



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**216 075 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 92 03485  
(22) A bejelentés napja: 1992. 03. 06.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
067 774/91 1991. 03. 08. JP  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/JP 92/00267  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/15692

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 12 N 15/74**

C 12 N 1/21

(40) A közzététel napja: 1994. 07. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Hagiwara, Hideaki, Hyogo (JP)  
Takeshima, Yasunobu, Hyogo (JP)

(73) Szabadalmaz:

Hagiwara, Yoshihide, Hyogo (JP)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

### **Eljárás új ingázó vektor plazmid és az azzal transzformált cianobaktérium-sejt előállítására**

#### **KIVONAT**

A találmány szerinti eljárással előállított, *Escherichia coliban* és cianobaktériumokban replikálódni képes ingázó vektor plazmid tartalmaz

- (a) egy *Anacystis nidulans*-ból származó pBA1 plazmid OriA régiót,
- (b) egy többszörös klónozórégiót és
- (c) egy colicin E1 plazmid régiót, amely a plazmid OriE régióját tartalmazza, és amelyből a plazmid rop régiója által definiált gén el van távolítva.

A fenti plazmidot az (a), (b) és (c) régió szokásos módon végzett összekapcsolásával állítják elő.

A találmány tárgya továbbá eljárás transzformált cianobaktérium-sejt előállítására a fenti ingázó vektor plazmid alkalmazásával.

A találmány új plazmid, közelebből egy mind *Escherichia coli*, mind cianobaktérium-sejtekben replikálódni képes ingázó vektor plazmid előállítására vonatkozik, amely egy cianobaktériumból, az *Anacystis nidulans*-ból származó pBA1 plazmid OriA régióját tartalmazó DNS-fragmenst tartalmaz. A találmány tárgya továbbá eljárás a fenti plazmiddal transzformált cianobaktérium-sejtek előállítására.

Az *Anacystis nidulans* cianobaktérium a magasabb rendű növényekéhez, különösen a vörös algákéhoz hasonló fotoszintetikus mechanizmussal rendelkezik, és képes vízből, szén-dioxidból és egyszerű szervetlen sókból szerves anyagokat bioszintetizálni, ezáltal autotróf módon szaporodni. Ezenkívül az *A. nidulans* egysejtű, agar tápközegen telepeket képez, és különösen az R2 törzs hajlamos a sejtjeibe DNS-t felvenni, ennek megfelelően mikrobiológiai és genetikai módszerekkel transzformálható.

Újabban az *A. nidulans* R2 törzsben endogén plazmidok alkalmazásával több klónozóvektort (például a pUH24-et és a pUH25-öt) is kifejlesztettek [C. A. M. J. J. von der Hondel és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(3), 1570–1574 (1980); C. J. Kuhlemeier és munkatársai, *Mol. Gen. Genet.* 184, 149–154 (1981); L. A. Sherman és P. van de Putte, *J. Bacteriol.* 150(1), 410–413 (1982); S. Gendel és munkatársai, *J. Bacteriol.* 156(1), 148–154 (1983); S. S. Golden és L. A. Sherman, *J. Bacteriol.* 155(3), 966–972 (1983); C. J. Kuhlemeier és munkatársai, *Plasmid* 10, 156–163 (1983); C. J. Kuhlemeier és munkatársai, *Gene* 31, 109–116 (1984); D. E. Laudénbach és munkatársai, *Mol. Gen. Genet.* 199, 300–305 (1985); M. Y. Gruber és munkatársai, *Curr. Microbiol.* 15, 265–268 (1987) stb.], és ezeket például idegen gének bevitelére és gének klónozására alkalmazták.

Az R2 törzs alkalmazásával expresszált heterogén proteinekre példaként említhetjük a humán szénsav-anhidrázt és az *Escherichia coli* lac IQ represszor proteint [G. D. Price és M. R. Badger, *Plant Physiol.* 91, 505–513 (1989)], a *Bacillus amyloliquefaciens* A50  $\alpha$ -amilázt [I. V. Elanskaya és I. B. Morzunova, *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 0(9), 7–1 (1989)], a *B. sphaericus* 1593M inszekticid proteinjét [N. Tandeau de Marsac és munkatársai, *Mol. Gen. Genet.* 209, 396–398 (1987)], az *Escherichia coli*  $\beta$ -galaktozidázt [D. J. Scanlan és munkatársai, *Gene* 90, 43–49 (1990); M. R. Scafer és S. S. Golden, *J. Bacteriol.* 171(7), 3973–3981 (1989)], az *Escherichia coli* Mn-szuper-oxid-diszmutázt [M. Y. Gruber és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2608–2612], a lambda fág  $cI^{ts}$  represszor proteint [D. Friedberg és J. Seiffers, *Mol. Gen. Genet.* 203, 505–510 (1986)], a cianobaktérium *Syn echosystis* PCC 6803 (des A) diszaturázt [H. Wada és munkatársai, *Nature* 347, 200–203 (1990)] stb.

