan kanssa geenistä, joka koodaa homologista Bacillus subtilis-polypeptidiä. Plasmidi pOW302 EcoRI-uutettiin sitten ja liitettiin samalla tavalla uutettuun plasmidiin pBS1. Syntyneet rakenteet, joita tässä nimitetään plasmideiksi pOW539 ja pOW540, ekspressoivat yhdis-
 25 tetyn geenituotteen, joka antaa β -galaktosidaasi-aktiivisuuden Streptomyces:essä, ja ovat siten käyttökelpoisia esimerkkeinä tästä keksinnöstä. β -galaktosidaasi-aktiivisuutta voidaan käyttää valikoitavana merkitsijänä, tehden vektorit yleisesti käyttökelpoisiksi molekyyli-
 30 kloonausta varten. Kummankin plasmidin pOW539 ja pOW540 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 3.

Tämä menetelmä on erityisen monipuolinen ja sitä voidaan käyttää minkä tahansa polypeptidin, jota voi koo-
 35 data geeni-yhdistelmä-DNA-kloonausvektorissa, tuotantoon Streptomyces:essä. Eräs edullinen yhdistelmä-DNA-kloonaus-

vektori on plasmidi, vaikka voidaan käyttää myös bakteriofaagia ja muita vektoreita kuten alaan perehtyneille on selvää. Kuvaavan pre-proinsuliinin ja lacZ-geenien lisäksi ovat muita geenejä, joita voidaan käyttää, geenit, joita esiintyy luonnossa, geenit, joita ei esiinny luonnossa sekä geenit, jotka ovat osaksi luonnossa esiintyviä ja osaksi synteettisiä tai ei-luonnossa esiintyviä. Erityisesti nämä geenit voivat koodata ihmisen proinsuliinia, ihmisen insuliini A-ketjua, ihmisen insuliini B-ketjua, ei-ihmis-insuliinia, ihmisen kasvuhormonia, ei-ihmis-kasvuhormonia, naudan kasvuhormonia, sian kasvuhormonia, ihmisen interferonia, ei-ihmis-interferonia, virusantigeeniä, urokinaasia, jotakin peptidihormonia, jotakin entsyymiä tai itse asiassa mitä tahansa muuta polypeptidiä, jolla on tutkimusarvoa tai kaupallista arvoa.

Tämä menetelmä funktionaalisen polypeptidin ekspressoimiseksi *Streptomyces*:essä ei rajoitu *Streptomyces*:en yhteen ainoaan lajiin tai kantaan. Päinvastoin, tämä keksintö on laajalti käyttökelpoinen ja sitä voidaan käyttää monien *Streptomyces*-ryhmien isäntäsoluihin, erityisesti niiden ei-pilkkoviin kantoihin. Ei-pilkkovat kannat ovat helposti valikoitavissa ja eristettävissä *Streptomyces*-luokista alalla hyvin tunnetuin tavantomaisin menetelmin (Lomovskaya et al., 1980, *Microbiological Reviews* 44:206). Ei-pilkkovien kantojen isäntäsoluilta puuttuvat restriktioentsyymit ja siten ne eivät leikkaa tai hajota DNA:ta transformoinnin jälkeen. Tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten pidetään isäntäsoluja, jotka sisältävät restriktioentsyymejä, jotka eivät leikkaa yhtäkään pilkontakohdista vektoreissa, jotka ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön kuvaamiseksi, myös ei-pilkkovina.

Streptomyces-luokkien ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat aminoglykosidi-antibiootteja ja joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja joissa

- se on erityisen käyttökelpoinen, ovat esimerkiksi lajien *S. kanamyceticus* (kanamysiinit), *S. chrestomyceticus* (aminosidiini), *S. griseoflavus* (antibiootti MA 1267), *S. microsporeus* (antibiootti SF-767), *S. ribosidificus* (antibiootti SF-733), *S. flavopersicus* (spektinomysiini), *S. spectabilis* (aktinospektasiini), *S. rimosus* forma *paromomycinus* (paromomysiinit, katenuliini), *S. fradiae* var. *italicus* (aminosidiini), *S. bluensis* var. *bluensis* (bluensomysiini), *S. catenulae* (katenuliini),
- 10 *S. olivoreticuli* var. *cellulophilus* (destomysiini A), *S. tenebrarius* (tobramysiini, apramysiini), *S. lavendulae* (neomysiini), *S. albogriseolus* (neomysiinit), *S. albus* var. *metamycinus* (metamysiini), *S. hygroscopicus* var. *sagamiensis* (spektinomysiini), *S. bikiniensis* (streptomysiini), *S. griseus* (streptomysiini), *S. erythrochromogenes* var. *narutoensis* (streptomysiini), *S. poolensis* (streptomysiini), *S. galbus* (streptomysiini), *S. rameus* (streptomysiini), *S. olivaceus* (streptomysiini), *S. mashuensis* (streptomysiini), *S. hygroscopicus* var.
- 20 *limoneus* (validamysiinit), *S. rimofaciens* (destomysiinit), *S. hygroscopicus* forma *glebosus* (glebomysiini), *S. fradiae* (hybrimysiinit, neomysiinit), *S. eurocidicus* (antibiootti Al6316-C), *S. aquacanus* (N-metyyli-hygromysiini B), *S. crystallinus* (hygromysiini A), *S. noboritoensis* (hygromysiini), *S. hygroscopicus* (hygromysiinit), *S. atrofaciens* (hygromysiini), *S. kasugaspinus* (kasugamysiinit), *S. kasugaensis* (kasugamysiinit) *S. netropsis* (antibiootti LL-AM31), *S. lividus* (lividomysiinit), *S. hofuensis* (seldomysiini kompleks), ja *S. canus* (ribosyyli paromamiini)
- 30 ei-pilkkovat solut.

- Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat makrolidi-antibiootteja ja joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja on erityisen käyttökelpoinen, ovat esimerkiksi lajien
- 35 *S. caelestis* (antibiootti M188), *S. platensis* (platenomysiini), *S. rochei* var. *volubilis* (antibiootti T2636),

- S. venezuelae* (metymysiinit), *S. griseofuscus* (bundliini),
S. narbonensis (josamysiini, narbomysiini), *S. fungicidicus*
 (antibiootti NA-181), *S. griseofaciens* (antibiootti
 PA133A, B), *S. roseocitreus* (albosykliini), *S. bruneogriseus*
 5 (albosykliini), *S. roseochromogenes* (albosykliini),
S. cinerochromogenes (sineromysiini B), *S. albus* (albo-
 mysetiini), *S. felleus* (argomysiini, pikromysiini),
S. rochei (lankasidiini, borrelidiini), *S. violaceoniger*
 (lankasidiini), *S. griseus* (borrelidiini), *S. maizeus*
 10 (ingramysiini), *S. albus* var. *coilmyceticus* (koleimysii-
 ni), *S. mycarofaciens* (asetyyllileukomysiini, espinomysii-
 ni), *S. hygrosopicus* (turimysiini, relomysiini, marido-
 mysiini, tylosiini, karbomysiini), *S. griseospiralis*
 (relomysiini), *S. lavendulae* (aldgamysiini), *S. rimosus*
 15 (neutramysiini), *S. deltae* (deltamysiinit), *S. fungicidicus*
 var. *espinomyceticus* (espinomysiinit), *S. furdicidicus*
 (mydekamysiini), *S. ambofaciens* (foromasidiini D),
S. eurocidicus (metymysiini), *S. griseolus* (griseomysiini),
S. flavochromogenes (amaromysiini, shinkomysiinit),
 20 *S. fimbriatus* (amaromysiini), *S. fasciculus* (amaromysiini),
S. erythreus (erytromysiinit), *S. antibioticus* (oleando-
 mysiini) *S. olivochromogenes* (oleandomysiini),
S. spinichromogenes var. *suragaoensis* (kujimysiinit),
S. kitasatoensis (leukomysiini), *S. narbonensis* var.
 25 *josamyceticus* (leukomysiini A3, josamysiini),
S. albogriseolus (mikonomysiini), *S. bikiniensis* (kal-
 komysiini), *S. cirratus* (kirramysiini), *S. djakartensis*
 (niddamysiini), *S. eurythermus* (angolamysiini),
S. fradiae (tylosiini, laktenosiini, makrosiini),
 30 *S. goshikiensis* (bandamysiini), *S. griseoflavus* (aku-
 mysiini), *S. halstedii* (karbomysiini), *S. tendae* (karbo-
 mysiini), *S. macrosporeus* (karbomysiini), *S. thermo-*
tolerans (karbomysiini) ja *S. albireticuli* (karbo-
 mysiini) ei-pilkkovat solut.
 35 *Streptomyces*-luokan ei-pilkkovien kantojen edul-
 lisia isäntäsoluja, jotka tuottavat β -laktaami-antibioot-

- teja ja joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja on erityisen hyödyllinen, ovat esimerkiksi lajien *S. lipmanii* (A16884, MM4550, MM13902), *S. clavuligerus* (A16886B, klavulaanihappo), *S. lactamdurans* (kefamysiini C),
- 5 *S. griseus* (kefamysiini A, B), *S. hygroscopicus* (deaset-oksikefalosporiini C), *S. wadayamensis* (WS-3442-D), *S. chartreusis* (SF 1623), *S. heteromorphus* ja *S. panayensis* (C2081X), *S. cinnamomensis*, *S. fimbriatus*, *S. halstedii*, *S. rochei* ja *S. viridochromogenes* (kefamysiinit A, B),
- 10 *S. cattleya* (tienamysiini), ja *S. olivaceus*, *S. flavovirens*, *S. flavus*, *S. fulvoviridis*, *S. argenteolus*, ja *S. sioyaensis* (MM 4550 ja MM 13902) ei-pilkkovat solut.

- Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat polyeetteri-antibiootteja ja joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja on
- 15 erityisen hyödyllinen, ovat esimerkiksi lajien *S. albus* (A204, A28695A ja B, salinomysiini), *S. hygroscopicus* (A218, emerisidi, DE3936), A120A, A28695A ja B, eteromysiini, dianemysiini), *S. griseus*
- 20 (grisoriksiini), *S. globatus* (ionomysiini), *S. eurocidicus* var. *asterocidicus* (laidlomysiini), *S. lasaliensis* (lasalosidi), *S. ribosidificus* (lonomysiini), *S. cacaoi* var. *asoensis* (lysoselliini), *S. cinnamomensis* (monensiini), *S. aureofaciens* (narasiini),
- 25 *S. gallinarius* (RP 30504), *S. longwoodensis* (lysoselliini), *S. flaveolus* (CP38936), *S. mutabilis* (S-11743a), ja *S. violaceoniger* (nigerisiini) ei-pilkkovat solut.

- Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat glykopeptidi-antibiootteja ja joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja on erityisen hyödyllinen, ovat esimerkiksi lajien *S. orientalis* ja *S. haranomachiensis* (vankomysiini), *S. candidus* (A-35512, avoparsiini) ja *S. eburosporeus*
- 35 (LL-AM 374) ei-pilkkovat solut.

Muiden ei-pilkkovien Streptomyces-kantojen edullisia

isäntäsoluja, joissa tätä menetelmää voidaan käyttää ja on erityisen hyödyllinen, ovat esimerkiksi lajien *S. coelicolor*, *S. granuloruber*, *S. roseosporus*, *S. lividans*, *S. espinosus* ja *S. azureus* ei-pilkkovat
5 solut.

Samalla kun tämän keksinnön kaikki suoritusmuodot ovat käyttökelpoisia, ovat jotkut ekspressoimisvektoreista ja transformanteista edullisia käytettäviksi tässä keksinnössä. Siten ovat edullisia vektoreita plasmidit pOW527, pOW528, pOW529, pOW530, pOW539 ja pOW540
10 ja edullisia transformanteja ovat *Streptomyces ambofaciens*/pOW527, *S. ambofaciens*/pOW528, *S. ambofaciens*/pOW529, *S. ambofaciens*/pOW530, *S. ambofaciens*/pOW539 ja *S. ambofaciens*/pOW540. Tästä edullisesta ryhmästä ovat
15 plasmidit pOW529 ja pOW539 sekä transformantit *S. ambofaciens*/pOW529 ja *S. ambofaciens*/pOW539 edullisimpia.

