



Patentdirektoratet
TAASTRUP

-
- (21) Patentansøgning nr.: 2403/84 (51) Int.Cl.5 C 12 N 15/68
 (22) Indleveringsdag: 15 maj 1984 C 12 N 15/70
 (24) Løbedag: 15 sep 1983
 (41) Alm. tilgængelig: 15 maj 1984
 (45) Patentets meddelelse bkg. den: 27 dec 1993
 (86) International ansøgning nr.: PCT/DK83/00086
 (86) International indleveringsdag: 15 sep 1983
 (85) Videreførelsesdag: 15 maj 1984
 (30) Prioritet: 16 sep 1982 DK 4151/82 24 sep 1982 DK 4270/82 09 sep 1983 DK 4107/83
 (73) Patenthaver: *Benzon Pharma A/S; Helseholmen 1; 2650 Hvidovre, DK
 (72) Opfinder: Søren *Molin; DK, Kenn Axø *Gerdes; DK

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft A/S

(54) Stabiliserede plasmider, bakterier indeholdende samme, fremgangsmåde til fremstilling af genprodukt af plasmid-DNA og DNA fragment omfattende R1 fordelingsfunktion

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Cell 20, 529-542 (1980)
 Mol. Gen. Genet 188, 338-344 (1982)
 Plasmid 4, 332-349 (1980)
 J. Bacteriol. 152, 63-71 (1982)
 EMBO J. 2, 27-32 (1983)
 IVA-PM Symposium nr. 3, 75-83 (marts 1982)

(57) Sammendrag:

2403-84

Plasmider, som i sig selv nedarves ustabilt, eller som er blevet ustabile som følge af indsætning af et DNA-fragment, der omfatter ét eller flere gener, som ikke er naturligt forbundne med plasmidet, stabiliseres ved hjælp af en fordelingsfunktion, som udøves af et *par*-område, især et plasmid R1 *par*-område, som er indsat i plasmidet på et DNA-fragment, som kan have længde af vildtype R1 *EcoR*I-A-fragment, men som fortrinsvis er kortere end dette fragment, og som kan omfatte R1 *par*-område A, R1 *par*-område B eller begge disse R1 *par*-områder. Den stabilisering, som opnås for flere forskellige typer plasmider, især ved at anvende begge R1 *par*-områder, nærmer sig vildtypeplasmiders stabilitetsniveau, dvs. de har typisk en tabsfrekvens på mindre end 5×10^{-6} pr. celle pr. generation.

fortsættes

Sådanne stabiliserede plasmider er anvendelige til produktion i stor målestok af genprodukter, da der ikke kræves nogen bestemte bakteriestammer eller -mutanter for at sikre bevaring af plasmidet, og da det ikke er nødvendigt at benytte en bestemt sammensætning af næringsmediet, i hvilket værtscellerne dyrkes, for at forhindre tab af plasmidet fra bakteriepopulationen.

Den foreliggende opfindelse angår stabiliseringen af plasmider, som er nyttige inden for rekombinant DNA-teknologiområdet til fremstilling af gener og produkter deraf.

Den fortsatte bevaring af de fleste naturlige plasmider, selv i fraværelse af selektionstryk (faktorer, som kun sikrer væksten af de organismer, der indeholder plasmiderne; et eksempel er et antibiotikum i næringsmediet i tilfælde af et plasmid, der bærer et gen, som meddeler resistens over for antibiotikummet), tyder på, at plasmidbevaringsfunktioner er blevet udviklet for at sikre den fortsatte tilstedeværelse af disse ekstrakromosomale elementer med høj effektivitet. Plasmidbevaringsfunktionerne består primært af replikationsgenerne, herunder disses kontrolområder, som regulerer plasmidkoncentrationen i cellen. I voksende celler overvåger replikationskontrolsystemet antallet af plasmidkopier og korrigerer afvigelser fra gennemsnittet ved at forøge eller nedsætte sandsynligheden for plasmidreplikation. Imidlertid kan intet replikationskontrolsystem forhindre, at der opstår celler med meget få eller blot én kopi af plasmidet, og ud fra sådanne celler er muligheden for dannelse af en plasmidfri dattercelle åbenlys. Dette problem er naturligvis størst, hvad angår lavkopitalplasmider. Endvidere resulterer en passiv fordeling af plasmidmolekyler ved celledeling uundgåeligt i en vis frekvens af plasmidfri celler. Da tabet af et plasmidmolekyle fra en celle er irreversibelt, er konsekvenserne af en sådan ustabil situation, at hele populationen til sidst bliver plasmidfri.