Másrészről kifejlesztették az *A. nidulans* 6301 törzset, annak endogén plazmid (pBA1) vektorait (*Escherichia coli*-val ingázó vektorok), például a pBAS18-at [12 kb, K. Shinozaki és munkatársai, *Gene* 19, 221–225 (1985)] és a pBAS5-öt [14 kb, Kazuo Shinozaki, „Shokubutsu Idenshi Sosa Gijutsu” (Plant Gene Manipula-

tion Techniques), lektorálta Hikoyuki Yamaguchi, 98–110. oldal, CMC kiadás] felhasználva. Azonban a vektorok mindegyikével problémák vannak a génszé-  
5 zeti módosításokban, például az, hogy a fenti vektorok bármelyikébe beilleszthető gén mérete korlátozott, mivel annak hosszúsága 10 kb vagy annál nagyobb, és az  
10 egyes vektorokban csak kevés klónozásra alkalmas restrikciósendonukleáz-felismerő hely van. Ezenkívül a 6301 törzs hátránya, hogy az R2 törzshöz viszonyítva nem könnyen vesz fel DNS-t a sejtjébe, ennek követke-  
15 tében a transzformáció gyakorisága kisebb, mint az R2 törzs esetében. A 6301 törzs transzformációs gyakoriságának fokozására H. Daniell és munkatársai [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2546–2550 (1986)] a 6301 törzset EDTA/lizozimmal kezelték a sejtek perme-  
20 plasztikussá alakítására, amivel megkönnyítették a DNS sejtbe való bevitelét. Ténylegesen sikerült megnövelniük a 6301 törzs transzformációs gyakoriságát ezzel a módszerrel, de problémát jelentett például az, hogy a művelet időigényes és bonyolult, és az EDTA/lizozimes kezelés a sejteket károsítja.

Ezért az *A. nidulans* 6301 transzformációs gyakori-  
ságának növelése, génszé-  
25 zeti eljárásokban könnyen kezelhető plazmid szerkesztése stb. céljából először is közelebből megvizsgálva egy plazmid méretcsökken-  
tésének lehetőségeit, sikerült az *A. nidulans* 6301 törzs transzformációs gyakoriságának jelentős növelésére ké-  
pes plazmidot előállítanunk a 6301 törzs egy endogén plazmidja (pBA1) replikációs iniciációs régiójától el-  
30 térő részeinek lehető legkisebbre csökkentésével, és az így kapott alaplazmid olyan DNS-fragmenssel való egyidejű kombinálásával, amely az *Escherichia coli* Col. E1 plazmidjának replikációs iniciációs régióját (OriE régió) tartalmazza, amelyből a rop régió (ezt a régiót rom régió-  
35 nak is nevezik, de a leírásban rop régió-  
nak nevezzük) által definiált gén el van távolítva, továbbá a pUC18 többszörös klónozóregiójának alkalmazá-  
sával.

A találmány tehát *Escherichia coli*-ban és cianobak-  
tériumokban replikálódni képes ingázó vektor plazmid  
40 előállítására szolgáló eljárásra vonatkozik, amelyre jellemző, hogy

- a) egy *Anacystis nidulans*-ból származó pBA1 plazmid OriA régiót,
- 45 b) egy többszörös klónozóregiót és
- c) egy colicin E1 plazmid régiót – amely a plazmid OriE régióját tartalmazza, és amelyből a plazmid rop régiója által definiált gén el van távolítva – szokásos géntechnológiai eljárásokkal összekapso-  
50 lunk.

A találmány szerinti eljárással előállított plazmidot részletesen alább ismertetjük.

A találmány szerinti eljárással előállított plazmid egyik összetevője, az *Anacystis nidulans*-ból származó pBA1 plazmid OriA régiója (továbbiakban néhány helyen OriA-nak rövidítjük) a pBA1 plazmidból szár-  
55 mazó replikációs iniciációs régiót tartalmazó gén-  
fragmens, amely elektronmikroszkópos analízis szerint  $(5,04 \pm 0,26) \times 10^6$  móltömegű, agarózgélelektro-  
60 forézis-analízis szerint  $5,2 \times 10^6$  móltömegű plazmid

[K. Shinozaki és munkatársai, *Gene* 19, 221–224 (1982)] a *Cloococcus* nembe, a kék algák közé tartozó *Anacystis nidulans* 6301 (*Synechococcus* PPC 6301, ATCC 27 144, UTEX 625 törzs) két endogén plazmidja között, és mérete általában 2,8–8,0 kb, előnyösen 2,8–4,4 kb. Közelebbi példaként említünk egy mintegy 4,4 kb méretű, az OriA régiót tartalmazó DNS-fragmenst, amelyet a pBA1 XhoI és BamHI restrikciós endonukleázokkal való hasításával kapunk, és egy mintegy 3,3 kb méretű, az OriA régiót tartalmazó DNS-fragmenst, amelyet a pBA1 PvuII és BamHI restrikciós endonukleázokkal való hasításával kapunk stb.

