



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **251 158 A1**

4(51) C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 292 568 7	(22)	17.07.86	(44)	04.11.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Laplace, Frank, Dr. rer. nat.; Kleßen, Christian, Dr. rer. nat.; Malke, Horst, Doz. Dr. sc. nat., DD

(54) **Verfahren zur Herstellung von Streptokokken-Vektorplasmiden mit Polylinker**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Streptokokken-Vektorplasmiden. Sie verfolgt das Ziel, insbesondere neue Streptokokken-Vektorplasmide mit Polylinker für die Belange der Gentechnologie bereitzustellen. Die dieser Zielstellung zugeordnete Aufgabe wird gelöst, indem man

- zunächst Plasmid pSM6, eine Deletionsmutante des bekannten Streptokokken-Vektorplasmids pSM7, mit dem *E.-coli*-Plasmid pUC18, Träger eines Polylinkers mit 8 pSM6-fremden singulären Restriktase-Spaltorten, zu den neuen chimären Plasmiden pLKM618 und pLKM619 (Molekülgröße je 8,3 kb) fusioniert sowie
- anschließend diese Zwischenplasmide durch Heraustrennen des pUC18-Rumpfes unter Selbstligation in die neuen, Polylinker-tragenden Streptokokken-Vektorplasmide pLKM6181 und pLKM6191 (Molekülgröße je 5,9 kb) umwandelt.

Die verfahrensgemäß erhaltenen Vektorplasmide pLKM6181 und pLKM6191 verfügen je über einen modifizierten Polylinker mit 9 pSM6-fremden singulären Restriktase-Spaltorten.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Streptokokken-Vektorplasmiden mit Polylinker unter Anwendung gentechnologischer Standardverfahrensschritte, **gekennzeichnet dadurch**, daß man
 - Plasmid pSM 6, ein Derivat von Plasmid pSM 7, mit dem **E. coli**-Plasmid pUC 18, das einen 8 pSM 6-fremde, singuläre Restriktase-Spaltorte aufweisenden Polylinker in sich trägt, mittels Ligation über die EcoRI-Spaltorte zu den neuen chimären Zwischenplasmiden pLKM 618 und pLKM.619 (Molekülgröße je 8,3 kb) fusioniert,
 - aus diesen Zwischenplasmiden durch Verdauung mit der Restriktase HaeIII den pUC 18-Rumpf her austrennt und
 - die so bereitgestellten 5,9 kb großen Hauptfragmente der Zwischenplasmide jeweils mittels Selbstligation zu den neuen, Polylinker tragenden Streptokokken-Vektorplasmiden pLKM 6181 und pLKM 6191 schließt.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Streptokokken-Vektorplasmiden, die einen Polylinker tragen und vorteilhaft zur Klonierung von Fremdgenen in Streptokokken herangezogen werden können.

Die Erfindung bietet Anwendungsmöglichkeiten in der Gentechnologie sowie auf anderen Gebieten der Molekularbiologie und nachgelagert damit vor allem in der pharmazeutisch-biotechnologischen Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannt ist das Streptokokken-Vektorplasmid pSM 7 (H. Malke, FEMS Microbiol. Lett. **11**, 1981, S. 27–30).

Dieses Plasmid ist

- durch eine Molekülgröße von 6,4 kb,
- durch singuläre Spaltorte für die Restriktasen EcoRI, Aval, Avall, KpnI und PvuII sowie
- durch das Vorhandensein eines Resistenzmarkers für die Erythromycin- und die Lincomycinresistenz (Em-Lm^R) charakterisiert.

Daneben verfügt das Plasmid pSM 7 jedoch auch über Eigenschaften, die bei seinem Einsatz als Plasmidvektor in gentechnischen Konstruktionen nachteilig zu Buche schlagen. Insbesondere besitzt dieses Plasmid keine Spaltorte für so gebräuchliche Restriktionsenzyme wie PstI, BamHI, Sall und SmaI.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, neue Streptokokken-Vektorplasmide mit Polylinker für die Belange der Gentechnologie bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu beschreiben, mit dessen Hilfe unter Rückgriff auf eine Deletionsmutante des Streptokokken-Plasmids pSM 7 durch aufeinanderfolgend ausgeführte Komplexe gentechnologischer Verfahrensschritte neue Streptokokken-Vektorplasmide mit Polylinker erzeugt werden sollen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe wie folgt gelöst:

Ausgehend von dem literaturbekanntesten Streptokokken-Plasmid pSM 7 wurde in an sich bekannter Weise eine spontane Deletionsmutante isoliert, die als Streptokokken-Vektorplasmid pSM 6 (vgl. Abb. 1) bezeichnet wurde. Dieses Plasmid pSM 6 trägt der in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW, DDR-6900 Jena, Beutenbergstraße 11, unter der Registriernummer ZIMET 11 181 als biologisch reine Kultur hinterlegte Stamm **Streptococcus sanguis** Challis 6 (pSM 6) in sich.