Udover en tilfældig fordeling af plasmider ved celledeling kan andre faktorer have indflydelse på hyppigheden af tabet af plasmider fra en kultur af celler, der dyrkes i fraværelse af selektion for bevaring af plasmidet. Fx kræver visse plasmider et specifikt rekombinations-system for at adskille to nyligt replikerede molekyler (Austin et al., *Cell* 25, 1981, s. 729-736). Uden adskillelse vil der dannes multimerer (sammengribende), og herved kan selv et højt kopital af et plasmid synes som et lavkopitalplasmid, hvad angår fordeling til datterceller, eftersom sandsynligheden for at genere plasmidfrie celler forøges med stigende antal plasmidmolekyler, som hænger sammen i multimerer. Et andet fænomen, der ofte iagttages inden for rekombinant DNA-teknologien, er omdannelsen af en stabil klo-

ningsvektor til et ustabilt hybridplasmid som følge af indsætningen af et DNA-fragment, hvis tilstedeværelse enten forårsager en nedgang i plasmidkopital eller medfører et skadeligt produkt, som har en negativ indflydelse på cellevækst.

- 5 I alle disse tilfælde forekommer plasmidsegregering og -tab med en frekvens (høj eller lav), som ikke let kan kontrolleres udefra.

Stabiliteten af naturlige plasmider og især lavkopitalplasmider tyder på, at der udover replikationskontrollsystemet er et andet sæt bevaringsfunktioner, som aktivt deltager i en ordnet fordeling af plasmidmolekylerne ved celledeling. Sådanne funktioner er blevet betegnet fordelingsfunktioner, og undersøgelser, fx Meacock et al., *Cell* 20, 1980, s. 529-542, Nordström et al., *Plasmid* 4, 1980, s. 332-349, Seelke et al., *Plasmid* 7, 1982, s. 163-179, har nu vist, at disse i det mindste delvis er indkodet af plasmiderne selv (i *par*-områder).
 15 Således har visse plasmidsletningsmutanter mistet deres stabile bevaring eller nedarvning på trods af deres normale vildtypereplikationsopførsel, hvilket tyder på, at en plasmidspecificeret funktion, som sikrer stabilitet, er blevet fjernet (jfr. Nordström et al., *op. cit.*).

20 Da mange af de plasmider, som anvendes som vektorer i rekombinant DNA-teknologi, har fået fjernet en stor mængde DNA i sammenligning med vildtypestamplasmidet, er de tilbøjelige til at blive ustabilt nedarvet. Dette udgør et alvorligt problem, da ustabilitet hos et plasmid i sidste instans resulterer i et fuldstændigt tab af plasmidet fra cellerne og under alle omstændigheder reducerer det relative udbytte af plasmidindkodede genprodukter. Dette problem er særlig udtalt ved produktion i stor målestok af genprodukter, hvor vækst af mikroorganismer under selektionstryk, fx et antibiotikum, normalt ikke kan lade sig gøre og ofte i det mindste er uønskeligt ud
 25 fra et miljøsynspunkt, og hvor mikroorganismerne dyrkes i et stort antal generationer. Vektorer, som kun er til stede i få kopier pr. celle, er mest tilbøjelige til at blive ustabilt nedarvet og derfor gå tabt fra cellerne. Selv plasmider, der sædvanligvis har et relativt højt kopital, hvilket sikrer en relativ stabilitet af plasmidet,
 30 har i visse tilfælde vist sig at blive ustabile, når DNA-fragmenter,

der bærer gener, som ikke naturligt er forbundet med plasmidet, indsættes deri.