A többszörös klónozóhely (amelynek rövidítése a továbbiakban néhány helyen MC régió) olyan – polilinkernek is nevezett – szekvencia, amely több restrikciósendonukleáz-felismerő helyet tartalmaz. Ennek egyik példája az *Escherichia coli* klónozóvektorként alkalmazott Col E1 plazmid, a pUS egy 55 bp hosszúságú DNS-fragmens, amely az EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, XmaI, MspI, XbaI, SalI, AccI, HincII, PstI, SphI és HindIII restrikciósendonukleáz-felismerő helyeket tartalmazza. Hozzáférhető továbbá a pUS12-ből, pUC13-ból, pUC19-ből származó MC régió, valamint az *Escherichia coli* M13 fág vektorából származó MC régió. Kémiai szintézissel előállított MC régiók is hozzáférhetők.

A Col E1 plazmidból származó régió, amely az OriE régiót tartalmazza, és amelyből a rop régió által definiált gén el van távolítva – amelyet a találmány értelmében az OriA és MC régiókkal kombinálunk – egy, az *Escherichia coli*ban használt Col E1 plazmid replikációs iniciációs régióját jelenti, amelynek példányszáma 20–30/sejt. A fenti OriE lehet például olyan DNS-fragmens, amelyet a pBR322 plazmidból hasítunk ki PvuII, AvaI, BamHI, Eco47III, EcoRV, PstI stb. restrikciós endonukleázokkal, és amelynek mérete 1,5–4,1 kb, előnyösen 1,5–2,5 kb; alkalmazhatunk to-

vábbá pUC18 plazmidból stb. származó OriE-tartalmú DNS-fragmenseket is.

Az OriE-tartalmú DNS-fragmensek tartalmazhatnak gyógyszer-rezisztencia géneket is, például ampicillin-rezisztencia gént (Amp<sup>r</sup>), amely a klónozás során markerként szolgálhat.

A találmány szerinti eljárással előállított plazmidok a fenti három esszenciális génrégiót, azaz az OriA, MC és OriE régiót tartalmazó DNS-fragmenseken kívül tartalmazhatnak egyéb genetikai információt hordozó DNS-fragmenseket is, például egy antibiotikumrezisztencia marker ampicillinrezisztencia gént tartalmazó DNS-fragmenst és/vagy egy antibiotikumrezisztencia marker klorocidrezisztencia gént tartalmazó DNS-fragmenst. A fenti plazmidok tipikus képviselői a találmány szerinti eljárással előállított pBAX18 plazmid, illetve a pBAX20 plazmid, amelyek a három génrégiót, az OriA, MC és OriE régiót tartalmazó DNS-fragmenseket tartalmazzák, és amelyek mérete körülbelül 4,48 MDa (mintegy 6,9 kb), illetve körülbelül 3,76 MDa (mintegy 5,8 kb).

A leírásban a plazmidok móltömegére közölt adatok agarózgél-elektroforézissel mért értékeket jelentenek.

A pBAX18 és pBAX20 plazmidot részletesebben alább ismertetjük.

Az ábrákat röviden az alábbiakban ismertetjük.

1. ábra: pBAX18 plazmid restrikciósendonukleáz-térképe;
2. ábra: pBAX20 plazmid restrikciósendonukleáz-térképe;
3. ábra: A pBAX18 és pBAX20 plazmid szerkesztésének vázlata.

Az 1. táblázatban közöljük a pBAX18 és pBAX20 plazmid különböző restrikciósendonukleáz-felismerő helyeinek számát és a restrikciós endonukleázok általi hasítással kapott fragmenseik hosszát kb-ban. A pBAX18 és pBAX20 plazmid restrikciósendonukleáz-térképe továbbá az 1. és 2. ábrán látható.

1. táblázat

| Restrikciós endonukleáz | pBAX18 plazmid        |                                 | pBAX20 plazmid        |                                 |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                         | Felismerőhelyek száma | Hasított fragmensek hossza (kb) | Felismerőhelyek száma | Hasított fragmensek hossza (kb) |
| EcoRI                   | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| BamHI                   | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| XbaI                    | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| SmaI                    | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| BglII                   | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| HpaI                    | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| EcoRV                   | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| ScaI                    | 1                     | 6,9                             | 1                     | 5,8                             |
| PvuII                   | 2                     | 6,4; 0,45                       | 1                     | 5,8                             |
| HindIII                 | 3                     | 5,1; 1,5; 0,3                   | 3                     | 4,0; 1,5; 0,3                   |

1. táblázat (folytatás)

| Restrikciós endonukleáz | pBAX18 plazmid        |                                   | pBAX20 plazmid        |                                   |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
|                         | Felismerőhelyek száma | Hasított fragmensek hossza (kb)   | Felismerőhelyek száma | Hasított fragmensek hossza (kb)   |
| KpnI                    | 4                     | 2,8; 1,7;<br>1,5; 0,84            | 3                     | 3,3; 1,7;<br>0,84                 |
| PstI                    | 5                     | 3,8; 1,45;<br>0,85; 0,55;<br>0,25 | 5                     | 2,7; 1,45;<br>0,88; 0,55;<br>0,25 |

A fenti tulajdonságokkal rendelkező pBAX18 és pBAX20 plazmid a találmány értelmében az alábbi eljárással állítható elő.