Das Plasmid pSM 6 ist durch eine Molekülgröße von 5,6 kb charakterisiert, ansonsten verfügt es über die Eigenschaften von Plasmid pSM 7.

Benötigte Mengen an pSM 6-DNS werden vorzugsweise in der Weise gewonnen, daß aus einer Kultur von **S. sanguis** ZIMET 11 181 das Plasmid in an sich bekannter Weise isoliert, gereinigt und in TrisHCl-Puffer gelöst wird.

Aus so bereitgestellten Proben von DNS des Plasmids pSM6 wird durch Öffnen mit dem Restriktionsenzym EcoRI die linearisierte Form des Plasmids erhalten.

Weiterhin werden benötigte Mengen des an sich bekannten *E. coli*-Plasmids pUC18 (vgl. Abb. 2), das charakterisiert ist

- durch eine Molekülgröße von 2,7 kb
- durch das Vorhandensein eines Polylinkers für die singulären Spaltorte der Restriktasen HindIII, PstI, SphI, Sall, Accl, HincII, XbaI, BamHI, XmaI, SmaI, KpnI, SstI und EcoRI, darunter also durch das Vorhandensein von 8 pSM6-fremden singulären Restriktase-Spaltorten,

sowie weiterhin

- durch das Vorhandensein von 10 Spaltorten für die Restriktase HaeIII und
- durch das Vorhandensein eines Resistenzmarkers für die Ampicillin-Resistenz,

in an sich bekannter Weise aus dem *E. coli*-Stamm JM101 (pUC18) isoliert, gereinigt und in TrisHCl-Puffer gelöst.

Aus so bereitgestellten Proben von DNS des Plasmids pUC18 wird durch Öffnen mit dem Restriktionsenzym EcoRI die lineare Form des Plasmids pUC18 erhalten.

Die so präparierten linearisierten Formen der Plasmide pSM6 und pUC18 werden mittels Ligation über die EcoRI-Spaltorte zu den neuen chimären Plasmiden pLKM618 bzw. pLKM619 geschlossen, die anschließend zur Transformation von *Escherichia coli* Hb101 herangezogen werden.

Die Zwischenplasmide pLKM618 und pLKM619 weisen eine Molekülgröße von je 8,3 kb auf und sind gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit, sowohl in Streptokokken- als auch in *Escherichia coli*-Stämmen funktions- und replikationsfähig zu sein. Die Plasmide pLKM618 und pLKM619 tragen bereits die Sequenz des Polylinkers.

Beide Plasmide unterscheiden sich hinsichtlich der Insertionsrichtung der pUC18-Komponente voneinander. Bei Plasmid pLKM618 ist der pUC18-Anteil so in die pSM6-Komponente eingefügt, daß der PstI-Spaltort des Polylinkers näher am Avall-Spaltort von pSM6 liegt, während bei Plasmid pLKM619 diese Einfügung in der Weise vorliegt, daß der PstI-Spaltort des Polylinkers näher am PvuII-Spaltort von pSM6 liegt (vgl. Abb. 3).

Aus dem bei obiger Ligation anfallenden Reaktionsgemisch werden die chimären Plasmide in der Weise abgetrennt, daß mit Proben dieses Gemisches Kulturen eines *E. coli*-Rezipientenstammes, vorzugsweise Kulturen von *E. coli* Hb101, transformiert werden und auf der Basis der resultierenden Amp^r Em^r-Transformanten ein screening nach DNS-Molekülen der Größe 8,3 kb durchgeführt wird. Über eine anschließende Restriktionsanalyse werden unter den (den einzelnen Transformantenstämmen eindeutig zugeordneten) DNS-Portionen der Größe 8,3 kb diejenigen ermittelt, die dem Plasmid pLKM618 oder dem Plasmid pLKM619 zugeordnet sind. Auf diesem Wege können unter den Transformantenklonen eindeutig solche, die vom Typ *E. coli* Hb101 (pLKM618) sind, von jenen abgetrennt werden, die vom Typ *E. coli* Hb101 (pLKM619) sind. Ausreichende Mengen an pLKM618-DNS und pLKM619-DNS, wie sie für die anschließenden Teile des vorliegenden Verfahrens zur Herstellung von Streptokokken-Vektorplasmiden mit Polylinker benötigt werden, werden auf an sich bekannte Weise aus den *E. coli*-Stämmen Hb101 (pLKM618) und Hb101 (pLKM619) isoliert, gereinigt und in TrisHCl-Puffer gelöst.