Menetelmä tämän keksinnön funktionaalisten polypeptidien ekspressoimiseksi on laajalti käyttökelpoinen ja auttaa täyttämään ekspressoimisvälittäjien tarpeen
20 käytettäviksi *Streptomyces*:essä. Siten tämä menetelmä sallii tuotteiden, joita nyt biotuotetaan *E. coli*:ssa tai *Bacilluksessa*, geneettisen ekspressoimisen *Streptomyces*:essä. Tämä on erityisen edullista, koska *Streptomyces*'in suurmittakaavainen fermentointi on paremmin tunnettu ja
25 ymmärretty kuin *E. coli*'n tai *Bacilluksen* fermentointi. Itse asiassa *E. coli*'n kaupallinen fermentointi on vielä suuresti kokeellista ja tulvillaan vaikeuksia. Keksintö kiertää tämän ongelman antamalla vaihtoehdon tuottaa yhdisteitä, joita nyt biosyntetisoidaan *E. coli*:ssa,
30 kuten esimerkiksi ihmisen insuliinia, ihmisen proinsuliinia, glukagonia, interferonia, ihmisen kasvuhormonia, naudan kasvuhormonia jne. *Streptomyces*:essä. Tämä voidaan tehdä, koska tässä menetelmässä käyttökelpoiset vektorit ovat erittäin monipuolisia ja voivat mukautua DNA-sekvenssiin, jotka koodaavat edellä mainittuja tuotteita. Siten
35 tämä menetelmä antaa joustavuutta isäntien valinnassa ja

ja antaa keinon *Streptomyces*'in käyttämiseen polypeptidien ja muiden geenituotteiden biotuotannossa. Tämä ei ollut mahdollista ennen tätä keksintöä. Siten homologisia *Bacillus*-promootoreita ja *Bacillus* luonnossa esiintyvien tai modifioitujen ribosomin sitomiskohdan sisältävien DNA-sekvenssien käyttö funktionaalisten polypeptidien geneettiseen ekspressoointiin *Streptomyces*:essä sallii yhdistelmä-DNA-teknologian täydellisen hyväksikäytön tässä mikro-organismien teollisesti tärkeässä luokassa.

10 Lajeja *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103, *Bacillus subtilis*/MI112/pHI-16, *E. coli* K12 JA221/pMS480, *E. coli* K12 BE904/pMC1403 ja *E. coli* K12 JA221/pOW601, plasmidien pEL103, pHI-16, pMS480, pMC1403 ja pOW601 vastaavina lähteinä ja *Streptomyces*
 15 *ambofaciens*'ia voidaan viljellä lukuisilla tavoilla käyttäen jotakin monista erilaisista väliaineista. Hiilihydraatti-lähteitä, jotka ovat edullisia viljelyväliaineessa, ovat esimerkiksi melassi, glukoosi, dekstriini ja glyseroli, ja typpilähteet käsittävät esimerkiksi soijajauhon, aminohapposeoksia ja peptoneja. Epäorgaanisia ravintosuoloja lisätään myös ja ne käsittävät tavalliset suolat, jotka pystyvät antamaan natrium-, kalium-, ammonium-, kalsium-, fosfaatti-, kloridi-, sulfaatti- tms. ioneja. Muiden mikro-organismien kasvua ja kehittymistä
 20 varten lisätään tarpeen mukaan myös hivenaineita. Tällaisia hivenaineita tulee tavallisesti epäpuhtauksina satunnaisesti väliaineen muita aineosia lisättäessä.

Streptomyces granuloruber No. A39912.13/pEL103:a kasvatetaan aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen
 30 laajalla pH-alueella n. 5-9 lämpötiloissa väliltä n. 15^o - 40^oC. Plasmidin pEL103 tuotantoa varten suurimmassa määrässä, on kuitenkin toivottavaa aloittaa viljelyväliaineella pH n. 7,2:ssa ja pitää viljely n. 30^oC:n lämpötilassa. *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103:n
 35 viljelystä edellä mainituissa olosuhteissa on seurauksena solujen säilö, josta plasmidi pEL103 eristetään sopivasti

alalla hyvin tunnetuin menetelmin.

Bacillus subtilis MI112/pHI-16:ta viljellään aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen laajalla pH-alueella n. 5-8,5 lämpötiloissa väliltä n. 25° - 45°C.

- 5 Plasmidin pHI-16 tuotantoa varten suurimmassa määrässä on kuitenkin toivottavaa aloittaa viljelyväliaineella pH n. 7:ssä ja pitää viljely n. 37°C:n lämpötilassa. *Bacillus subtilis* MI112/pHI-16:n viljelystä edellä mainituissa olosuhteissa on seurauksena solujen säilö, josta plasmidi
10 pHI-16 eristetään sopivasti alalla hyvin tunnetuin menetelmin.

- E. coli* K12 JA221/pMS480:tä, *E. coli* K12 BE904/pMC1043:a ja *E. coli* K12 JA221/pOW601:tä kasvatetaan kutakin aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen laajalla pH-alueella n. 6,5-8 lämpötiloissa väliltä n.
15 25° - 40°C. Plasmidien pMS480, pMC1403 ja pOW601 tuottamiseksi suurimmassa määrässä on kuitenkin toivottavaa aloittaa viljelyväliaineella pH n. 7,2:ssa ja pitää yllä n. 37°C:n viljelylämpötila. *E. coli*-solujen viljelystä edellä
20 mainituissa olosuhteissa on seurauksena solujen säilö, josta plasmidit vastaavasti eristetään alalla hyvin tunnetuin menetelmin.

- Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin ja yksityiskohtaisesti tässä esitettyä keksintöä. Sekä selitys keksinnöstä että todelliset työvaiheet keksinnön rakenteluksi kuvataan, milloin on sopivaa.

Esimerkki 1

Plasmidin pOW10 rakentelu

- A. Plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-osasen
30 rakentelu

1. Plasmidin pMS480 eristäminen

- Bakteeria *E. coli* K12 JA221/pMS480 (NRRL B-15258) viljeltiin TY-liemessä (1 % tryptonia, 0,5 % hiivauutetta, 0,5 % natriumkloridia, pH 7) 100 µg/ml:n kanssa anti-
35 bioottia ampisilliini tavanomaisten mikrobiologisten menetelmien mukaisesti. 18 tunnin inkuboinnin jälkeen siir-

- rettiin n. 0,5 ml viljelystä 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja lingottiin n. 15 sekuntia. Ellei toisin ole esitetty, tehtiin kaikki käsittelyt ympäristön lämpötilassa.
- Saatu sakan päällä oleva neste poistettiin varovasti
- 5 hienokärkisellä imulaitteella ja solupelletti suspendoitiin n. 100 μ l:ään vastavalmistettua lysotsyymi-liuosta, joka sisälsi 2 mg/lm lysotsyymiä, 50 mM glukoosia, 10 mM EDTA (etyleenidiamiinitetra-asetaattia) ja 25 mM Tris-HCl (pH 8). 30 minuutin inkuboinnin jälkeen 0°C:ssa lisättiin
- 10 n. 200 μ l alkalista SDS (natriumdodekyylisulfaattia)-liuosta (0,2N NaOH 1 % SDS) ja sitten putkeen aikaan-
saatiin lievä pyörre ja pidettiin 0°C:ssa 5 minuuttia. Seuraavaksi lisättiin n. 150 μ l 3M natriumasetaattia (joka oli valmistettu liuottamalla 3 moolia natriumase-
- 15 taattia minimimäärään vettä, asettamalla pH 4,8:aan jää-etikalla ja asettamalla sitten tilavuus 1 litraksi) DNA-kokkareeseen, joka oli muodostettu sen jälkeen kun putken sisältöä oli heikosti sekoitettu muutama sekunti inver-siolla.
- 20 Putkea pidettiin 0°C:ssa 60 minuuttia ja lingottiin sitten 5 minuuttia antamaan miltei kirkas sakan päällä oleva neste. N. 0,4 ml sakan päällä olevaa nestettä siirrettiin toiseen sentrifugiputkeen, johon lisättiin 1 ml kylmää etanolia. Sen jälkeen kun putkea oli pidetty
- 25 -20°C:ssa 30 minuuttia, syntynyt sakka koottiin linkoamalla (2 minuuttia) ja sakan päällä oleva neste poistettiin imemällä. Näin koottu pelletti liuotettiin 200 μ l:ään 0,1M natriumasetaatti/0,05M Tris-HCl:ään (pH 8) ja seostettiin uudelleen lisäämällä 2 tilavuutta kylmää etanolia.
- 30 10 minuutin kuluttua -20°C:ssa sakka koottiin linkoamalla ja se muodosti halutun plasmidi-pMS480-DNA:n.
2. Plasmidin pMS480 EcoRI-SfaNI-uutto
- n. 5 μ l (5 μ g) plasmidia pMS480 (eristetty esimer-
- kissä A-1) TE-puskurissa (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA),
- 35 5 μ l DTT (100 mM ditiotreitolia) 5 μ l (1000 μ g/ml) BSA (naudan seerumialbumiinia), 25 μ l vettä, 5 μ l (5 New England

Biolab-yksikköä) EcoRI-restriktioentsyymiä* ja 5 µl 10x-reaktioseosta** inkuboitiin 37°C:ssa n. 1 tunti. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia. Seuraavaksi reaktioseos jäädytettiin jäissä ja sitten lisättiin n. 1,1 µl 5M NaCl, 4 µl vettä ja 5 µl (5 New England Biolab-yksikköä) SfaNI-restriktioentsyymiä, mitä seurasi toinen inkubointi 37°C:ssa 1 tunnin ajan. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten reaktioseos jäädytettiin jäissä, uutettiin sekä fenolilla että kloroformi/isoamyylialkoholilla (24:1) ja saostettiin sitten etanolilla. Halutut n. 0,38 kb:n EcoRISfaNI-pilkontaosaset erotettiin tavalliseen tapaan ja eristettiin agarosigeeli-sähköforeesilla (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Halutut n. 0,38 kb:n osaset liuotettiin n. 30 µl:ään vettä.

*Restriktio- ja muita entsyymejä voidaan saada seuraavista lähteistä:

New England Bio Labs., Inc., 32 Tozer Road, Beverly,
Massachusetts 01915
Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive,
Indianapolis, Indiana 46250

**Reaktioseos (10X) EcoRI-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella:

500 mM NaCl
1000 mM Tris-HCl, pH 7,2

50 mM MgSO₄

B. Plasmidin pOW601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osasen rakentelu

1. Plasmidin pOW601 eristäminen

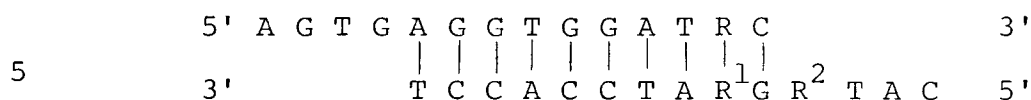
Plasmidi pOW601 eristetään E. coli K12 JA221/pOW601:stä (NRRL B-15259). Kantaa viljeltiin ja plasmidi eristettiin pääasiallisesti esimerkin 1A-1 esityksen mukaisesti.

2. Plasmidin pOW601 EcoRI-NcoI-uutto

Haluttu uutto suoritetaan pääasiallisesti esimerkin

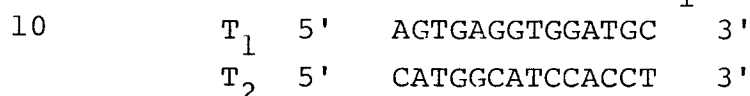
1A-2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia pOW601 eikä plasmidia pMS480.

C. DNA-osasen rakentelu



jossa R on G ja R¹ on C ja R² on G.

Haluttu rakentelu käsittää synteessin ja seuraavassa esitettyjen oligonukleotidien T₁ ja T₂ 5'-fosforyloinnin.



Oligonukleotidejä T₁ ja T₂ käytettiin halutun DNA-fragmentin rakentamiseksi, jolla oli NcoI-komplementaarinen pää. Oligonukleotidi-synteesi toteutettiin tavanomaisesti modifioidulla fosfotriesteri-menetelmällä käyttäen täysin suojattuja deoksiribonukleotidi-rakenneryhmiä.

Edellä mainitulle synteessille on tyypillistä seuraava menettely osaselle T₁, kuten on yhteenvetona esitetty oheisten piirrosten kuvassa 4. Eri nukleotidi-osaset, joita on käytetty T₁:n synteessissä, on merkitty numeroin kuvassa. Käytetyt lyhennykset ovat seuraavat: MSTe, mesityleenisulfonyylitetratsoli; BSA, bentseenisulfonihappo; TLC, ohutlevykromatografia; HPLC, suurteho-nestekromatografia; DMT, 4,4'-dimetoksitrityyli; CE, 2-syaanietyyli; R, p-kloorifenyyli; Bz, bentsoyyli; (Y)₂NH, di-isopropyliamiini; iBu, isobutyryyli; Py, pyridiini; AcOH, etikkahappo.

Täysin suojattujen deoksiribotetranukleotidien 2 (312 mg, 0,15 mmoolia) ja deoksiribodinukleotidien 4 (50 mg, 0,017 mmoolia) sulut puretaan 5'-hydroksyyleillä käsittelemällä 2-%:sella BSA 7:3 (tilav./tilav.) kloroformi/metanolissa (2:lla ja 1 ml:lla, vastaavasti) 10 minuuttia 0°C:ssa. Reaktiot lopetetaan lisäämällä kyllästettyä vesipitoista ammoniumbikarbonaattia (2 ml), uuteaan kloroformilla (25 ml) ja pestään vedellä (kaksi

kertaa, 10 ml). Orgaaniset kerrokset kuivataan (magnesiumsulfaatti), haihdutetaan pieniin tilavuuksiin (n. 5 ml) ja saostetaan lisäämällä petrolieetteriä (35° - 60°C:n jae). Värittömät sakat kootaan linkoamalla ja kuivataan eksik-
 5 kaattorissa tyhjössä antamaan 6 ja 8, vastaavasti, kumpi-
 kin homogeeninen piihappogeeli-tlc:lla (Merck 60 F254, kloroformi/metanoli, 9:1).