Első lépésben az *Anacystis nidulans*-ból származó pBA1 plazmid OriA-t tartalmazó DNS-fragmensét úgy állíthatjuk elő például, hogy az *Anacystis nidulans* és *Escherichia coli* pBAS18 ingázó vektorát [K. Shinozakis és munkatársai, *Gene* 19, 221–224 (1982)] *Escherichia coli*-ban klónozzuk ismert módszerek szerint [T. Maniatis és munkatársai: *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory], majd a klónozott pBAS18 plazmidból a BamHI és XhoI vagy BamHI és PvuII restrikciós endonukleázok kombinációjának alkalmazásával ismert módon kivágjuk a DNS-fragmenseket (T. Maniatis és munkatársai: *Molecular Cloning*). Ily módon mintegy 4,1 kb, illetve 3,3 kb méretű OriA-tartalmú DNS-fragmenseket kapunk. Adott esetben a fenti DNS-fragmensek kinyúló 5'-vége T<sub>4</sub> DNS-polimerázzal végzett kezeléssel tompa végé alakítható.

A pUC plazmid MC régióját tartalmazó, és a rop régió által definiált gén nélküli DNS-fragmens forrásként célszerűen egy tipikus Col E1 plazmidot, a pBR322 plazmidot alkalmazzuk.

A fenti módon előállított MC régiót az EcoRI és HindIII restrikciós endonukleázokkal kezelt pBR322 plazmiddal kombináljuk, és T<sub>4</sub> DNS-ligázzal kezelve előállítjuk a pBR322M plazmidot, amely a pBR322 plazmidba beépítve tartalmazza a fenti MC régiót. Ezután a fenti pBR322M plazmid Eco47III és PvuII restrikciós endonukleázokkal való kezelésével kapott, mintegy 2,5 kb hosszúságú DNS-fragmenst – amely mind az OriE, mind az MC régiót tartalmazza – a fentiek szerint előállított OriA-t tartalmazó DNS-fragmenssel kombináljuk, és T<sub>4</sub> DNS-ligázzal végzett kezeléssel kapjuk a pBAX18 és pBAX20 plazmidot.

A pBAX18 és pBAX20 plazmid szerkesztésének sémája a 3. ábrán látható, az előállítási eljárást részletesebben alább a példákban ismertetjük.

A találmány szerinti eljárással előállított plazmidok ingázó vektorok, amelyek rendelkeznek az *Escherichia coli* sejtekben való autonóm replikációjukhoz szükséges OriE régióval és az *Anacystis nidulans* sejtekben való autonóm replikációjukhoz szükséges OriA régióval. Ezért a találmány szerinti plazmidok az *Escherichia coli* nagy sebességű szaporodását felhasználva nagy mennyiségben előállíthatók, és az így előállított nagy mennyiségű plazmidot alkalmazva lehetővé válik a

cianobaktérium, például *Anacystis nidulans* sejtek hatékony transzformálása.

Ezenkívül, mivel a találmány szerinti plazmidba bevezettünk egy többszörös klónozórégiót is, az (idegen) gének inszertálására felismerőhelyként a pBAS18 plazmidban egyedül használt EcoRI felismerő helyen kívül a többi, például SmaI, BamHI, XbaI, ScaI és EcoRV felismerő hely is hasznosítható.

Ezenkívül, a találmány szerinti plazmid mérete a pBAX18 plazmid méretének (12 kb) mintegy felére (5,8–6,9 kb) csökkenthető, mivel a találmány szerinti plazmidból a pBA1 plazmid OriA régióján kívüli DNS-szakaszokat eltávolítottuk. Ennek következtében a találmány szerinti plazmidba a pBAS18 plazmidba beépíthető (idegen) géneknél nagyobb (idegen) gének is beépíthetők.

A fenti tulajdonságokkal rendelkező találmány szerinti plazmidok ismert génsebészeti eljárásokkal vihetők be a gazdasejtbe, például D. A. Lightfoot és munkatársai eljárása szerint [J. General Microbiol. 134, 1509–1514 (1988)]. Az ily módon transzformált *Anacystis nidulans* 6301 transzformációs gyakorisága mintegy 1000-szeres ahhoz az értékhez viszonyítva, amelyet akkor kapunk, ha a fenti törzset pBAX18 plazmiddal transzformáljuk. Ezért a találmány szerinti eljárással előállított plazmid alkalmazásával – még akkor is, ha abba egy (idegen) gént inszertáltunk – könnyen szelektálhatjuk a kívánt inszertált génnel rendelkező plazmidot tartalmazó sejteket.

A találmány szerinti eljárással előállított plazmidba beépíthető struktúrgénekre példaként említjük az *Anacystis nidulans*-ból származó struktúrgéneket, az egyéb cianobaktériumokból származó struktúrgéneket, az egyéb baktériumokból származó struktúrgéneket, a magasabb rendű állatokból és növényekből származó struktúrgéneket stb., tekintet nélkül azok eredetére. Kémiai úton szintetizált struktúrgének is beépíthetők a találmány szerinti eljárással előállított plazmidokba. A fenti génekre példaként említjük a kémiai úton szintetizált humán szuperoxid-diszmutázokat (h-SOD, h-SOD-Ala<sup>6</sup>) (lásd például a 156 884/1990 számon publikált japán szabadalmi leírást). A fenti struktúrgének az *Anacystis nidulans* RuBisCO génje [Mol. Gen. Genet. 200, 27–32 (1985)] transzlációs iniciátor régiója és transzlációs terminátor régiója között lokalizálódnak.