Die so gewonnene DNS der Plasmide pLKM618 und pLKM619 wird nun anschließend mit der Restriktase HaeIII gespalten. Man erhält auf diese Weise von jedem der Plasmide 10 lineare DNA-Fragmente. Die größten dieser Fragmente sind durch eine Molekülgröße von je 5,9 kb charakterisiert. Sie bestehen aus dem vollständigen Plasmid pSM6 mit dem Resistenzmarker für Em-Lm^r und einem 260 bp-großen Anteil des Plasmids pUC18. Der 260 bp-große Anteil dieses Fragments trägt die Polylinkersequenz aus dem Plasmid pUC18.

Mit Hilfe des an sich bekannten Verfahrens der Agarose-Gelelektrophorese wird das 5,9 kb-große Fragment des Plasmids pLKM618 von den übrigen neun HaeIII-Fragmenten getrennt, isoliert, gereinigt und in TrisHCl-Puffer gelöst. Auf gleiche Weise wird das 5,9 kb-große Fragment von Plasmid pLKM619 gewonnen.

Die so präparierten linearen 5,9 kb-großen Hauptfragmente von Plasmid pLKM618 und Plasmid pLKM619 werden mittels blunt end-Selbstligation unter Wiederherstellung des HaeIII-Spaltortes zu den neuen Plasmiden pLKM6181 und pLKM6191 geschlossen. Anschließend werden mit diesen Plasmiden Zellen von Stamm *Str. sanguis* Challis 6 transformiert.

Die neuen Streptokokken-Vektorplasmide pLKM6181 und pLKM6191 sind charakterisiert (vgl. Abb. 4)

- durch das Vorhandensein eines Resistenzmarkers für die Erythromycin- und Lincomycinresistenz (Em-Lm^r) sowie
- durch das Vorliegen eines modifizierten Polylinkers mit singulären Spaltorten für die nunmehr 9 Restriktasen HaeIII, SphI, PstI, Sall, XbaI, BamHI, SmaI, XmaI und SstI.

Beide Plasmide unterscheiden sich voneinander durch die Insertionsrichtung des Polylinkers. Während bei pLKM6181 der PstI-Spaltort des Polylinkers näher zum Avall-Spaltort liegt, ist der PstI-Spaltort des Polylinkers bei Plasmid pLKM6191 näher zum PvuII-Spaltort gelegen.

Mit den neuen, Polylinker tragenden Plasmiden pLKM6181 und pLKM6191 stehen für gram-positive Bakterien der Gattung *Streptococcus* zwei primäre, strukturoptimierte Klonierungsvektoren als Trägerreplica für anschließende gentechnologische Projekte zur Verfügung. Besonders vorteilhaft lassen sich die neuen Plasmide pLKM6181 und pLKM6191 für die Konstruktion von Expressionsvektoren für Streptokokken einsetzen, was durch die Anhäufung zusätzlicher singulärer Spaltorte, darunter so gebräuchlicher wie BamHI, PstI, Sall, HaeIII und SmaI, ermöglicht wird.

Ausführungsbeispiel

1 a) Gewinnung der Zwischenplasmide pLKM618 und pLKM619

DNS des Plasmids pSM6 wird aus Zellen des Stammes ZIMET 11181 in der folgenden Weise gewonnen:

500 ml einer Übernachtskultur dieses Stammes, die in BHI-Medium mit 2 M Glukose, 0,5 M D-L-Threonin, 2,5% Pferdeserum und 5 µg/ml Erythromycin gezüchtet wurde, werden 15 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden mit 50 mM TrisHCl (pH 8,2) gewaschen und anschließend in 50 ml desselben Puffers resuspendiert. Nach Zugabe einer Lysozymlösung (100 mg Lysozym in 5 ml 50 mM TrisHCl, pH 8,2) wird 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und in 16 ml 50 mM TrisHCl resuspendiert. Anschließend werden 20 mg Pronase in 2 ml TrisHCl zugegeben, und es wird 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Zellyse erfolgt durch Zugabe von 2 ml einer 10%igen SDS-Lösung. Danach wird der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 M NaOH auf 12,1 eingestellt, wodurch die Denaturierung der chromosomalen DNS erreicht wird. Anschließend erfolgt durch schnelle Zugabe einer 2 M TrisHCl-Lösung ein pH-Shift auf 8,5.