Tetrameerit 1 ja 3 (400 mg, 0,17 mmoolia; 100 mg, 0,0043 mmoolia) muutetaan fosfodiestereikseen (5 ja 6)
 10 käsittelemällä di-isopropyliamiinilla (1:5 tilav./tilav.,
 2 ml) 30 minuuttia ympäristön lämpötilassa. Reaktioseos saostettiin sitten lisäämällä vedetöntä eetteriä (20 ml). Reagenssit poistetaan linkoamalla ja dekanttoimalla päällä oleva neste. Jäännökset kuivataan haihduttamalla vedet-
 15 tömän pyridiinin kanssa. Dimeeri 8 (0,04 mmoolia) ja tetrameeri 7 yhdistetään MSTe:n (65 mg, 0,25 mmoolia) kanssa vedettömässä pyridiinissä (1 ml) ja reaktioseos jätetään ympäristön lämpötilaan kahdeksi tunniksi. TLC-analyysi osoittaa, että 95 % dimeeristä 8 on muuttunut
 20 heksameeri-tuotteeksi (tehty näkyväksi havaitsemalla DMT-ryhmä suihkuttamalla 10-%:sella vesipitoisella rikkihapolla ja kuumentamalla 100°C:ssa). Reaktioseos saostetaan lisäämällä eetteriä ja sakan päällä oleva neste dekantoidaan. Heksameerin sulku puretaan 5'-asemassa 2-%:sella
 25 BSA (8 ml) kuten edellä dimeerille 4 ja tetrameerille 2 kuvattiin. Tuote (10) puhdistetaan piihappogeelipylväällä (Merck 60 H, 3,5 x 5 cm) vaihdegradientti-eluoinnilla kloroformi/metanolilla (98:2 - 95:5, tilav./tilav.). Jakeet, jotka sisältävät tuotetta 10, haihdutetaan
 30 kuiviin.

Samalla tavalla tetrameeri 5 yhdistetään tetrameeriin 6 ja täysin suojattu tuote puhdistetaan suoraan piihappogeelillä. Tämän jälkimmäisen yhdisteen sulku puretaan 3'-päässä di-isopropyliamiinilla, kuten edellä kuvattiin, antamaan osanen 9.

Lopuksi oktomeeri 9 ja heksameeri 10 yhdistetään

- vedettömässä pyridiinissä (0,5 ml) kondensaatioaineena MSTe (100 mg, 0,39 mmoolia). Kun tämä on loppuunsuoritettu (45 min., ympäristön lämpötila) seos haihdutetaan pyörivällä haihduttimella ja jäännös kromatografoidaan
- 5 pihappogeelillä. Annoksesta yhdistettä 11: (20 mg) pyridiinissä (0,5 ml) puretaan sulku täydellisesti käsittelemällä väkevällä ammoniumhydroksidilla (7 ml, 8 tuntia, 60°C) ja käsittelemällä sen jälkeen 80-%:ssa etikkahapossa (15 minuuttia, ympäristön lämpötilassa). Etikkahapon haihduttamisen jälkeen kiinteä jäännös liuotetaan
- 10 tislattuun veteen (2 ml) ja uutetaan etyylieetterillä (3x, 2 ml). Vesipitoinen faasi haihdutetaan kuiviin ja liuotetaan uudelleen 50-%:seen pyridiiniin vedessä. Tuote puhdistettiin valmistamalla ohutlevykromatografiolla
- 15 polyetyleni-imiini-selluloosa (PEI/UV₂₅₄)-levyillä (Narang S. A. et al., 1980, Methods in Enzymology 65:610) ja sitten HPLC:lla kääntöfaasi C-18-kolonnilla (Waters). 12:n sekvenssi vahvistetaan kaksikulotteisella sekvenssianalyysillä.
- 20 Seuraavaksi rakennettiin oligonukleotidi T₂. Tämä tehtiin pääasiallisesti edellä esitetyn synteesiprotokollan mukaisesti oligonukleotidiä T₁ varten.
- 10 mikrogramman määriä syntyneitä oligonukleotidiä T₁ ja T₂ fosforyloidaan kvantitatiivisesti [γ -³²P]-
- 25 ATP:llä (New England Nuclear) T₄-polynukleotidi-kinaasin läsnäollessa antamaan spesifiset aktiivisuudet n. 1 Ci/mmol. Radiomerkattuja osasia puhdistetaan 20-%:sella polyakryyliamidi/7M ureageeli-sähköforeesilla ja eluoitujen osasten sekvenssit varmistetaan osittaisten käärmemyrkkyytteiden kaksikulotteisella sähköforeesi/homokromatografiolla (Jay et al., 1974, Nucleic acids Res. 1:331). Osasia T₁ ja T₂ lämpökäsitellään sitten tavanomaisesti
- 30 halutun DNA-osasen muodostamiseksi.
- D. Plasmidin pOW10 rakentelu liittämällä 1) plasmidin
- 35 pMS480 n. 38 kb:n EcoRI-SfaNI-osanen; 2) plasmidin pOW601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osanen ja 3) esimerkin

1C synteettinen DNA-osanen sekä E. coli K12 JA221/
pOW10:n rakentelu

- n. 8 μ l (0,01 μ g) plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n
EcoRI-SfaNI-fragmenttia, 8 μ l (0,10 μ g) plasmidin pOW601
5 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-fragmenttia, 10 μ l (0,7 μ g) esimerkin
1C DNA-fragmenttia, 10 μ l vettä, 4 μ l (10 mM) ATP, 2,5 μ l
(100 mM) ditiotreitolia (DTT), 5 μ l liitäntäseosta** ja
2,5 μ l T₄ DNA-ligaasia* (n. 2 New England Bio Lab-yksikköä)
inkuboitiin 16°C:ssa n. 16 tuntia. Reaktio lopetettiin
10 inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten, jäissä jääh-
dyttämisen jälkeen, käytettiin syntynyt liitetty seos
transformoimaan E. coli K12 JA221 (NRRL B-15211) pääasial-
lisesti Lederberg'in ja Cohen'in, 1974, J. Bacteriology
119:1072 transformointimenettelyn mukaisesti TY-levyllä,
15 joka sisälsi 10 μ g/ml antibioottia tetrasykliini. Synty-
neitä transformantteja viljeltiin tavalliseen tapaan
ja käytettiin plasmidin pOW10 myöhempää tuotantoa ja eris-
tämistä varten pääasiallisesti esimerkin 1A menettelyn
mukaisesti. Plasmidin pOW10 pilkontakohtien kartta on
20 esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

*T₄-DNA-ligaasia saadaan seuraavasta lähteestä:
New England Bio Labs., Inc., 32 Tozer Rd., Beverly,
Massachusetts 01915

- **Liitäntäseos valmistettiin seuraavalla kokoon-
25 panolla:

500 mM Tris-HCl, pH 7,6

100 mM MgCl₂

Esimerkki 2

- Plasmidien pOW527 ja pOW528 sekä E. coli K12 JA221/
30 pOW527:n ja E. coli K12 JA221/pOW528:n rakentaminen
A. Plasmidin pHI-16 eristäminen

1. Bacillus subtilis MI112/pHI-16:n viljely

Bacillus subtilis MI112/pHI-16:n (NRRL B-12597)

- vegetatiivinen viljely valmistettiin tavanomaiseen tapaan
35 levittämällä PAB-agar-levylle (PAB* [Penassay-liemi], joka
sisälsi agaria 15 g/l ja klooriamfenikolia 10 μ g/ml). Sen

jälkeen kun ympättyä levyä oli inkuboitu 37°C:ssa n. 18 tuntia, valikoitiin yksi ainoa pesäke ja käytettiin 500 ml:n steriloitua PAB-väliainetta, jossa oli 10 µg/ml kloori-
 amfenikolia, ympäämiseen. Syntyneitä ympättyä lientä
 5 inkuboitiin 37°C:ssa n. 18 tuntia, minkä jälkeen syntyneet *Bacillus subtilis* MI112/pHI-16-solut olivat valmiit korjattavaksi talteen ja sen jälkeen plasmidi-DNA:n eristämistä varten.

*PAB voidaan saada firmasta Difco Laboratories,
 10 Detroit, Michigan.

2. Plasmidin eristäminen

n. 10 g (märkäpaino) *Bacillus subtilis* MI112/pHI-16-soluja koottiin ensin talteen linkoamalla (10 minuuttia, 4°C, 10.000 r/min), pestiin sitten n. 50 ml:ssa TES
 15 (10 mM Tris (pH 8), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) ja koottiin lopuksi uudelleen linkoamalla. Pellettiin lisättiin n. 20 ml TE-puskuria, jossa oli 25 % sakkaroosia, mitä seurasi n. 10 mg lysotsyymiä 250 µl:ssä vettä. Seosta inkuboitiin 37°C:ssa n. 30 minuuttia, mitä seurasi n.
 20 100 yksikön RNase lisääminen. Syntyneitä seosta inkuboitiin jälleen 37°C:ssa 30 minuuttia ja sitten, sen jälkeen kun se oli tehty 1-%:seksi ja 1M:ksi SDS:n (natriumdodekyylisulfaatin) ja vastaavasti natriumkloridin suhteen, seosta jäähdytettiin jäähauteella n. 3 tuntia.
 25 Lysaatin linkoamisen jälkeen (30 minuuttia, 4°C, 19.000 r/min.) sakan päällä oleva neste asetettiin 31,8 ml:ksi TE:lla ja sitten lisättiin 28,7 g keesiumkloridia ja 0,4 ml (10 mg/ml) etidiumbromidia. Keesiumkloridi-gradientti asetettiin linkoamalla kierrosnopeudella 49,500 r/min.
 30 16 tuntia. Plasmidi-nauha kerättiin ja lingottiin kierrosnopeudella 55.000 r/min. 16 tuntia, kerättiin uudelleen, uutettiin kolmesti yhtä suurilla tilavuusmäärillä isoamyylialkoholia, dialysoitiin laimeata TE:tä vastaan, saostettiin etanolilla ja suspendoitiin uudelleen 400
 35 µl:ään TE. Syntynyt plasmidi pHI-16 DNA varastoitiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten.

Plasmidin pHI-16 n. 0,74 kb:n HpaII-osan sisäl-
 tää kanamysiini-resistenssigeenin. Siten käsittelystä
 HpaII-restriktioentsyymillä, jota seurasi liitäntä, on
 tuloksena n. 3,9 kb:n plasmidi, joka tässä on nimetty
 5 pHI-18:ksi, josta puuttuu kanamysiini-resistenssigeeni.
 Yksityiskohtainen menetelmä plasmidin pHI-18 rakentami-
 seksi on selostettu seuraavassa.

B. Plasmidin pHI-18 rakentelu

1. Plasmidin pHI-16 osittainen HpaII-uutto

10 n. 5 μ l (2,5 μ g) plasmidi-pHI-16-DNA:ta, 1 μ l
 (2 mg/ml) BSA, 37 μ l vettä, 2 μ l HpaII (joka sisältää
 2 New England Bio Labs-yksikköä) -restriktio-entsyymiä
 ja 5 μ l reaktioseosta* inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunti.
 Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu kuumentamalla
 15 65°C:ssa 10 minuuttia, DNA saostui lisäämällä 2 tilavuus-
 osaa 95-%:sta etanolia. Syntynyt DNA-sakka pestiin
 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspendoitiin
 5 μ l:ään TE-puskuria ja varastoitiin 4°C:ssa tulevaa
 käyttöä varten.

20 *Reaktioseos HpaII-restriktioentsyymiä varten val-
 mistettiin seuraavalla kokoonpanolla:

60 mM KCl
 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
 100 mM MgCl₂

25 10 mM ditiotreitolia

2. Plasmidi pHI-16 HpaII-uutteen liitäntä

n. 5 μ l plasmidi pHI-16-HpaII-uutetta (valmis-
 tettu esimerkissä 3B-1) 2 μ l T4 DNA-ligaasia ja 43 μ l
 liitäntäseosta* inkuboitiin n. 16°C:ssa n. 18 tuntia.
 30 Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 5 μ l 3M natriumasetaat-
 tia ja 150 μ l 95-%:sta etanolia. Haluttu DNA-sakka pestiin
 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspendoitiin
 10 μ l:ään TE-puskuria ja varastoitiin 4°C:ssa tulevaa
 käyttöä varten.

35 *Liitäntäseos valmistettiin seuraavalla kokoon-
 panolla:

66 mM Tris-HCl, pH 7,8

10 mM ditiotreitoli

6,6 mM MgCl_2

4 mM ATP

5 C. *Bacillus subtilis* MI112/pHI-18:n rakentelu

Bacillus subtilis MI112 voidaan saada tavan-
omaisesti viljelemällä *B. subtilis* MI112/pHI-16:ta
(NRRL B-12597) klooriamfenikolin poissaollessa.