A találmány szerinti plazmidot közelebből az alábbi példákkal szemléltetjük.

### 1. példa

#### 1) Egy pUC18-ból származó többszörös klónozóhely bevétele a pBR322 plazmidba

##### A) pBR322 emésztése EcoRI-HindIII-mal, és kezelése alkalikus foszfatázzal

20 µl (10 µg) pBR322 DNS-oldathoz 40 µl 5×HindIII puffert [(50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 35 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 300 mmol/l NaCl], 80 egység (10 µl) HindIII-át (gyártja a Takara Shuzo Co., Ltd.) és 130 µl steril vizet adunk, és az elegyet 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyhez ezután 40 µl 5×EcoRI puffert [500 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 35 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol/l NaCl, 35 mmol/l 2-merkaptó-etanol, 0,05% marha-szérumalbumin], 120 egység (10 µl) EcoRI-et (gyártja a Takara Shuzo Co., Ltd.) és 50 µl steril vizet adunk, és az elegyet 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenol/kloroform eleggyel kezeljük és etanollal kicsapjuk, és a kapott DNS-t összegyűjtjük, és 100 µl 0,1 mol/l koncentrációjú Tris-HCl (pH 8,0) pufferben oldjuk. A kapott oldathoz 10 µl alkalikus foszfatáz (gyártja a Takara Shuzo Co., Ltd.) oldatot [1 egység/10 µl alkalikus foszfatáz, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 50 mmol/l NaCl, 1 mmol/l ZnSO<sub>4</sub>] adunk, és az elegyet 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáljuk. Ezután a reakcióelegyhez 10 µl alkalikus-foszfatáz-oldatot adunk, és az elegyet 65 °C-on 30 percen keresztül tovább inkubáljuk. A kapott oldatot fenol/kloroform eleggyel kezeljük, etanollal kicsapjuk, és a DNS-t összegyűjtjük.

##### B) Többszörös klónozóhely (EcoRI-HindIII) izolálása pUC18-ból

Két Eppendorf-csőbe 30–30 µl (20 µg) pUC18 oldatot mérünk, majd mindkettőhöz 20 µl 10×K puffert [200 mmol/l Tris-HCl (pH 8,5), 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l DTT, 100 mmol/l KCl], 80 egység (10 µl) HindIII-at adunk 140 µl steril vízben, majd a reakcióelegyet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenol/kloroform eleggyel kezeljük, és etanollal kicsapjuk, majd a kapott DNS-t összegyűjtjük, és 112,5 µl steril vízben oldjuk. Az így kapott oldatokhoz 30 µl 5×EcoRI puffert és 190 egység (7,5 µl) EcoRI-et adunk, és az elegyet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A DNS-eket etanollal kicsapjuk és összegyűjtjük, majd 1,5%-os agarózon gélelektroforézissel elválasztjuk a kívánt DNS-fragmenst (körülbelül 50 bp). Ezt a DNS-t a gélből elektromosan eluáljuk, fenol/kloroform eleggyel kezeljük, és etanolos kicsapással tisztítjuk.

##### C) EcoRI-HindIII-mal emésztett pBR322 ligálása a többszörös klónozóhelyhez

0,2 g (1 µl) pBR322 DNS-hez (EcoRI-HindIII, AP kezelés) és 0,2 µg (1 µl) többszörös klónozóhely DNS-hez 1 µl TE-t [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), 1 mmol/l EDTA] és a Takara ligációs készlet A oldatából 24 µl-t adunk, és az elegyet alaposan összekeverjük. A kapott oldathoz a Takara ligációs készlet B oldatából 3 µl-t adunk, és a reakcióelegyet 16 °C-on 4 órán keresztül inkubáljuk.

##### D) pBR322M plazmid klónozása

A kapott ligációs oldat 3 µl-éhez (40 ng) 200 µl E. coli HB 101 sejtuszpenziót adunk, amelyet előzőleg

50 mmol/l CaCl<sub>2</sub>-vel kezeltünk, és az elegyet óvatosan összekeverjük. A reakcióelegyet jeges vízfürdőn 30 percen keresztül, majd 42 °C-on 2 percen keresztül inkubálva készítjük a sejteket a DNS felvételére. A kapott szuszpenzióhoz 1,8 ml 2YT folyékony tápközeget (16 g/l tripton, 10 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl) adunk, és az elegyet 37 °C-on 1 órán keresztül rázatva tenyésztjük, majd 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB (10 g/l tripton, 8 g/l NaCl, 5 g/l élesztőkivonat) agaros tápközegre szélesztjük. A kapott telepekből preparáljuk a plazmidokat, és restrikciós endonukleázos térképüket analizálva kiszűrjük a kívánt plazmidot (pBR322M) tartalmazó telepeket. A szűrt telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 200 ml 2YT folyékony tápközegben tenyésztjük, és a plazmid-DNS-t nagy mennyiségekben SDS-alkalikus módszerrel preparáljuk.

##### 2) PvuII-Eco47III fragmens (2550 bp) izolálása

Eppendorf-csövekben három párhuzamos mintát készítünk az alábbiak szerint.