Nach der Zugabe von 0,6g kristallinem NaCl folgen schließlich zur Deproteinisierung je eine Extraktion mit einem Volumen NaCl-gesättigtem Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1). Anschließend wird die DNS-Lösung mit 0,1 Volumenteilen einer 3M Na-acetat-Lösung und 2 Volumenteilen 96%igem Alkohol bei -20°C gefällt, sedimentiert und getrocknet. Die DNS wird zuletzt in 5ml TES-Puffer aufgenommen. Zur Abtrennung und Reinigung der Plasmid-DNS von kontaminierender chromosomaler DNS wird in an sich bekannter Weise eine Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation ausgeführt. Schließlich liegt die gereinigte zirkuläre Plasmid-DNS in einer Lösung in 10mM TrisHCl, pH7,5, vor und wird bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Parallel hierzu wird DNS des Plasmids pUC 18 aus Zellen des Stammes *Escherichia coli* JM 101 (pUC 18) in der folgenden Weise gewonnen:

500 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* JM 101 (pUC 18), die in LB-Medium mit $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin gezüchtet wurde, werden 15 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden mit 50mM TrisHCl gewaschen und anschließend in 13ml eines 50mM TrisHCl-Puffers mit 25% Saccharose (pH8,0) resuspendiert. Danach werden 20mg Lysozym zugegeben, und es erfolgt eine 5minütige Inkubation des Ansatzes. Nach der Zugabe von 3ml einer 0,25M EDTA-Lösung werden die Zellen 5 Minuten auf Eis gekühlt. Die Lyse erfolgt durch die Zugabe von 21ml eines Lysemediums (50mM TrisHCl, 62mM EDTA, 1% SDS, pH8,0). Danach werden 11ml einer 5M NaCl-Lösung zugegeben und der Ansatz wird vorsichtig gemischt und anschließend 20 Minuten auf Eis gekühlt.

Nach 20minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min ist im Überstand die DNS enthalten, die durch Zugabe von 0,6 Volumenteilen Isopropanol bei -20°C über Nacht ausgefällt wird. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wird das Sediment gewonnen, getrocknet und in 4,5ml TES-Puffer resuspendiert.

Noch in der Lösung verbliebene Proteine werden durch 15minütiges Zentrifugieren bei 12000 U/min abgetrennt. Zur Abtrennung und Reinigung der Plasmid-DNS von kontaminierender chromosomaler DNS wird in an sich bekannter Weise eine Ethidiumbromid-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation ausgeführt.

Schließlich liegt die gereinigte zirkuläre Plasmid-DNS in einer Lösung von 10mM TrisHCl, pH7,5, vor und wird bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Die Herstellung der neuen, rekombinanten Zwischenplasmide pLKM618 und pLKM619 wird nunmehr folgendermaßen durchgeführt:

Je $5\mu\text{g}$ der auf oben beschriebene Weise gewonnenen DNS von pSM6 und pUC18 werden in getrennten Ansätzen mit je 10 Einheiten des Enzyms EcoRI linearisiert. Nachdem die Vollständigkeit der Spaltung gelelektrophoretisch nachgewiesen wurde, wird das Enzym EcoRI durch Hitzebehandlung inaktiviert (70°C , 5 Minuten). Anschließend werden beide linearisierten Plasmide durch Zugabe von je 3 Volumenteilen 96%igem Alkohol gefällt (-70°C , 60 Minuten), in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert, 2mal mit 70%igem Alkohol gewaschen, getrocknet und in je $8\mu\text{l}$ Aqua dest. gelöst. Danach werden die Plasmidlösungen vereinigt, mit $2\mu\text{l}$ Ligationspuffer (10fach konzentriert) und 2 Einheiten T4-DNS-Ligase (in $2\mu\text{l}$ Ligasepuffer) versetzt und über Nacht bei einer Temperatur von $+12^{\circ}\text{C}$ belassen. Neben den rekonstruierten Ausgangsplasmiden (pSM6 und pUC18) befinden sich in der Ligationslösung auch die neuen rekombinanten Plasmide pLKM618 und pLKM619. Das Gemisch dieser Plasmide wird durch Transformation in den plasmidfreien Stamm *E. coli* Hb 101 eingeführt. Die Herstellung kompetenter *E. coli* Hb 101-Zellen und die Transformation werden in an sich bekannter Weise ausgeführt. Klone, die die neuen rekombinanten Plasmide pLKM618 und pLKM619 tragen, werden auf LB-Agarplatten selektiert, die mit $100\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Ampicillin und $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Erythromycin versetzt waren. Im Ergebnis dieser Transformation lagen ca. 100 Erythromycin-Ampicillin-resistente Transformantenklone vor. Einige davon wurden einem Plasmid-screening unterworfen, das in an sich bekannter Weise abläuft.