B. subtilis MI112/pHI-16-solut menettävät itsestään pHI-16
10 plasmidin edellä mainituissa viljelyolosuhteissa kehittäen
siten halutun klooriamfenikoli-herkän *B. subtilis* MI112-
kannan. Alaan perehtyneet tietävät ja ymmärtävät, että
herkkyyttä klooriamfenikolille voidaan käyttää sen
testaamiseen ja varmistamiseen, että valikoidaan ainoas-
15 taan *B. subtilis* MI112-soluja, joista plasmidi puuttuu,
ja käytetään tässä esitetyissä *Bacillus*-transformointi-
menetelmissä.

n. 50 ml steriiliä PAB ympättiin *Bacillus subtilis*
MI112:lla ja inkuboitiin 37°C:ssa kunnes saavutettiin
20 solutiheys 2×10^8 solua/ml. Soluista erotettiin sitten
alkulima käyttäen steriilitekniikkaa, pelleteimalla
ja suspendoimalla solut sitten uudelleen n. 5 ml:aan
SMMP (yhtä suuret tilavuusmäärät sekä 4 x PAB että
liuosta, joka käsittää 1,0M sakkaroosia, 0,04M maleiini-
25 happoa ja 0,04M MgCl_2 , pH asetettu 6,5:een NaOH:lla).
Sitten lisättiin n. 250 μl lysotsyymiä (20 mg/ml SMM:ssa
0,5M sakkaroosia, 0,02M maleiinihappoa ja 0,02M MgCl_2 ,
pH asetettu 6,5:een NaOH:lla) käyttäen suodatinsteri-
lointia. Soluja inkuboitiin lievästi ravistellen
30 37°C:ssa n. 2 tuntia. Saadut alkulimat pelletoitettiin,
pestiin 5 ml:lla SMMP ja suspendoitiin sitten uudelleen
5 ml:aan SMMP. Linkoamisen jälkeen (25°C, 12 minuuttia,
2.600 r/min) transformoitiin n. 0,1 ml alkulimoista
lisäämällä n. 20 μl 1:1 seosta, joka sisälsi plasmidi
35 pHI-18-DNA:ta ja 2X SMM. Sitten lisättiin välittömästi
n. 1,5 ml PEG-liuosta (40 g PEG 600 [polyetyleeniglykolia],

- 50 ml 2X SMM ja vettä 100 ml:ksi) ja n. 2 minuutin kuluttua lisättiin myös 5 ml SMMP. Seuraavaksi alkulimat pellettoitiin, suspendoitiin 1 ml:aan SMMP ja inkuboitiin 30°C:ssa lievästi ravistellen n. 2 tuntia. Näin valmistetun suspension tasaosia levitettiin klooriamfenikolilevyille, jotka sisälsivät DM3-regenerointiväliainetta, jolla litraa kohti oli seuraava koostumus.
- 91 g D-mannitolia 555 ml:ssa deionoitua vettä,
 - joka sisälsi 12 g agaria
 - 10 10 % kasaminohappoja 50 ml
 - 10 % hiivauutetta 50 ml
 - 20 % glukoosia 25 ml
 - 5 % dikaliumfosfaattia 100 ml
 - 1M MgCl_2 20 ml
 - 15 10 % gelatiinia
 - 10 mg klooriamfenikolia
- D-mannitolia, kasaminohappoja ja hiivauutetta käsiteltiin autoklaavissa yhdessä. Gelatiini lisättiin välittömästi autoklaavi-käsittelyn jälkeen ja jäljellä olevat aineosat lisättiin seoksen jäähtyttyä. Väliaineen lopullinen klooriamfenikoli-pitoisuus oli 10 µg/ml.
- Syntyneet klooriamfenikoliresistentit pesäkkeet testattiin kanamysiini-herkkyyden suhteen. Valikoitiin klooriamfenikoliresistentti ja kanamysiini-herkkä pesäke
- 25 halutuksi *Bacillus subtilis* MI112/pHI-18 kannaksi. Tätä kantaa viljeltiin ja sen identtisyys vahvistettiin lisäksi tavanomaisella restriktioentsyymillä ja perustavan plasmidin agarosigeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982).
- 30 D. Plasmidin pEL103 eristäminen
1. *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103:n viljely
- Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103:n (NRRL 12549) vegetatiivinen ympäristö valmistettiin tavalliseen
- 35 tapaan viljelemällä kantaa aerobisissa uppo-olosuhteissa 50 ml:ssa steriloitua tryptikaasi-soijalientä* pitoisuudessa

35 g/l deionoidussa vedessä.

Tryptikaasi-soijaliemiymppiä inkuboitiin 48 tuntia 30°C:n lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen n. 10 ml ymppiä siirrettiin 500 ml:aan steriloitua lientä ja inkuboitiin
 5 n. 20 tuntia 30°C:ssa. pH:ta ei asetettu. Inkuboinnin jälkeen *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103-solut olivat valmiit korjuuta varten ja plasmidi-DNA:n myöhempää eristämistä varten.

*Tryptikaasi-soijaliemi saadaan firmasta BBL
 10 Division, Becton-Dickinson & Company, Cockeysville, Maryland 21030.

2. Plasmidin eristäminen

n. 12 g (märkä paino) *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103-soluja lingottiin (10 minuuttia,
 15 4°C, 10.000 r/min), pestiin 10-%:ssa glyserolissa ja korjattiin sitten talteen linkoamalla uudelleen edellä mainituissa olosuhteissa. Soluihin lisättiin n. 50 ml TES-puskuria (0,01M Tris(hydroksimetyyli)amino-
 20 etaanina [Tris], 0,001M EDTA, 34 % sakkaroosia, pH 8), mitä seurasi n. 0,25 g lysotsyymiä 10 ml:ssa 0,25M EDTA. Sen jälkeen kun seosta oli inkuboitu 37°C:ssa n. 15 minuuttia, lisättiin n. 0,5 ml 10-%:sta Triton X-100 TE-puskurissa (0,01M Tris, 0,001M EDTA, pH 8). Syntynyttä seosta inkuboitiin sitten 65°C:ssa n. 15 minuuttia. Sen
 25 jälkeen kun lusaattia oli lingottu (45 minuuttia, 4°C, 18.000 r/min) sakan päällä olevaa nestettä uutettiin neljä kertaa isoamyylialkoholilla ja kerran kloroformi-isoamyylialkoholi-liuoksella (24:1). Seuraavaksi lisättiin 0,1 tilavuutta 3M natriumasetaattia vesipitoiseen
 30 faasiin, mitä seurasi kolme tilavuutta kylmää (-20°C) 95-%:sta etanolia. Etanoli-saostus suoritettiin nopeasti hiilihappojää-etanoli-kylvyssä ja DNA-sakka koottiin linkoamalla (15 minuuttia, 4°C, 10.000 r/min). Sakka kuivattiin tyhjössä ja suspendoitiin uudelleen 1,1 ml:aan
 35 STE-puskuria (0,01M Tris, 0,001M EDTA, 0,01M natriumkloridia). Linkoaminen (40 tuntia, 15°C, 35.000 r/min)

käyttäen keesiumkloridi-gradientteja, etidiumbromidin kanssa, suoritettiin plasmidi-DNA:n puhdistamiseksi. Linkoamisen jälkeen haluttu plasmidi pEL103-DNA-rihma poistettiin ja etidiumbromidi uutettiin tavanomaisin menetelmin.

- 5 DNA:n saostamisen jälkeen kolmessa tilavuudessa etanolia näin eristetty plasmidi pEL103-DNA liuotettiin 1 ml:aan 10-kertaisesti laimennettua TE-puskuria ja varastoitiin sitten -20°C :ssa.

E. Plasmidin pLR2 rakentaminen

- 10 1. Plasmidin pIJ6 HindIII-uutto

- n. 20 μl (20 μg) plasmidi pIJ6-DNA:ta, jonka on esittänyt Thompson et al., 1980, Nature 286:525, 5 μl BSA (naudan seerumialbumiini, 1 mg/ml), 19 μl vettä, 1 μl HindIII- (joka sisälsi kolme New England Bio Labs-
15 yksikköä) restriktioentsyymiä ja 5 μl reaktioseosta* inkuboitiin 37°C :ssa 2 tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 50 μl 4M ammoniumasetaattia ja 200 μl 95-%:sta etanolia. Saatua DNA-sakkaa pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspendoitiin 20 μl :ään
20 TE-puskuria ja varastoitiin -20°C :ssa.

*Reaktioseos HindIII-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella:

- 600 mM NaCl
100 mM Tris-HCl, pH 7,9
25 70 mM MgCl_2
10 mM ditiotreitolia

2. Plasmidin pBR322 HindIII-uutto

- n. 8 μl (4 μg) plasmidi pBR322-DNA:ta*, 5 μl reaktioseosta, 5 μl BSA (1 mg/ml), 31 μl vettä ja 1 μl HindIII-
30 restriktioentsyymiä inkuboitiin 37°C :ssa 2 tuntia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 60°C :ssa 10 minuuttia, lisättiin n. 50 μl 4M ammoniumasetaattia ja 200 μl 95-%:sta etanolia. Syntynyt DNA-sakka pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä ja
35 suspendoitiin 45 μl :ään vettä.

*Plasmidi pBR322 voidaan saada firmasta Boehringer-

Mannheim Biochemicals, jonka osoite on annettu esimerkiksi 1A-2.

3. HindIII-uutettujen plasmidien pIJ6 ja pBR322 liitäntä

- 5 n. 20 μ l HindIII-käsiteltyä plasmidia pIJ6, 20 μ l HindIII-käsiteltyä plasmidia pBR322, 5 μ l BSA (1 mg/ml), 1 μ l T4-DNA-ligaasia ja 5 μ l liitäntäseosta* inkuboitiin 16^oC:ssa 4 tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 50 μ l 4M ammoniumasetaattia ja 200 μ l 95-%:sta etanolia.
- 10 Syntynyt DNA-sakka pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä ja suspendoitiin TE-puskuuriin. Suspendoitu DNA muodosti halutun plasmidin pLR2.

*Liitäntäseos valmistettiin seuraavalla koostumuksella:

- 15 500 mM Tris-HCl, pH 7,8
200 mM ditiotreitolia
100 mM MgCl₂
10 mM ATP
F. E. coli Kl2 HB101/pLR2:n rakentaminen
- 20 n. 10 ml E. coli Kl2 HB101-soluja (Bolivar et al., 1977, Gene 2:75-93) pelleteitiin linkoamalla ja suspendoitiin sitten n. 10 ml:aan 0,01M natriumkloridia. Seuraavaksi solut pelleteitiin uudelleen, suspendoitiin uudelleen n. 10 ml:aan 0,03M kalsiumkloridia, inkuboitiin
- 25 jäissä 20 minuuttia, pelleteitiin kolmannen kerran ja suspendoitiin lopuksi uudelleen 125 ml:aan 0,03M kalsiumkloridia. Syntynyt solususpensio oli kelvollista myöhempää transformointia varten.

- Plasmidi pLR2 TE-puskurissa saostettiin etanolilla,
- 30 suspendoitiin 150 μ l:ään 30 mM kalsiumkloridi-liuosta ja sekoitettiin lievästi koeputkessa n. 200 μ l:n kanssa kelvollista E. coli Kl2 HB101-soluja. Syntynyttä seosta inkuboitiin jäissä n. 45 minuuttia ja sitten 42^oC:ssa n. 1 minuutti. Seuraavaksi lisättiin n. 3 ml L-lientä
- 35 (Bertani, 1951, J. Bacteriology 62:293), joka sisälsi 50 μ g/ml ampisilliiniä. Seosta inkuboitiin ravistaen

37°C:ssa 1 tunti ja levitettiin sitten L-agar-levyille (Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, New York), joka sisälsi ampisilliiniä. Eloonjääneet pesäkkeet valikoitiin ja testattiin odotetun fenotyypin suhteen (Amp^R, Tet^S) ja ne muodostivat halutut E. coli Kl2 HB101/pLR2-trans-formantit.

G. Plasmidien pEL107 ja pEL105 rakentaminen

1. Plasmidin pLR2 BamHI-uutto ja tiostreptoni-resistenssin antavan n. 1,6 kb:n osasen eristäminen

10 N. 50 µg plasmidi pLR2-DNA:ta, 10 µl reaktioseosta*, 10 µl BSA (1 mg/ml), 29 µl vettä ja 1 µl (4 yksikköä/µl) BamHI-restriktioentsyymiä inkuboitiin 37°C:ssa 2 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasetaattia ja 2,5 tilavuutta 95-%:sta etanolia seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla ja suspendoitiin sitten n. 50 µl:ään TE-puskuria. Haluttu n. 1,6 kb:n BamHI-pilkontaosanen eristettiin tavalliseen tapaan DNA-suspensiosta agarosigeeli-sähköforeesilla (Maniatis et al. 1982). Eristämisen jälkeen osanen suspendoitiin uudelleen n. 20 µl:ään TE-puskuria jälkeentulevaa liitäntää varten.