20 10 µg (10 µl) fenti 1) lépés szerint előállított pBR322M plazmid-DNS-hez 20 µl 10×M puffert [100 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 100 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l DTT, 500 mmol/l NaCl], 120 egység (10 µl) PvuII-et (gyártja: Takara Shuzo Co., Ltd.) adunk, és steril vízzel 100 µl végtérfigatratra töltjük. A csövet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenol/kloroform eleggyel kezeljük, a DNS-t etanollal kicsapjuk, összegyűjtjük, és 174 µl steril vízben oldjuk. A kapott oldathoz 20 µl 10×H puffert és 24 egység Eco47III-at (gyártja: Takara Shuzo Co., Ltd.) adunk, és az elegyet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A DNS-t etanollal kicsapjuk, és a kívánt DNS-fragmenst (2550 bp) 1,5%-os agarózon gélelektroforézissel elválasztjuk. Az elválasztott DNS-fragmenst GeneClean alkalmazásával tisztítjuk, és 50 µl 0,1 mol/l koncentrációjú Tris-HCl (pH 8,0) pufferben oldjuk. A kapott oldathoz 5 µl alkalikusfoszfatáz-oldatot adunk, és a reakcióelegyet 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyhez ezután 5 µl alkalikus-foszfatáz-oldatot adunk, és 65 °C-on 30 percen keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenol/kloroform eleggyel kezeljük, majd etanolos kicsapás után a DNS-t összegyűjtjük, és 20 µl TE-ben oldjuk.

##### 3) A pBAS18 A. nidulans replikációs iniciációs kodonjának szeparálása

45 Az E. coli HB 101-be bevisszük az Escherichia coli és A. nidulans között ingázó pBAS18 vektort [K. Shinozaki és munkatársai, Gene 19, 221–224 (1982)], amelybe a pBR322 BamHI helyére beillesztettük az A. nidulans 6301 törzs egy endogén plazmidját (pBA1, BamHI-gyel emésztett). A kapott törzset 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB folyékony tápközegben tenyésztjük, és a vektorplazmidot nagy mennyiségben preparáljuk SDS-alkalikus módszer alkalmazásával.

50 14 µg (20 µl) preparált pBAS18 DNS-hez 20 µl 10×K puffert, 100 egység (10 µl) BamHI-et (gyártja: Takara Shuzo Co., Ltd.) adunk, és steril vízzel 200 µl végtérfigatratra töltjük fel Eppendorf-csőben. Három párhuzamos mintát készítünk a fenti összetétellel Eppendorf-csőben, és a mintákat 30 °C-on 3 órán keresztül

inkubáljuk. A reakcióelegyből ezután etanolos kicsapással visszanyerjük a DNS-t, és a kívánt DNS-fragmenst (pBA1, mintegy 8,0 kbp) 1%-os agarózon gélelektroforézissel elválasztjuk, és GeneCleannel tisztítjuk.

2 µg elválasztott és tisztított, BamHI-vel emésztett pBA1 DNS-hez 5 µl 10×K puffert, 24 egység (2 µl) XhoI-et (gyártja: Takara Shuzo Co., Ltd.) és 38 µl steril vizet adunk, és a reakcióelegyet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenol/kloroform eleggyel kezeljük és a DNS-t etanollal kicsapjuk. A kapott DNS – amely a pBA1 BamHI-XhoI emésztési terméke – mindkét végén tompa véget alakítunk ki, Takara Blunting készlet alkalmazásával.

#### 4) Kicsinyített *E. coli*-*A. nidulans* ingázó vektor (pBAX18, 6,9 kbp) szerkesztése

40 ng (2 µl) tompa végűvé alakított DNS-hez és 200 ng (4 µl) PuvII-Eco47III DNS-fragmenshez a Takara ligációs készlet A oldatából 48 µl-t adunk, majd alaposan összekeverjük. Hozzáadunk 6 µl B oldatot, és az elegyet 16 °C-on 4 órán keresztül inkubáljuk. Az *E. coli* HB 101 törzset a fenti oldattal transzformáljuk, majd 50 µg/ml ampicillint és 1,5% agart tartalmazó LB agar tápközegre rétegezzük. A kapott telepekből preparáljuk a plazmidokat, és restriktációs endonukleázos térképüket analizálva kiszűrjük a kívánt plazmidot (pBAX18) tartalmazó telepeket. A szűrt telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 2YT folyékony tápközegben 45 ml-es adagokban tenyésztjük, és a plazmid-DNS-t SDS-alkalikus módszerrel preparáljuk.