Den foreliggende opfindelse angår plasmider, der replikerer i gram-negative bakterier, og som er ejendommelige ved, at de bærer ét eller
5 flere indsatte gener, der ikke naturligt er forbundet med plasmidet, og som desuden bærer et indsat DNA-fragment, som udøver en fordelingsfunktion, hvilket DNA-fragment er kortere end 19 kb, og hvilket DNA-fragment omfatter den plasmidstabiliserende DNA-sekvens R1 par-område A, den plasmidstabiliserende DNA-sekvens R1 par-område B eller
10 både R1 par-område A og R1 par-område B. Udtrykket "indsat" skal betyde, at genet eller generne eller DNA-fragmentet er blevet indført i plasmidet i et trin under konstruktionen af det færdige plasmid.

In nærværende sammenhæng betegner udtrykket "en fordelingsfunktion" en funktion, som sikrer en ordnet fordeling af plasmidmolekylerne ved
15 celledeling, og som indkodes af et område på et plasmid, der afhængig af den type plasmid, som udtrykker funktionen, kan omfatte ét eller flere gener. Som nævnt ovenfor findes sådanne områder i naturligt forekommende eller vildtypeplasmider, men plasmider, der udtrykker en Par⁺-fænotype, dvs. på hvilke fordelingsgenerne er til stede, og som
20 også bærer ét eller flere indsatte gener, der ikke naturligt er forbundet med plasmidet, anses for at være hidtil ukendte. I denne sammenhæng er plasmider defineret som naturligt forekommende ekstrakromosomale elementer i mikroorganismer, hvilke elementer er mulige at isolere som sådanne, eller derivater deraf.

25 Plasmiderne ifølge opfindelsen kan anvendes som klonings- eller produktionsvektorer inden for rekombinant DNA-teknologiområdet med det formål at udvinde en lang række produkter til tekniske eller medicinske formål, der direkte eller indirekte er medieret af det eller de indsatte gener, især polypeptider og proteiner eller fragmenter
30 deraf, enzymer og et antal ikke-proteinøse produkter af reaktioner med enzymer, lavmolekylære produkter såsom hormoner, og nukleinsyrer; produkter fra eukaryote gener, især pattedyrsgener, har særlig interesse.

I overensstemmelse med den foreliggende opfindelse er fordelingsfunktionen en funktion, der i naturen udtrykkes af et område fra vildtyperesistensplasmidet R1, og som derfor i det følgende betegnes som et R1 *par*-område. Ifølge den foreliggende opfindelse har et

5 sådant område vist sig at forårsage delvis eller fuld stabilitet ikke alene hos ustabile R1 miniplasmider, som bærer ét eller flere gener, der ikke er naturligt forbundet med plasmidet, men også hos hyppigt segregerende plasmider, der ikke er forbundet med plasmidet R1, og som bærer ét eller flere gener, der ikke naturligt er forbundet med

10 plasmidet. Et andet eksempel på en særlig værdifuld fordelingsfunktion er den fordelingsfunktion, som findes på vildtypeplasmidet F (Seelke et al., op. cit.), der også meddeler en høj grad af stabilitet til modtagerplasmidet. I det følgende vil der primært blive henvist til R1 *Par*-funktionen, men det er klart, at mange af de

15 fænomener, som er forbundet med R1 *Par*-funktionen, også gælder for andre *Par*-funktioner.

Det er tidligere blevet angivet, at plasmid R1's fordelingsfunktion udøves af det såkaldte *EcoR1*-A-fragment (jfr. Nordström et al., *Plasmid* 4, 1980, s. 332-349). I forbindelse med den forskning, der

20 har ført til den foreliggende opfindelse, har det overraskende vist sig, at *EcoR1*-A-fragmentet, der har en længde på ca. 19 kb (19.000 basepar), omfatter to og kun to adskilte områder, som meddeler modtagerplasmidet en *Par*⁺-fænotype. Disse områder er anbragt i hver sin ende af *EcoR1*-A-fragmentet, og ingen anden DNA-sekvens i *EcoR1*-A-

25 fragmentet antages for tiden at have nogen plasmidstabiliserende funktion. Til nærværende formål er de to områder blevet betegnet *par*-område A og *par*-område B, forkortet til henholdsvis *parA* og *parB*.