2. Plasmidin pEL103 osittainen BamHI-uutto

25 n. 20 µg plasmidi pEL103-DNA:ta, 10 µl reaktioseosta, 10 µl BSA (1 mg/ml), 39 µl vettä ja 1 µl BamHI-restriktioentsyymiä (valmistettu laimentamalla 2 µl entsyymiä 8 µl:ssä vettä), inkuboitiin ympäristön lämpötilassa n. 15 minuuttia. Sen jälkeen kun oli lisätty

30 yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasetaattia ja 2 tilavuutta 95-%:sta etanolia, seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla, huuhdeltiin 70-%:ssa etanolissa, kuivatettiin tyhjiössä ja suspendoitiin n. 50 µl:ään TE-puskuria.

35 3. Liitäntä

Seosta, jossa oli n. 20 µg osittain uutettua

plasmidi pEL103-DNA:ta, 10 µg plasmidin pLR2 n. 1,6 kb:n BamHI-pilkontaosasia, 5 µl liitäntäseosta, 5 µl BSA (1 mg/ml), 10 µl vettä ja 1 µl T4-DNA-ligaasia, inkuboitiin n. 16°C:ssa n. 4 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty 40 µl 4M ammoniumasetaattia ja 200 µl kylmää etanolia, seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin 70-%:sella etanolilla, koottiin jälleen ja suspendoitiin sitten 50 µl:ään väliainetta P (Hopwood ja Wright 1978, Molecular and General Genetics 162:307) myöhempää transformointia varten.

Saadaan eri tyyppisiä yhdistelmä-plasmideja riippuen siitä mikä mahdollisista pEL103-pilkontaosasisista tulee liitetyksi n. 1,6 kb:n BamHI-tiostreptoniresistenssin antavaan osaseen. Liitäntä plasmidin pEL103 n. 2,8 kb:n BamHI-pilkontaosaseen antaa halutut n. 4,4 kb:n plasmidit pEL107 ja pEL105. Saadaan kahdella tavalla suunnattuja yhdistelmä-plasmideja, koska n. 1,6 kb:n BamHI-resistenssiä antava osanen voi olla suuntautunut jompaankumpaan suuntaan. Kummankin plasmidin pEL107 ja pEL105 pilkontakohtien ja funktionaalinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 4.

H. *Streptomyces ambofaciens*/pEL107:n ja

S. *ambofaciens*/pEL105:n rakentaminen

Käyttäen n. 20 µg DNA:ta esimerkistä 4D-3 ja 1×10^8 *Streptomyces ambofaciens*'in, kannan, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, josta se on yleisön saatavissa saantinumeroilla NRRL 2420, protoplastia (valmistettu Baltz'in mukaisesti, 1978, J. of General Mikrobiology, 107:93), tehtiin halutut rakentelut pääasiallisesti International Publication'in (of International Patent Application No. PCT/GB79/00095) No. WO79/01169, esimerkin 2 mukaisesti. Halutut transformantit valikoitiin tiostreptoni-resistenssin suhteen peittämällä regeneroituvat protoplastit modifioidulla

R2-väliaineella (Baltz, 1978, J. of General Mikrobiology 107:93) pinta-agarilla, joka sisälsi riittävästi tiostreptonia lopullisen levyväkevyyden saamiseksi 50 µg:ksi/ml. Syntyneet *Streptomyces ambofaciens*/pEL107- ja *S. ambofaciens*/pEL105-tiostreptoniresistentit pesäkkeet eristettiin tunnettujen menetelmien mukaisesti, viljeltiin ja tunnistettiin sitten restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien geelielektroforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982).

- 10 Siten erilaisten eristettyjen pesäkkeiden vegetatiivisia ymppejä (10 ml) valmistetaan tavanomaiseen tapaan ymppäämällä tryptikaasi-soijalientä, joka sisältää riittävästi tiostreptonia lopullisen väkevyyden saamiseksi 50 µg:ksi/ml. Valmistetaan useita ymppejä ja toteutetaan seuraava menettely kunnes kaikki halutut transformanttityypit ja perustavat plasmidit on eristetty. Siten, sen jälkeen kun soluja on inkuboitu 30°C:ssa kunnes ne ovat täydellisesti kasvaneet, lingotaan 6 ml soluja sisältävää lientä. Syntynyt pelletti pestään TE-puskurissa, 20 palletoidaan uudelleen ja suspendoidaan sitten 400 µl:ään 50 mM Tris, pH 8,0. Seuraavaksi lisätään n. 80 µl 0,25M EDTA, 20 µl RNase'a ja 100 µl (10 mg/ml TE:ssä) lysotsyymiä. Sen jälkeen kun seosta on inkuboitu 37°C:ssa n. 15 minuuttia, lisätään n. 10 µl 10-%:sta Triton X-100 ja 25 150 µl 5M NaCl, mitä seuraa lopullinen inkubointi 60°C:ssa 15 minuuttia. Syntynyttä lysaattia lingotaan (15 minuuttia, 4°C, 15.000 r/min) ja sitten sakan päällä olevaa nestettä uutetaan tavalliseen tapaan kahdesti fenolilla, kerran kloroformi/isoamyylialkoholi-liuoksella (24:1) ja 30 saostetaan sitten etanolilla. Perustavien plasmidien ja siten transformanttien identtisyys määritetään tavanomaiseen tapaan restriktioentsyymillä ja agaroosigeelissä sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Plasmidi pEL105 eristettiin tavanomaiseen tapaan plasmidin pBS1 35 myöhempää rakentamista varten.

I. Plasmidien pBS1 ja pBS3 rakentaminen

1. Plasmidin pEL105 osittainen BamHI-uutto

n. 10 μ l (5 μ g) plasmidia pEL105 (eristetty tavalliseen tapaan *Streptomyces ambofaciens*/pEL105:stä [valmistettu esimerkissä 2H7 pääasiallisesti esimerkin 2A-2 esityksen mukaisesti]), 2 μ l BSA (1 mg/ml) 29 μ l vettä, 1 μ l BamHI- (laimennettu vedellä suhteessa 1:4) restriktioentsyymiä ja 5 μ l reaktioseosta inkuboitiin 25°C:ssa 15 minuuttia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 50 μ l 4M ammoniumasetaattia ja 300 μ l 95-%:sta etanolia. Jäähdyttämisen jälkeen -20°C:ssa n. 2 tuntia, syntynyt DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä ja suspendoitiin sitten n. 10 μ l:ään TE-puskuria. Koska plasmidilla pEL105 on kaksi BamHI-pilkontakohtaa, saadaan kahden eri fragmentin seos.

2. Plasmidin PHI-18 BamHI-uutto

n. 5 μ l (5 μ g) plasmidia PHI-18, 2 μ l BSA (1 mg/ml), 9 μ l vettä, 1 μ l BamHI- (4 yksikköä/ μ l) restriktioentsyymiä ja 1,5 μ l reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa n. 2 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasetaattia ja 2,5 tilavuutta 95-%:sta etanolia seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin 70-%:sessa etanolissa ja suspendoitiin sitten n. 10 μ l:ään TE-puskuria.

3. Liitäntä

n. 5 μ l BamHI-uutettua plasmidia PHI-18, 8 μ l plasmidi pEL105 BamHI-osittaisuutetta, 27 μ l vettä, 5 μ l (4 mM) ATP, 5 μ l liitäntäseosta ja 2 μ l T4-DNA-ligaasia inkuboitiin 16°C:ssa n. 18 tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä 50 μ l 4M ammoniumasetaattia ja 200 μ l 95-%:sta etanolia. Inkuboinnin jälkeen -20°C:ssa n. 2 tuntia, haluttu plasmidi pBS1- ja pBS3-DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspendoitiin 10 μ l:ään TE-puskuria ja varastoitettiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten.

Koska plasmidilla pEL105 on kaksi BamHI-pilkonta-kohtaa, on osittaisesta BamHI-uutosta seurauksena kaksi n. 4,4 kb:n BamHI-osasta. Siten plasmidien pBS1 ja pBS3 insertio-isomeerit valmistuvat myös edellä kuvatulla menetelmällä. Syntyy yhdistelmäplasmideja, joilla on kaksi suuntausta, koska BamHI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankumpaan suuntaan. Kummankin plasmidin pBS1 ja pBS3 pilkontakohtien ja toiminnallinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 6.

10 J. Bacillus subtilis MI112/pBS1:n ja B. subtilis MI112/pBS3:n rakentaminen

Halutut rakenteet tehtiin pääasiallisesti esimerkin 2C menettelyn mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmideja pBS1 ja pBS3 eikä plasmidia pHI-18. Syntyneet 15 Bacillus subtilis MI112/pBS1- ja B. subtilis MI112/pBS3-klooriamfenikoliresistentit ja kanamysiini-herkät transformanttipesäkkeet eristettiin tunnettujen menetelmien mukaisesti, viljeltiin ja tunnistettiin sitten restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien agarosigeeli- 20 sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Bacillus subtilis MI112/pBS1 valikoitiin ja viljeltiin plasmidin pBS1 jälkeentulevaa eristämistä varten.

K. Plasmidien pOW527 ja pOW528 sekä E. coli K12 JA221/pOW527:n ja E. coli K12 JA221/pOW528:n 25 lopullinen rakentaminen

1. Plasmidien pBS1 ja pOW10 EcoRI-uutto
n. 4 µl (3 µg) pBS1, 1 µl (1 µg) pOW10, 5 µl vettä, 1 µl 10X EcoRI-puskuria ja 1,5 µl (joka sisälsi 5 New England Lab-yksikköä) EcoRI-restriktioentsyymiä, inkuboi- 30 boitiin 37°C:ssa 1,5 tuntia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia, EcoRI-uutettu DNA jäähdytettiin jäissä, saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 30 µl:ään vettä.

2. Plasmidin pBS1 ja pOW10 EcoRI-uutteiden liitäntä sekä E. coli K12 JA221/pOW527:n ja E. coli K12 JA221/pOW528:n rakentaminen 35

n. 30 μ l pBS1- ja pOW10-EcoRI-uutteita, 4 μ l (100 mM), 10X ditiotreitolia, 4 μ l (10 mM) ATP, 4 μ l 10X ligaasipuskuria ja 1 μ l (joka sisälsi 3 New England Bio Lab-yksikköä) T₄ DNA-ligaasia inkuboitiin 16°C:ssa n. 4 tuntia. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten, jäädyttämisen jälkeen jäissä, syntynyt liitetty DNA käytettiin transformoimaan E. coli K12 JA221 (NRRL B-15211), pääasiallisesti Lederberg'in ja Cohen'in (1974) transformointimenetelmän mukaisesti, TY-levyillä, jotka sisälsivät 10 μ g/ml tetrasykliiniä. Syntyneitä transformantteja viljeltiin tavalliseen tapaan (käytettiin) ja plasmidien pOW527 ja pOW528 myöhempiä tuotantoa ja eristämistä varten pääasiallisesti esimerkin 1A menettelyn mukaisesti.

Plasmidit pOW527 ja pOW528 voidaan tunnistaa ja erottaa toisistaan tavanomaiseen tapaan restriktioentsyymillä ja agaroosigeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Saadaan yhdistelmä-plasmideja, joilla on kaksi suuntausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankumpaan suuntaan. Kummankin plasmidin pOW527 ja pOW528 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

Esimerkki 3

Streptomyces ambofaciens/pOW527:n rakentaminen

Haluttu rakentaminen tehdään pääasiallisesti esimerkin 2H esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia pOW527 (valmistettu esimerkissä 2K) eikä plasmideja pEL105 ja pEL107. Syntyneet *Streptomyces*/pOW527 tiostreptoniresistentit pesäkkeet eristetään ja viljellään tunnettujen menetelmien mukaisesti. Näin rakennetut transformantit tuottavat pre-proinsuliinia solun sisäisesti ja ovat siten esimerkkinä tämän keksinnön menetelmästä. Tämä määritetään tavalliseen tapaan solulysaattien in vitro-analyysillä.

Esimerkki 4

Streptomyces ambofaciens/pOW528:n rakentaminen

Haluttu rakentaminen tehdään pääasiallisesti esimerkin 2H esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia pOW528 (valmistettu esimerkissä 2K) eikä plasmideja pEL105 ja pEL107. Syntyneet *Streptomyces ambofaciens*/pOW528 tiostreptoniresistentit pesäkkeet eristetään ja viljellään tunnettujen menetelmien mukaisesti. Näin rakennetut transformantit tuottavat pre-proinsuliinia solunsisäisesti ja ovat siten esimerkkinä tämän keksinnön menetelmästä. Tämä määritetään tavanomaiseen tapaan solu-lysaattien in vitro-analyysillä.