#### 5) pBAX20 (mintegy 5,8 kb) előállítás

1 µg (4 µl) fenti 3) lépésben előállított, tompa végűvé alakított BamHI-XhoI DNS-fragmenshez 2 µl 10×M puffert, 1 µl (12 egység) PvuII-t és 13 µl steril vizet adunk, és az elegyet 37 °C-on 3 órán keresztül inkubáljuk. A fenti reakcióelegy 2 µl-éhez (100 ng) 100 ng (2 µl) 2) lépésben előállított PvuII-Eco47III DNS-fragmenst és Takara ligációs készlet A oldatából 16 µl-t adunk, majd alapos keverés után hozzáadjuk a B oldatot, és a reakcióelegyet 16 °C-on 2 órán keresztül inkubáljuk. A reakcióeleggyel ezután transzformáljuk az *E. coli* HB 101 törzset, majd a tenyészetet 50 µg/ml ampicillint és 1,5% agart tartalmazó LB agar tápközegre rétegezve telepeket kapunk. A kapott telepekből kiszűrjük a kívánt plazmidot (pBAX20) tartalmazó telepeket, és ezeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 200 ml 2YT folyékony tápközegben tenyésztjük, majd a plazmid-DNS-t SDS-alkalikus módszerrel preparáljuk.

#### 2. példa

##### *A. nidulans* 6301 transzformálása

A sejteket folyékony BG-11 tápközegben 1–5 napon keresztül tenyésztjük, centrifugálással (8000 fordulat/perc, 5 perc) összegyűjtjük, és  $10^8$ – $10^9$  sejt/ml koncentrációban 10 ml friss tápközegben szuszpendáljuk. A kapott sejtsuszpenzió 1–1 ml-ét polietilénscövekbe (Falcon 2059) öntjük, és az 1. példa szerint előállított plazmidot 1 µg (a pBAS18-at 10 µg) mennyiségben hozzáadjuk. A csöveket alumíniumfóliával lefedjük, és

30 °C-on egy éjszakán keresztül tenyésztjük, majd a fóliát eltávolítjuk, és a tenyésztést 30 °C-on fénybesugárzás (1000–2000 lux) alkalmazása mellett folytatjuk. A sejtsuszpenziókat 5-szörösére hígítjuk (azokat, amelyekhez pBAS18-at adtunk, nem hígítjuk) és 100–500 µl mennyiségekben 1 µg/ml ampicillint, 1 mmol/l nátrium-tio-szulfátot és 1,5% agart tartalmazó BG-11 agaros tápközegre rétegezzük. A lemezeket fénybesugárzás (1000–2000 lux) alkalmazása mellett 4–10 napon keresztül tenyésztjük.

A fenti módon nyert telepekből a transzformálás gyakorisága  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  sejt/µg plazmid-DNS abban az esetben, ha találmány szerinti plazmidot alkalmaztunk, vagyis a gyakoriság 1000-szeres a pBAS18 plazmiddal kapott gyakorisághoz képest, ami  $10^{-7}$  sejt/µg plazmid-DNS.

#### *Ipari alkalmazhatóság*

A találmány szerinti eljárással előállított plazmidot nagy mennyiségben állíthatjuk elő *Escherichia coli* alkalmazásával, és mind az *Escherichia coli*, mind cianobaktérium-sejtekben replikálódik, ezért ingázó vektorként különféle struktúrgének expresszálására alkalmazható cianobaktériumok sejtjeiben.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás ingázó vektor plazmid előállítására, amely *Escherichia coli* és cianobaktériumok sejtjeiben képes replikálódni, *azzal jellemezve*, hogy

(a) egy *Anacystis nidulans*ből származó pBA1 plazmid OriA régiót,

(b) egy többszörös klónozórégiót és

(c) egy colicin E1 plazmid régiót – amely a plazmid OriE régióját tartalmazza, és amelyből a plazmid rop funkcionális régiója által definiált gén el van távolítva – szokásos géntechnológiai eljárásokkal összekapcsolunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (a) OriA régió egy olyan OriA régiót tartalmazó DNS-fragmens, amelynek mérete 2,8–8,0 kb, ha a pBA1 plazmidból van kivágva.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a (c) OriE régió egy olyan DNS-fragmens, amely az OriE régiót tartalmazza, és amelyből a rop régió által definiált gén el van távolítva, a DNS-fragmens mérete 1,5–4,1 kb, ha a pBR322 plazmidból van kivágva.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az OriE-t tartalmazó DNS-fragmens tartalmaz egy ampicillinrezisztencia gént ( $Amp^r$ ) is.