Von diesen Plasmid-Schnellisolaten wurden je $10\mu\text{l}$ mit dem Enzym EcoRI behandelt und im Vergleich mit linearisierten pSM6 und pUC18-Plasmiden gelelektrophoretisch in an sich bekannter Weise analysiert. Je $10\mu\text{l}$ der gleichen Plasmid-Schnellisolate wurden außerdem mit den Enzymen PstI, HindIII, BamHI und Sall behandelt und ebenfalls in an sich bekannter Weise analysiert. Im Ergebnis wurden zwei Transformantenklone identifiziert, von denen einer das 8,3kb große rekombinante Plasmid pLKM618 und der andere das 8,3kb große rekombinante Plasmid pLKM619 trägt (s. Abb. 3). Beide Plasmide besitzen den Polylinker und je zwei Resistenzmarker (Amp^{R} , Em-Lm^{R}).

1 b) Konstruktion der Polylinker tragenden Plasmide pLKM6181 und pLKM6191

Ausreichende Mengen gereinigter pLKM618-DNS und pLKM619-DNS, wie sie für die nachfolgenden Verfahrensschritte nötig sind, werden in der oben bereits für pUC18 beschriebenen Weise aus den Stämmen *E. coli* Hb 101 (pLKM618) und *E. coli* Hb 101 (pLKM619) gewonnen.

Je $5\mu\text{g}$ dieser pLKM618-DNS bzw. pLKM619-DNS werden sodann in getrennten Ansätzen in einem Gesamtvolumen von jeweils $50\mu\text{l}$ mit dem Restriktionsenzym HaeIII in an sich bekannter Weise gespalten. Die entstandenen 10 Fragmente des Plasmids pLKM618 bzw. des Plasmids pLKM619 werden gelelektrophoretisch in an sich bekannter Weise voneinander getrennt. Das aus dieser Spaltung hervorgehende jeweils größte Fragment des Plasmids pLKM618 bzw. des Plasmids pLKM619 zeichnet sich durch eine Molekülgröße von jeweils 5,9kb aus und besteht aus dem vollständigen Plasmid pSM6 mit dem Resistenzmarker Em-Lm^{R} und einem 260bp großen Anteil des Plasmids pUC18 mit der Polylinkersequenz. Diese 5,9kb-großen DNS-Fragmente werden in an sich bekannter Weise aus dem Agarosegel extrahiert. Am Schluß liegen diese DNS-Fragmente gelöst in jeweils $15\mu\text{l}$ 10mM TrisHCl, pH7,5, vor.

Ihre blunt-Enden werden anschließend in getrennten Ligationsexperimenten durch Selbstligation miteinander verknüpft, wobei der HaeIII-Spaltort rekonstruiert wird. Dazu werden jeweils $15\mu\text{l}$ DNS-Lösung mit $2\mu\text{l}$ Ligationspuffer (10fach konzentriert) und 2 Einheiten T4-DNS-Ligase versetzt und über Nacht bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ belassen.

Mit diesem Ligationsgemisch werden am darauffolgenden Tag kompetente Zellen des plasmidfreien *Streptococcus sanguis*-Stammes Challis 6 in an sich bekannter Weise transformiert. Plasmidtragende Transformanten aus beiden Ligationsexperimenten werden auf BHI-Agarplatten mit $5\mu\text{g}$ Erythromycin je ml Agar selektiert. Eine bestimmte Anzahl von Transformantenklonen wird isoliert und in an sich bekannter Weise einem Plasmid-screening unterzogen.