Esimerkki 5

Plasmidin pOW303 ja *E. coli* K12 BE904/pOW303:n rakentaminen

A. Plasmidin pOW10 NcoI-uutto

15 n. 2 μ l (2 μ g) plasmidia pOW10 (valmistettu esimerkissä 1D), TE-puskurissa, 2,5 μ l (100 mM) DTT, 0,5 μ l (1000 μ g/ml) BSA, 17 μ l vettä, 1 μ l (joka sisälsi neljä New England Lab-yksikköä) NcoI-restriktioentsyymiä ja 2,5 μ l 10X reaktioseosta* inkuboitiin 37°C:ssa 1,5 tun-
20 tia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia, uutettu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 34,5 μ l:ään vettä.

*Reaktioseos NcoI-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella:

25 1500 mM NaCl
60 mM Tris-HCl, pH 7
60 mM MgCl₂

B. Plasmidin pMC1403 BamHI-uutto

Haluttu uutto suoritettiin pääasiallisesti esimerkin
30 5A esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia pMC1403 ja BamHI-restriktioentsyymiä sekä reaktioseosta eikä plasmidia pOW10 ja NcoI-restriktioentsyymiä ja reaktioseosta. Plasmidi pMC1403 eristettiin *E. coli* K12 BE904/pMC1403:sta (NRRL B-15213) pääasiallisesti esimerkin
35 1A-1 esityksen mukaisesti. Uutettu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 34,5 μ l:ään vettä.

C. NcoI-uutetun plasmidin pOW10 ja BamHI-uutetun plasmidin pMC1043 Klenow-täyttö

Esimerkkien 5A ja 5B NcoI- ja BamHI-uutteet yhdistettiin (69 μ l) ja inkuboitiin sitten 4 μ l:n kanssa jokais-
 5 ta seuraavista dATP, dGTP, dCTP ja TTP, 5 μ l:n (joka sisälsi 10 yksikköä DNA polymeraasi I (Klenow) osasta* ja 10 μ l:n 10X Klenow-puskuria (0,5M Tris-HCl, pH 7,2, 0,1M MgSO₄, 1 mM DTT) kanssa 16°C:ssa 30 minuuttia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 65°C:ssa
 10 10 minuuttia, DNA saostettiin etanolilla, uutettiin kerran fenolilla ja kahdesti kloroformi/isoamyylialkoholilla (24:1) ja saostettiin sitten uudelleen etanolista. Klenow-täytetty DNA liuotettiin 20 μ l:ään vettä myöhem-
 pään EcoRI-uuttoa varten.

15 *DNA polymeraasi I:n Klenow-osanen voidaan saada seuraavasta lähteestä:

Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive, Indianapolis, Indiana 46250

20 D. Klenow-täytettyjen NcoI- ja BamHI-osasten EcoRI-uutto

n. 20 μ l (4 μ g) Klenow-täytettyä DNA:ta, 5 μ l (100 mM) DTT, 5 μ l (1000 mg/ml) BSA, 2 μ l (joka sisälsi 10 New England Bio Lab-yksikköä) EcoRI-restriktioentsyymiä ja 5 μ l (10X) reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa
 25 1 tunti ja sitten 65°C:ssa 10 minuuttia. Syntynyt EcoRI-uutettu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 30 μ l:ään vettä.

E. EcoRI-uutettujen Klenow-täytettyjen NcoI- ja BamHI-osasten liitäntä ja E. coli Kl2 BE904/
 30 pOW303:n rakentaminen

n. 30 μ l EcoRI-uutettuja Klenow-täytettyjä osasia, 4 μ l (100 mM) DTT, 4 μ l (100 mM) ATP, 4 μ l 10X ligaasi-puskuria ja 1 μ l (joka sisälsi 10 New England Bio Lab-yksikköä) T₄ DNA-ligaasia inkuboitiin 16°C:ssa n. 16
 35 tuntia ja sitten 65°C:ssa 10 minuuttia. Jäissä jäähdyt-
 tämisen jälkeen käytettiin n. 15 μ l syntynyttä liitettyä

DNA:ta, joka tässä on nimetty plasmidiksi pOW303, transformoimaan E. coli K12 BE904 (NRRL B-15212). Tämä tehtiin pääasiallisesti esimerkin 1D menetelmän mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia pOW303 eikä plasmidia pOW10 ja 80 µg/ml ampisilliinia tetrasykliinin asemasta. Lisäksi TY-levyt sisälsivät 40 µg/ml 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galaktosidia (x-gal), niin että väriä voitiin käyttää sopivana β -galaktosidaasi-aktiivisuuden määrittämisenä. Syntyneet siniset ja ampisilliiniresistentit transformantit muodostivat halutun E. coli K12 BE904/pOW303:n. Transformantteja viljeltiin käyttäen tavanomaisia mikrobiologisia menetelmiä ja käytettiin plasmidin pOW303 myöhempää tuotantoa ja eristämistä varten pääasiallisesti esimerkin 1A-1 menetelmän mukaisesti. Plasmidin pOW303 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

Esimerkki 6

Plasmidien pOW529 ja pOW530 sekä E. coli K12 BE904/pOW529:n ja E. coli K12 BE904/pOW530:n rakentaminen Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkkien 2K-1 ja 2K-2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia pOW303 eikä plasmidia pOW10 ja että käytetään 80 µg/ml ampisilliinia tetrasykliinin asemasta. Lisäksi TY-levyt sisältävät 40 µg/ml x-gal, niin että väriä voidaan käyttää β -galaktosidaasiaktiivisuuden sopivana määrittämisenä. Syntyy yhdistelmä-plasmideja, joilla on kaksi suuntausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankumpaan suuntaan. Plasmidit pOW529 ja pOW530 eristettiin tavalliseen tapaan, erotettiin toisistaan ja tunnistettiin restriktioentsyymillä ja agarosegeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Kummankin plasmidin pOW529 ja pOW530 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

Esimerkki 7

Streptomyces ambofaciens/pOW529:n ja Streptomyces ambofaciens/pOW530:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 2H esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään vastaavasti plasmideja pOW529 ja pOW530 ja LAC⁻ Streptomyces ambofaciens'ia, kantaa, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, josta sitä on yleisön saatavissa saantinumerolla 15263, eikä plasmideja pEL105 ja pEL107 eikä LAC⁺ Streptomyces ambofaciens'ia (NRRL 2420). Lisäksi modifioidut R2-levyt (Baltz, 1978) sisältävät 40 µg/ml x-gal, niin että väriä voidaan käyttää β-galaktosidaasiaktiivisuuden sopivana määrittämisnä. Molemmat transformantit antavat tummansinisiä pesäkkeitä, mikä osoittaa, että geeni, joka koodaa β-galaktosidaasia, ekspressoituu Streptomyces:essä. Siten nämä rakentelut ovat lisäesimerkkeinä tästä keksinnöstä. β-galaktosidaasiaktiivisuus vahvistetaan lisäksi tavanomaisesti in vitro-analyysillä.

Esimerkki 8

Plasmidin pOW301 ja E. coli K12 BE904/pOW301:n rakentaminen

A. Plasmidin pMS480 EcoRI-BamHI-uutto

Haluttu uutto suoritettiin pääasiallisesti esimerkin 1A-2 esityksen mukaisesti paitsi että käytettiin BamHI-restriktioentsyymiä eikä SfaNI-restriktioentsyymiä. Osaset liuotettiin n. 10 µl:ään vettä ja käytettiin ilman enempää puhdistamista.

B. Plasmidin pMC1403 EcoRI-BamHI-uutto

Haluttu uutto suoritettiin pääasiallisesti esimerkin 1A-2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin BamHI-restriktioentsyymiä ja plasmidia pMC1403 (eristetty esimerkissä 5B) eikä SfaNI-restriktioentsyymiä ja plasmidia pMS480. Osaset liuotettiin n. 10 µl:aan vettä ja käytettiin ilman enempää puhdistamista.

C. Plasmidien pMS480 ja pMC1403 EcoRI-BamHI-uut-

teiden liitäntä
n. 10 µl plasmidi pMS480-EcoRI-BamHI-uutetta, 10 µl

plasmidi pMC1403-EcoRI-BamHI-uutetta, 3 μ l (100 mM) DTT, 10 μ l vettä, 3 μ l (10 mM) ATP, 3 μ l liitântäseosta* ja 1 μ l T₄ DNA-ligaasia (joka sisälsi n. 400 New England Bio Lab-yksikköä) inkuboitiin n. 12 tuntia. Reaktio lopetettiin
 5 inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten, jäissä jäädyttämisen jälkeen, syntynyt liitetty seos käytettiin transformoimaan E. coli BE904 (NRRL B-15212) pääasiallisesti Lederberg'in ja Cohen'in, 1974, transformointimenetelmän mukaisesti TY-levyillä, jotka sisälsivät 80 μ g/ml
 10 ampisilliinia.

Jotkut syntyneistä transformanteista, kuten tavanomaisesti osoitettiin agarosigeeli-sähköforeesilla ja muilla testeillä, sisälsivät halutun n. 10,3 kb:n plasmidin. Tällainen transformantti, joka tässä on nimetty
 15 E. coli BE904/pOW301:ksi, valikoitiin, levitettiin TY-agar-levyille, jotka sisälsivät 40 μ g/ml antibioottia ampisilliini ja viljeltiin sitten käyttäen tavanomaisia mikrobiologisia menetelmiä. Syntyneet solut käytettiin plasmidin pOW301 eristämiseen pääasiallisesti esimerkin
 20 1A-1 menetelmän mukaisesti.

*Liitântäseos valmistettiin seuraavalla koostumuksella:

500 mM Tris-HCl, pH 7,8

100 mM MgCl₂

25 Esimerkki 9

veg-Promoottori ja geeni, joka koodaa β -galaktosidaasiaktiivisuutta, eivät ole translationaalisessa lukusuunnassa plasmidissa pOW301. Sen tähden plasmidia pOW301 modifioitiin niin, että edellä mainittu lukusuunta
 30 korjattiin. Tämä tehtiin seuraavassa esitetyn menettelyn mukaisesti ja tuloksena saatiin plasmidi pOW302.

Plasmidin pOW302 rakentaminen

A. Plasmidin pOW301 BamHI-uutto

n. 10 μ l (10 μ g) plasmidia pOW301 TE-puskurissa,
 35 1 μ l DTT (100 mM ditiotreitolia), 1 μ l (1000 μ g/ml) BSA,
 1 μ l (joka sisälsi 16 New England Bio Lab-yksikköä) BamHI-

restriktioentsyymiä ja 1,5 μ l 10X reaktioseosta* inkuboi-
 tiin 37°C:ssa n. 1,5 tuntia. Reaktio lopetettiin inkuboi-
 malla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten reaktioseos jääh-
 dytettiin jäässä, uutettiin sekä fenolilla että kloro-
 5 formi/isoamyylialkoholilla (24:1), saostettiin etanolilla
 ja liuotettiin sitten 69 μ l:ään vettä.

*Reaktioseos BamHI-restriktioentsyymille valmistet-
 tiin seuraavalla koostumuksella:

1,5 M NaCl
 10 60 mM Tris-HCl, pH 7,9
 60 mM MgCl₂
 B. pOW301-lineaarisen DNA:n käsittely Klenow-
 osasella ja lopullinen liitäntä
 n. 69 μ l pOW301 lineaarista DNA:ta, 10 μ l 10X
 15 puskuria (0,5 M Tris, pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 4 μ l jokaista
 seuraavista (200 mM) dCTP, dATP, TTP ja dGTP ja 5 μ l
 (joka sisälsi 10 Boehringer-Mannheim-yksikköä) DNA-poly-
 meraasi I suurta (Klenow)-fragmenttia inkuboitii 16°C:ssa
 30 minuuttia. Lämpö-inaktivoimisen jälkeen 65°C:ssa 10
 20 minuutin aikana DNA saostettiin etanolilla, liuotettiin
 20 μ l:ään vettä ja liitettiin sitten antamaan haluttu
 plasmidi pOW302. Liitäntä suoritettiin saattamalla n.
 20 μ l Klenow-käsiteltyä DNA:ta, 3 μ l (100 mM) DTT, 3 μ l
 (10 mM ATP, 3 μ l liitäntäpuskuria ja 1 μ l (joka sisälsi
 25 400 New England Bio Lab-yksikköä) T₄ DNA-ligaasia rea-
 goimaan 16°C:ssa 2 tunniksi. N. 10 μ l liitäntäseosta
 käytettiin transformoimaan E. coli Kl2 BE904 pääasialli-
 sesti esimerkin 1C esityksen mukaisesti. Kehittyi sinisiä
 pesäkkeitä, jotka osoittivat, että veg-promoottori ja
 30 geenin, joka koodaa β -galaktosidaasi-aktiivisuutta, olivat
 translationaalisessa lukusuunnassa. Plasmidin pOW302
 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten
 kuvassa 3.

Esimerkki 10

35 Plasmidien pOW539 ja pOW540 sekä E. coli Kl2
 BE904/pOW539:n ja E. coli Kl2 BE904/pOW540:n
 rakentaminen

Halutut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esimerkkien 2K-1 ja 2K-2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia pOW302 eikä plasmidia pOW10 ja käytettiin 80 µg/ml ampisilliinia tetrasykliinin asemesta.