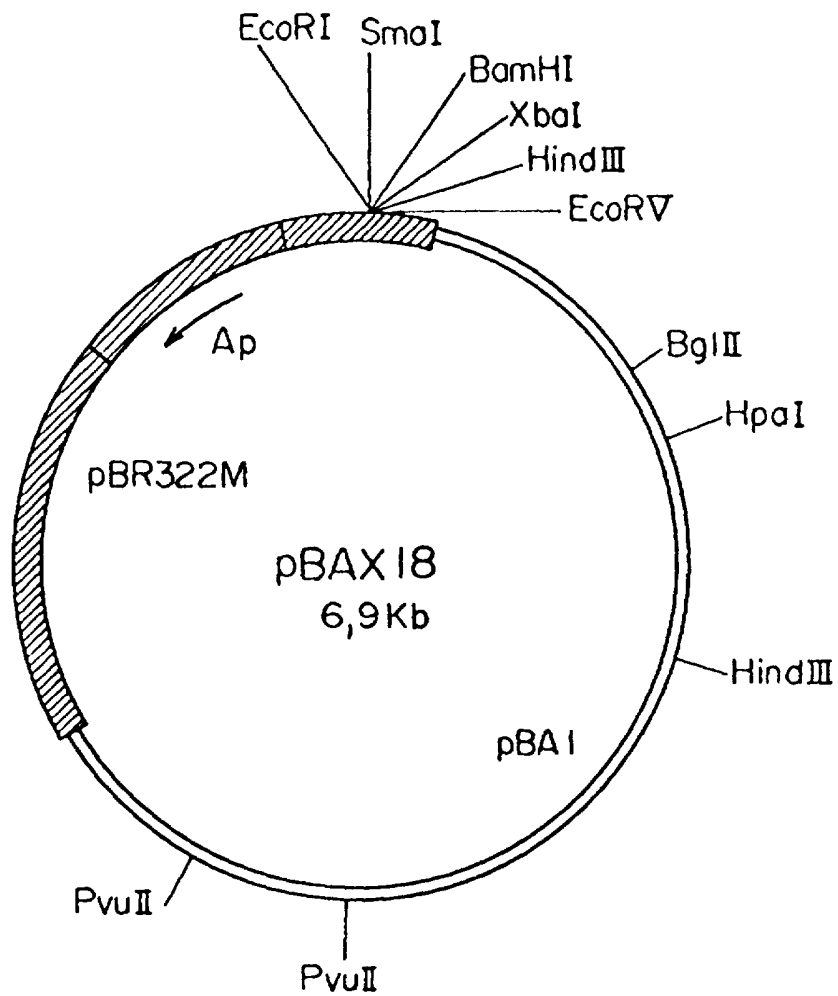
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás pBAX18 vektor-plazmid előállítására, amelynek mérete mintegy 6,9 kb, és az 1. ábra szerinti restriktációsendonukleáz-térkép jellemzi, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő régiókat kapcsoljuk össze.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás pBAX20 vektor-plazmid előállítására, amelynek mérete mintegy 5,8 kb, és a 2. ábra szerinti restriktációsendonukleáz-térkép jellemzi, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő régiókat kapcsoljuk össze.

7. Eljárás transzformált cianobaktérium-sejtek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, az 1. igénypont szerinti eljárással előállított plazmidot, amely tartalmaz továbbá egy fiziológiailag aktív polipeptidet kódoló struktúrgént, a struktúrgén előtt lokalizálva az *Anacystis nidulans* RuBisCO génje translációs iniciátor régióját,

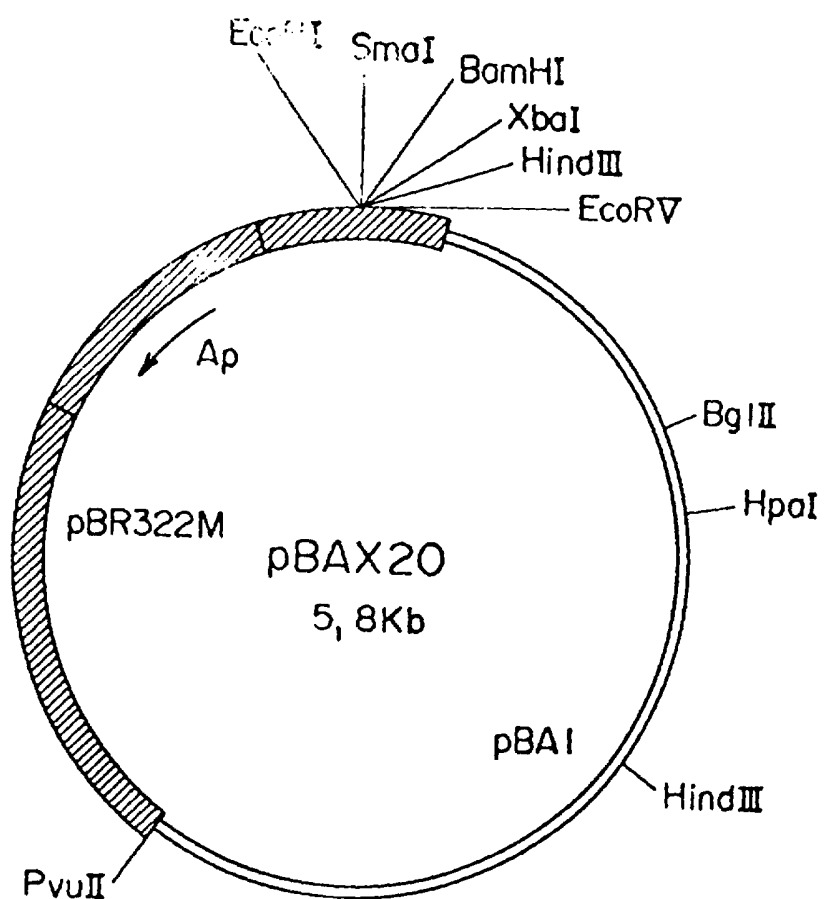
és a struktúrgén után lokalizálva az *Anacystis nidulans* RuBisCO génje translációs terminátor régióját, bevezetünk egy cianobaktérium-sejtbe.

5 8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a cianobaktérium az *Anacystis nidulans* 6301 törzs.



1. ábra





2. ábra