Zur Identifizierung der gewünschten neuen Streptokokken-Vektorplasmide mit Polylinker werden je $15\mu\text{l}$ der Plasmidschnellisolate mit den Restriktionsenzymen, EcoRI, HindIII, PstI, Sall, BamHI, HaeIII, Avall und PvuII gespalten und im Vergleich mit geeigneten Standard-DNS (pSM6 mit EcoRI gespalten; DNS des *E. coli*-Bacteriophagen λ mit HindIII gespalten; pBR322 mit Avall gespalten) in an sich bekannter Weise analysiert.

Zwei Transformantenklone, die je ein Plasmid mit der Größe 5,9kb enthalten, die erwarteten Spaltbilder zeigen, jedoch unterschiedliche Insertionsrichtungen des Polylinkers aufweisen, werden für die Isolation gereinigter Plasmid-DNS ausgewählt.

Die Spaltung dieser gereinigten Plasmid-DNS mit den Enzymen EcoRI, HindIII, BamHI, PstI, SmaI, Sall, HaeIII, Avall und PvuII sowie die nachfolgende gelelektrophoretische Größenanalyse der entstandenen Fragmente gestatten eine eindeutige Identifizierung der neuen Streptokokken-Vektorplasmide pLKM6181 und pLKM 6191. Diese Analyse bestätigt, daß das Polylinker-Fragment von pUC18 in der erwarteten Weise in pLKM6181 bzw. pLKM6191 vorliegt (vgl. Abb.4).

Folgende Spaltorte des Polylinkers erweisen sich als singuläre Spaltorte der Plasmide pLKM6181 und pLKM6191: SstI, XmaI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PstI, SpHI und HaeIII.