5 Lisäksi TY-levyt sisälsivät 40 µg/ml x-gal, niin että väriä voitiin käyttää β-galaktosidaasiaktiivisuuden sopivana määrittämisnä. Syntyi yhdistelmä-plasmideja, joilla oli kaksi suuntausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankumpaan suuntaan. Syntyneet transformantit

10 eristettiin tavalliseen tapaan, viljeltiin, tunnistettiin restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien agarosegeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982) ja käytettiin plasmidien pOW539 ja pOW540 myöhempää tuotantoa varten. Kummankin plasmidin pOW539 ja pOW540 pilkonta-

15 kohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 3.

Esimerkki 11

Streptomyces ambofaciens/pOW539:n ja *Streptomyces ambofaciens*/pOW540:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään kumpikin yksilöllisesti pääasiallisesti esimerkin 2H esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään vastaavasti plasmideja pOW539 ja pOW540 sekä LAC⁻ *Streptomyces ambofaciens*'ia (NRRL 15263) eikä plasmideja pEL105 ja pEL107 eikä LAC⁺ *Streptomyces ambofaciens*'ia (NRRL 2420). Lisäksi modifioidut R2-levyt

20 (Baltz, 1978), sisältävät 40 µg/ml x-gal, niin että väriä voidaan käyttää β-galaktosidaasiaktiivisuuden sopivana määrittämisnä. Kumpikin transformantti antaa tummansiniset pesäkkeet, mikä osoittaa, että geeni, joka koodaa β-galaktosidaasiaktiivisuutta, ekspressoituu *Streptomyces*:essä. Siten nämä rakentelut ovat edelleen esimerkkinä tämän keksinnön menetelmästä. β-galaktosidaasiaktiivisuus vahvistetaan lisäksi tavanomaisesti in vitro-analyysillä.

25

30

Esimerkki 12

DNA-osasen

35

5'	A	G	T	G	A	G	G	T	G	G	A	T	R	C	3'		
3'					T	C	C	A	C	C	T	A	R ¹ G	R ² T	A	C	5'

jossa R on C ja R^1 on G ja R^2 on G, rakentaminen.

Haluttu rakentaminen käsittää seuraavassa esitettyjen oligonukleotidien T_3 ja T_4 synteesin ja 5'-fosforyloinnin.

5 T_3 5' AGTGAGGTGGATCC 3'

T_4 5' CATGGGATCCACCT 3'

Oligonukleotideja T_3 ja T_4 käytettiin halutun DNA-osasen rakentamiseen, jolla on NcoI-komplementaarinen pää BamHI-
10 pilkontakohdan vieressä. Oligonukleotidi-synteesi suoritettiin tavanomaisesti modifioidulla fosfotriesteri-menetelmällä käyttäen täysin suojattuja deoksiribonukleotidirakenneryhmiä. Haluttu rakentaminen tehtiin pääasiallisesti esimerkin 1C esityksen mukaisesti.

15 Esimerkki 13

Plasmidin pOW11 ja E. coli K12 JA221/pOW11:n rakentaminen

Halutut rakenteet tehdään pääasiallisesti esimerkin 1 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään esimerkin 12
20 BamHI-pilkontakohdan sisältävää DNA-osasta eikä esimerkin 1C DNA-osasta. Plasmidin pOW11 pilkontakohtien kartta on samanlainen, paitsi edellä mainittua BamHI-kohtaa, kuin on esitetty plasmidille pOW10 kuvassa 1 oheisissa piirroksissa.

25 Esimerkki 14

Plasmidien pOW533 ja pOW534 sekä E. coli K12 JA221/pOW533:n ja E. coli K12 JA221/pOW534:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
30 merkin 2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia pOW11 eikä plasmidia pOW10. Kummankin plasmidin pOW533 ja pOW534 pilkontakohtien kartta on vastaavasti samanlainen, lukuunottamatta edellä mainitulle lisä-BamHI-kohdalle pOW11-osasesta, kuin plasmideille pOW527 ja
35 pOW528 on oheisten piirrosten kuvassa 1 esitetty.

Esimerkki 15

Streptomyces ambofaciens/pOW533:n ja Streptomyces ambofaciens pOW534:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään vastaavasti pääasialli-
 5 sesti esimerkkien 3 ja 4 esitysten mukaisesti, paitsi
 että käytetään vastaavasti plasmideja pOW533 ja pOW534
 eikä plasmideja pOW527 ja pOW528.

Esimerkki 16

Plasmidin pOW310 ja E. coli Kl2 BE904/pOW310
 10 rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
 merkin 5 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
 plasmidia pOW11 eikä plasmidia pOW10. Plasmidin pOW310
 pilkontakohtien kartta on samanlainen, lukuunottamatta
 15 edellä mainitulle lisä-BamHI-kohdalle pOW11-osasesta,
 kuin on esitetty plasmidille pOW303 oheisten piirrosten
 kuvassa 2.

Esimerkki 17

Plasmidien pOW537 ja pOW538 sekä E. coli Kl2 BE904/
 20 pOW537:n ja E. coli Kl2 BE904/pOW538:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti
 esimerkin 6 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
 plasmidia pOW310 eikä plasmidia pOW303. Kummankin plas-
 midin pOW537 ja pOW538 pilkontakohtien kartta on vastaa-
 25 vasti samanlainen, lukuunottamatta edellä mainitulle
 lisä-BamHI-kohdalle pOW310-osasesta, kuin plasmideille
 pOW529 ja pOW530 oheisten piirrosten kuvassa 2 esitetty.

Esimerkki 18

Streptomyces ambofaciens/pOW537:n ja Streptomyces
 30 ambofaciens/pOW538:n rakentaminen

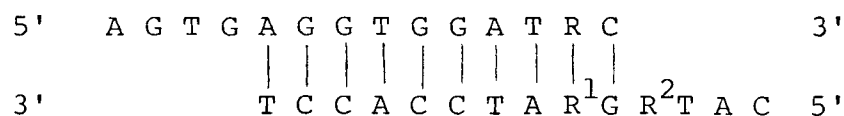
Halutut rakentelut tehdään kumpikin erikseen pää-
 asiallisesti esimerkin 7 esityksen mukaisesti, paitsi
 että käytetään plasmideja pOW537 ja pOW538 ja LAC⁻
 Streptomyces ambofaciens'ia (NRRL 15263) eikä plasmideja
 35 pOW529 ja pOW530 eikä LAC⁺ Streptomyces ambofaciens'ia
 (NRRL 2420).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä funktionaalisen polypeptidin ekspres-
soimiseksi Streptomyces:essä, t u n n e t t u siitä,
5 että transformoidaan Streptomyces-isäntäsolu yhdistelmä-
DNA-ekspressoimisvektorilla, joka vektori käsittää
1) homologisen Bacillus-promoottorin,
2) luonnossa esiintyvän tai modifioidun Bacillus-
ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin ja
10 3) geenin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä,
ja viljellään tätä transformoitua Streptomyces-solua
kasvuolosuhteissa, niillä rajoituksilla, että vektori
replikoituu ja on valikoitavissa transformoidussa
Streptomyces-solussa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi
15 ohjaavat tämän geenin transkriptiota ja ekspressoitu-
mista transformoidussa Streptomyces-isäntäsolussa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-ekspressoii-
misvektori käsittää

20 1) ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin



jossa

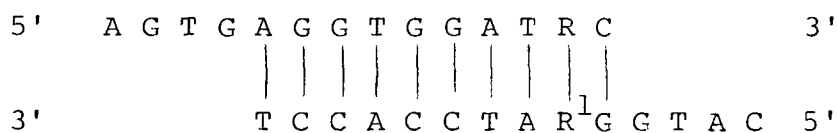
25 A on deoksiadenyyli,
G on deoksiguanyyli,
C on deoksisytosyyli,
T on tymidyyli,
R on G tai C,
30 R¹ on G tai C, ja
R² on G tai T, ja

2) promoottori on Bacillus subtiliksen veg-promoottori,
sillä lisärajoituksella, että (1) R ja R¹ eivät saman-
aikaisesti ole sama deoksiribonukleotidi ja (2) kun R² on
35 T, silloin on R G ja R¹ on C.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,

t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori on plasmidi pOW527, pOW528, pOW529, pOW530, pOW533, pOW534, pOW537, pOW538, pOW539 tai pOW540.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi on



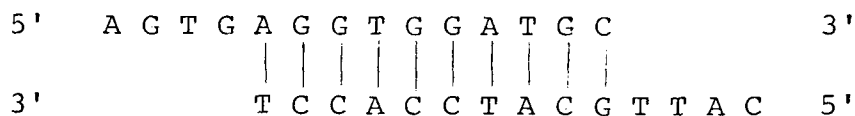
10 jossa

A on deoksiadenyyli,
G on deoksiguanyyli,
C on deoksisytosyyli,
T on tymidyyli,
15 R on G tai C ja
R¹ on G tai C

sillä rajoituksella, että R ja R¹ eivät samanaikaisesti ole sama deoksiribonukleotidi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori on plasmidi pOW527, pOW528, pOW529, pOW530, pOW533, pOW534, pOW537 tai pOW538.

6. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi on
25



jossa

30 A on deoksiadenyyli,
G on deoksiguanyyli,
C on deoksisytosyyli ja
T on tymidyyli.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori on plasmidi pOW539 tai pOW540.

8. Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää

1) ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-
sekvenssin

```

5          5'   A G T G A G G T G G A T G C           3'
              | | | | | | | |
              3'   T C C A C C T A C G T T A C       5'

```

jossa

10 A on deoksiadenyyli,
 G on deoksiguanyyli,
 C on deoksisytosyyli,
 T on tymidyyli, ja

2) että promoottori on Bacillus subtiliksen
veg-promoottori, joka vektori on läsnä Streptomyces-
15 isäntäsolussa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen vektori,
t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi pOW539
tai pOW540.

10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen vektori,
20 joka on läsnä Streptomyces ambofaciens'issa.

1. Förfarande för expressering av en funktionell polypeptid i *Streptomyces*, k ä n n e t e c k n a t

5 därav, att en *Streptomyces*-värdcell transformeras med en rekombinant-DNA-expressionsvektor, vilken vektor består av

1) en homolog *Bacillus*-promotor,

2) en naturligt förekommande eller modifierad *Bacillus*

10 ribosombindningsställe innehållande DNA-sekvens, och

3) en gen som koderar för en funktionell polypeptid, och att den transformerade *Streptomyces*-cellen odlas under växtbetingelser, med de begränsningarna, att vektorn reproduceras och är utväljbar i den transformerade

15 *Streptomyces*-cellen och att promotorn och DNA-sekvensen styr transkriptionen och expressionen av denna gen i den transformerade *Streptomyces*-värdcellen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-expressionsvektorn består av

20 vektorn består av

1) DNA-sekvensen som innehåller bindningsställe för ribosom

25

5'	A	G	T	G	A	G	G	T	G	G	A	T	R	C	3'			
3'					T	C	C	A	C	C	T	A	R ¹	G ²	T	A	C	5'

där

A är deoxiadenyl,

G är deoxiguanyll,

C är deoxicytosyl,

30 T är tymidyl,

R är G eller C,

R¹ är G eller C, och

R² är G eller T,

och att

35 2) promotorn är veg-promotorn av *Bacillus subtilis*, med det ytterligare förbehållet, att (1) R och R¹ inte

samtidigt är samma deoxiribonukleotid och (2) när R^2 är T, då är R G och R^1 är C.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-expressionsvektorn är plasmid pOW527, pOW528, pOW529, 5 pOW530, pOW533, pOW534, pOW537, pOW538, pOW539 eller pOW540.

4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den ribosombindnings- 10 ställe innehållande DNA-sekvensen är

```

5'  A G T G A G G T G G A T R C          3'
      | | | | | | | |
3'          T C C A C C T A R1 G G T A C    5'

```

där

15 A är deoxiadenyl,
G är deoxiguanyl,
C är deoxicytosyl,
T är tymidyl,
R är G eller C och
20 R^1 är G eller C

med den begränsningen, att R och R^1 inte samtidigt är samma deoxiribonukleotid.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-expressions- 25 vektorn är plasmid pOW527, pOW528, pOW529, pOW530, pOW533, pOW534, pOW537 eller pOW538.

6. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att den ribosom- bindningsställe innehållande DNA-sekvensen är

```

30 5'  A G T G A G G T G G A T G C          3'
      | | | | | | | |
3'          T C C A C C T A C G T T A C    5'

```

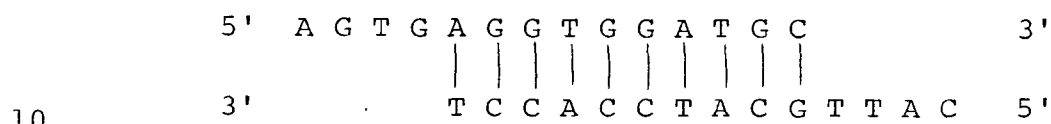
där

35 A är deoxiadenyl,
G är deoxiguanyl,
C är deoxicytosyl och
T är tymidyl.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-expressions-
vektorn är plasmid pOW539 eller pOW540.

8. Rekombinant-DNA-expressionsvektor, k ä n n e -
5 t e c k n a d därav, att den består av

1) DNA-sekvensen som innehåller bindningsstället för
ribosom



där

 A är deoxiadenyl,
 G är deoxiguanyl,
 C är deoxicytosyl,
15 T är tymidyl,

och att

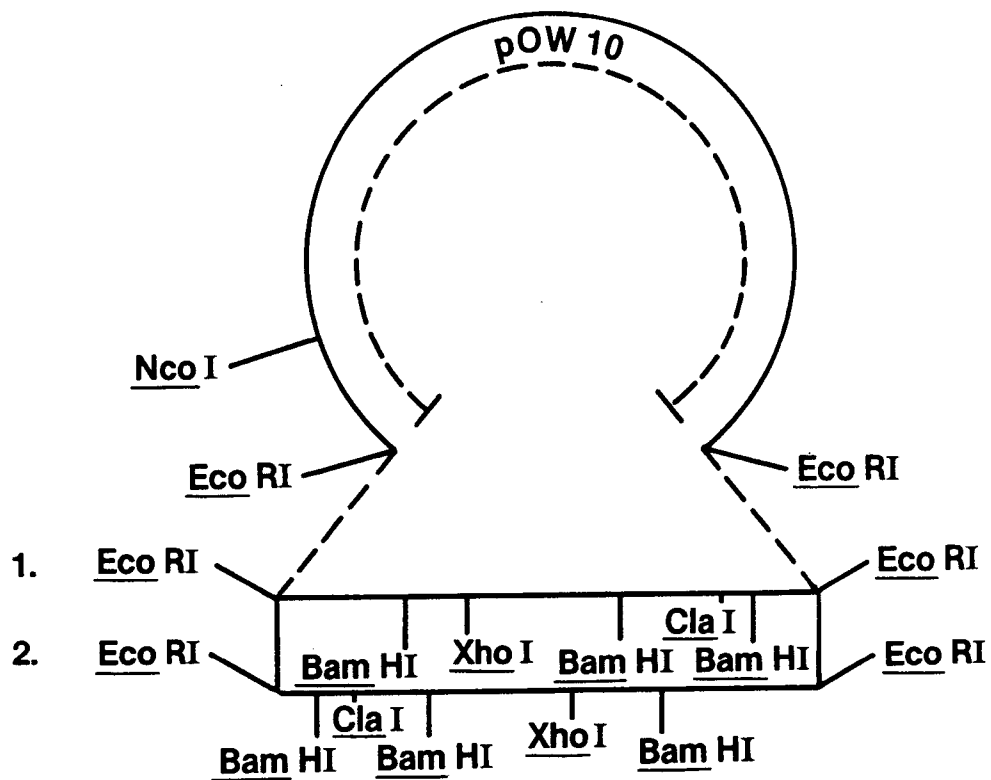
2) promotorn är veg-promotorn av *Bacillus subtilis*,
närvarande i en *Streptomyces*-värdcell.

9. Vektor enligt patentkravet 8 som är plasmid
20 pOW539 eller pOW540.

10. Vektor enligt patentkravet 8 eller 9 när-
varande i *Streptomyces ambofaciens*.

FIG. 1

PLASMIDIEN POW 527 JA POW 528 PILKONTA-KOHTIEN KARTTA



1. pOW 527 (~12.8 kb)
2. pOW 528 (~12.8 kb)

PLASMIDIEN POW 529 JA POW 530 PILKONTA-
KOHTIEN KARTTA

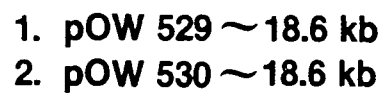
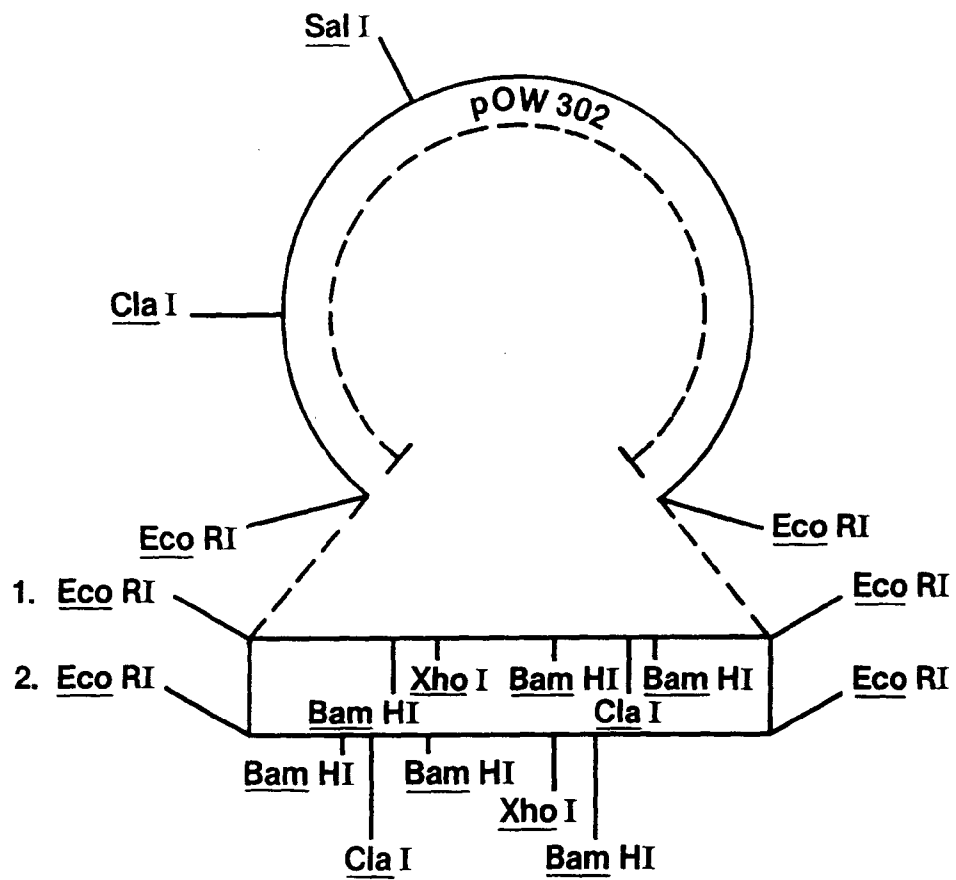


FIG. 3

PLASMIDIEN POW 539 JA POW 540 PILKONTA-
KOHTIEN KARTTA



1. POW 539 (~17 kb)
2. POW 540 (~17 kb)

SYNTEESIMENETELMÄ OSASELLE T₁

FIG. 5

PLASMIDIEN pEL 107 JA pEL 105 PILKONTA-KOHTIEN KARTTA

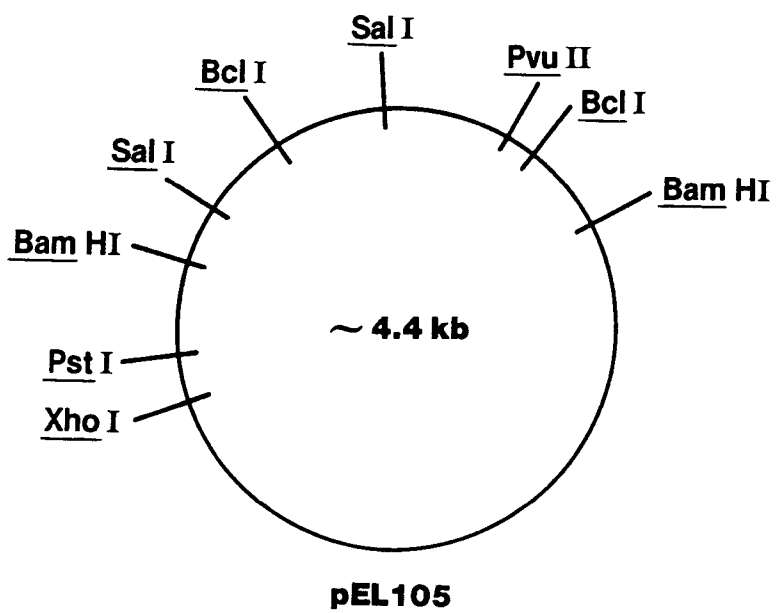
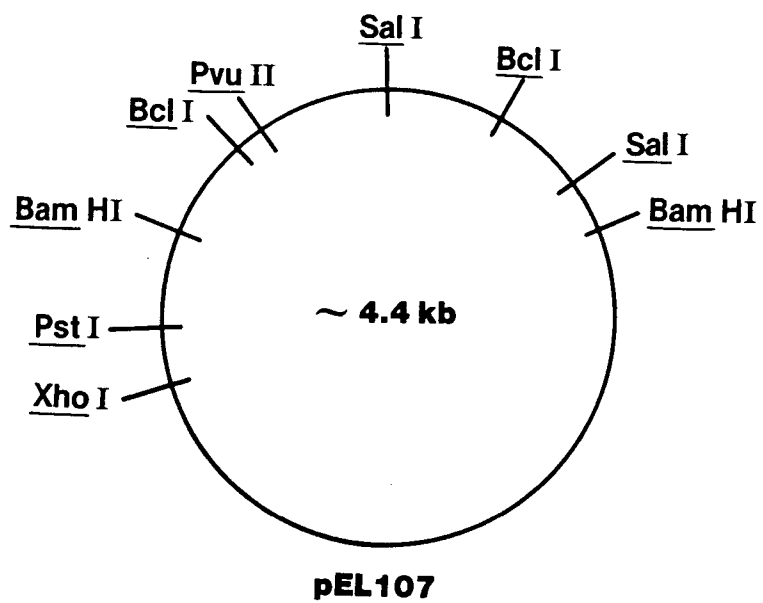
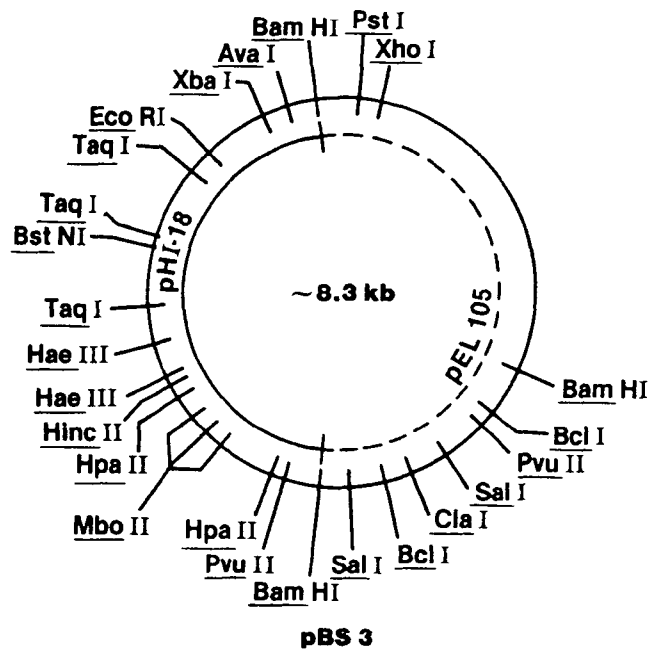
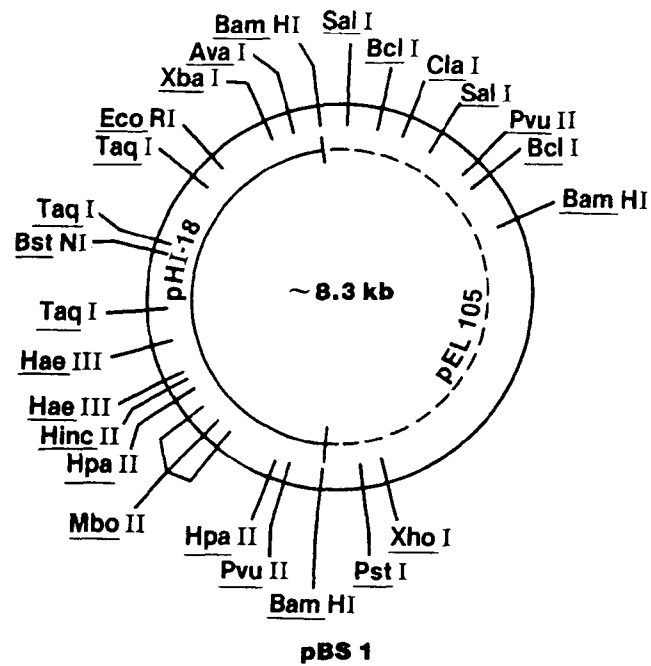


FIG. 6

PLASMIDIEN pBS1 JA pBS3 PILKONTAKOHTIEN KARTTA



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

24/2-86 F. Kiviranta

Allekirjoitus