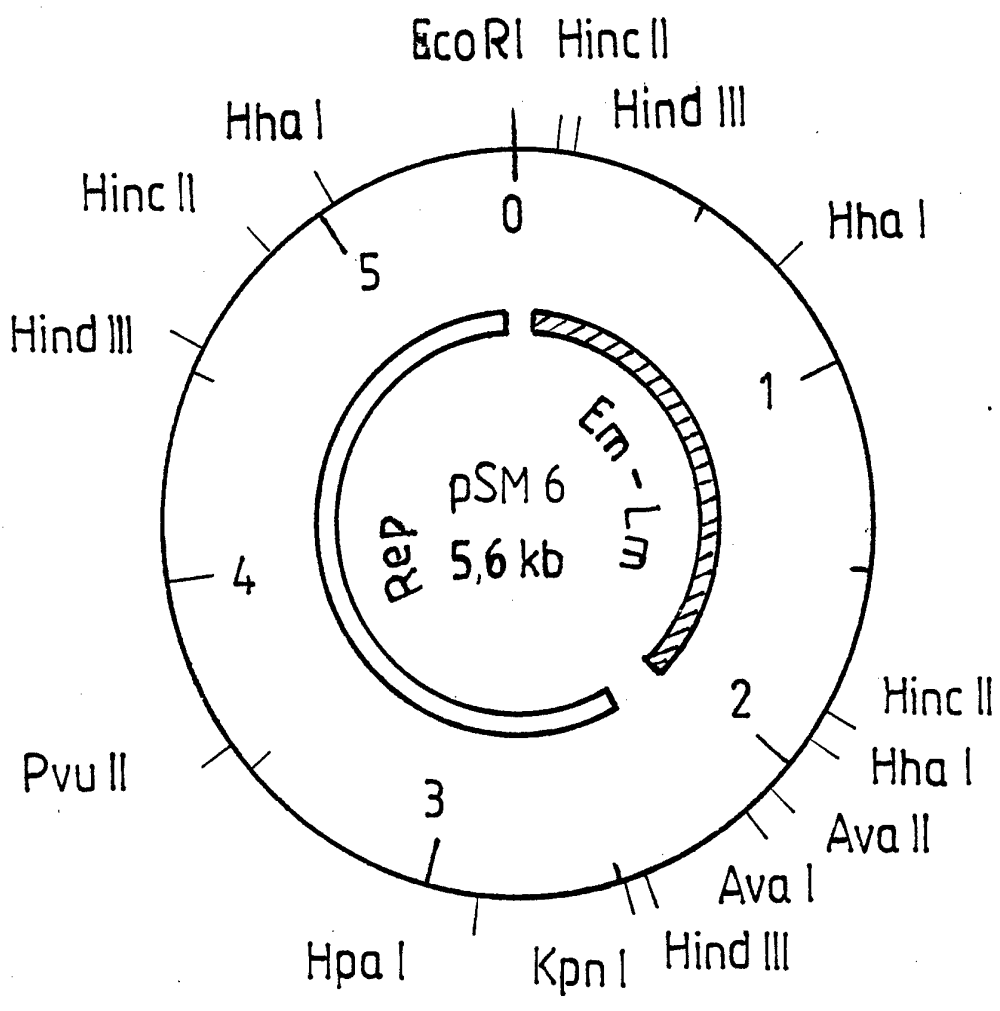


Abb. 1 Karte des Streptokokken-Plasmids pSM6

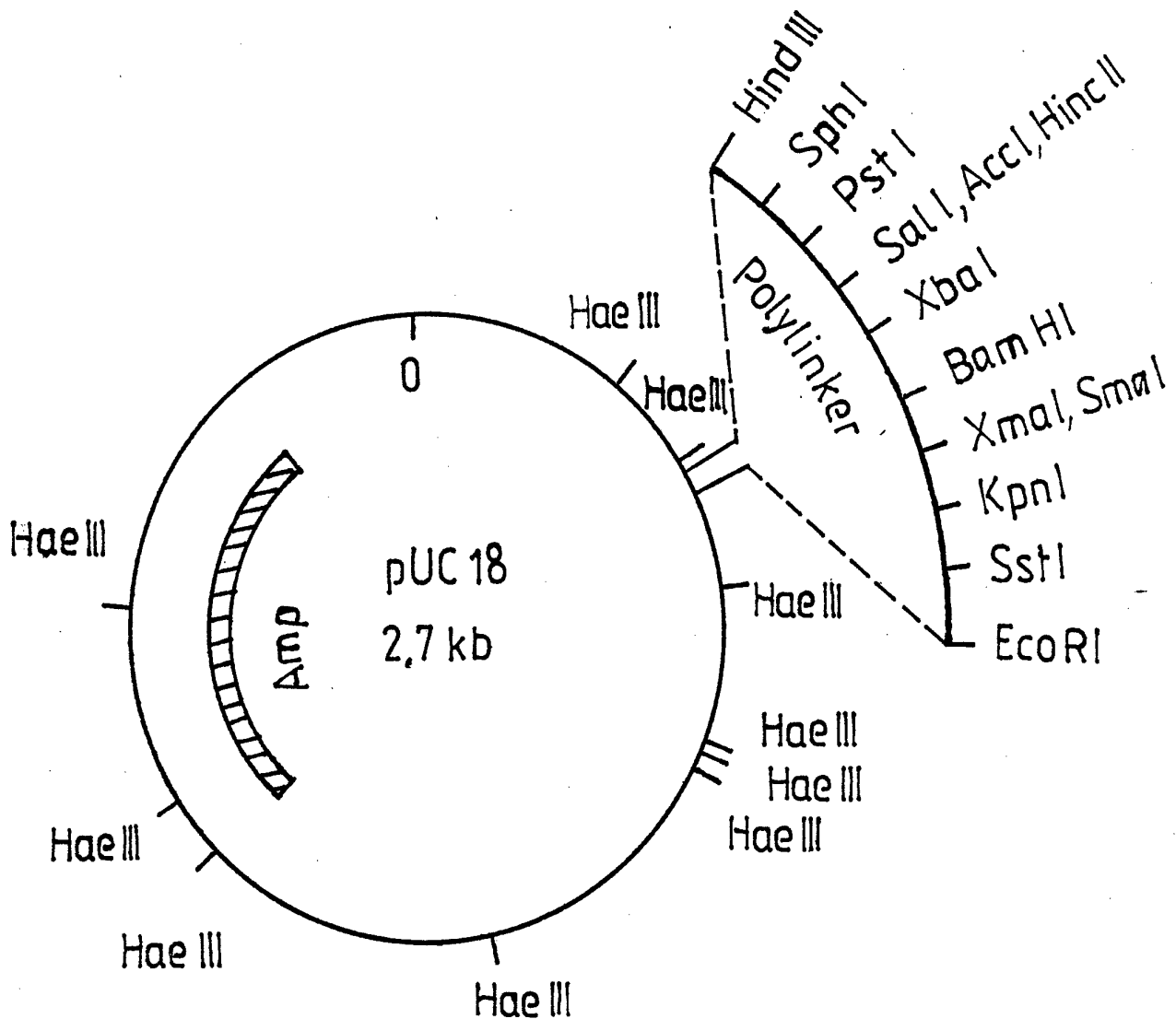


Abb. 2 Karte des Plasmids pUC18 mit Polylinker.

Eingezeichnet wurden nur die für die einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung der rekombinanten Plasmide pLKM6181 bzw. pLKM6191 benötigten Spaltorte (Sequenz des Polylinkers und 10 Hae III - Spaltorte).

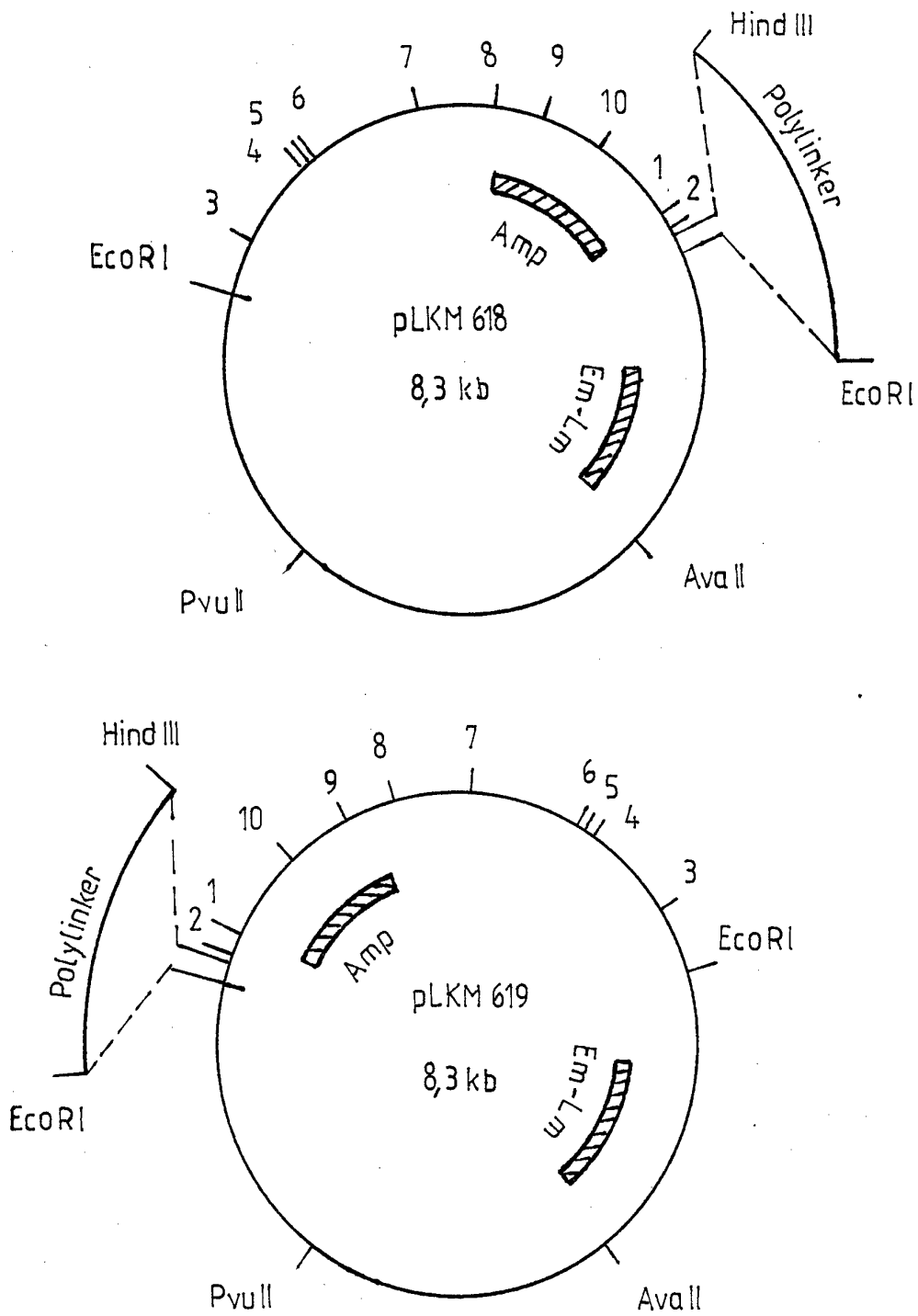


Abb. 3 Karten der Plasmide pLKM618 und pLKM619.

Angegeben sind lediglich die begrenzenden Spaltorte der Polylinkersequenz, die Hae III - Spaltorte 1 bis 10 und die pSM6 - Spaltorte Ava II und Pvu II.