Da det er en fordel at operere med så små DNA-fragmenter som muligt, fordi små fragmenter er lettere at indsætte i plasmiderne, og de

30 resulterende plasmider er lettere at transformere til værtsceller, angår opfindelsen plasmider, der bærer et indsat DNA-fragment, som er kortere end *EcoR1*-fragmentet fra plasmid R1, og som indeholder et R1 *par*-område. Dette indsatte DNA-fragment omfatter sædvanligvis som sin hovedbestanddel R1 *par*-område A, R1 *par*-område B eller både R1

35 *par*-område A og R1 *par*-område B. Dette betyder, at i det væsentlige hele DNA-fragmentet, som er indsat i værtsplasmidet, udgøres af ét af

de to eller begge *par*-områderne, og at resten af DNAet på fragmenterne fortrinsvis er til stede for at tilvejebringe hensigtsmæssige restriktionssteder, der forsyner DNA-fragmenterne med de ønskede ender, som umiddelbart er kompatible med et tilsvarende eller kompatibelt restriktionssted på modtagerplasmidet. Sådanne ender kan også tilvejebringes ved hjælp af linkere. Det skal dog bemærkes, at DNA-fragmentet, som omfatter *par*-område A, og DNA-fragmentet, der omfatter *par*-område B, kan indføres separat og sekventielt i det samme plasmid, som derefter fænotypisk vil være identisk med et plasmid, i hvilket fænotypen *ParA*⁺, *ParB*⁺ er blevet etableret ved at indsætte *par*-område A og *par*-område B på samme DNA-fragment. Hvis det fx ønskes yderligere at stabilisere et plasmid, der allerede bærer et *par*-område såsom *parB*-området, kan plasmidet kløves med et hensigtsmæssigt restriktionsenzym, og et DNA-fragment, som har ender, der er kompatible med dette restriktionssted, og som bærer det andet *par*-område såsom *parA*-området, kan derefter indsættes. Den modsatte proces, dvs. indsætning på tilsvarende måde af et *parB*-område på et plasmid, der allerede bærer et *parA*-område, kan også udføres.

I overensstemmelse hermed er interessante plasmider plasmider, hvor det indsatte DNA-fragment, som omfatter R1 *par*-område A og R1 *par*-område B, har en længde, som ikke overstiger ca. 6 kb, især ikke ca. 4 kb, navnlig ikke 3 kb. Når det indsatte DNA-fragment omfatter R1 *par*-område A, har det normalt en længde, der ikke overstiger ca. 4 kb, især ikke ca. 2,5 kb, navnlig ikke ca. 2 kb. Når det indsatte DNA-fragment omfatter R1 *par*-område B, har det normalt en længde, som ikke overstiger ca. 2 kb, især ikke ca. 1,5 kb, navnlig ikke ca. 1 kb. Størrelsen af *EcoRI*-A-fragmentet, kan reduceres på forskellige måder såsom ved delvis restriktion af *EcoRI*-A-fragmentet med restriktionsenzymet *PstI*, eller ved at udskære hvert R1 *par*-område fra det store fragment og overføre hvert område sekventielt til det samme DNA-fragment, som derefter kan indsættes i det plasmid, der skal stabiliseres.

De plasmider, som stabiliseres i overensstemmelse med opfindelsens princip, kan enten være plasmider, som er naturligt forbundne med det indsatte fordelingsområde, såsom R1-mini-plasmider, der stabiliseres ved hjælp af et indsat R1 *par*-område (R1-mini-plasmider har fået

slettet meget af det oprindelige R1 DNA og indeholder derfor ikke sædvanligvis i sig selv et R1 *par*-område), eller de kan være plasmider, som ikke er naturligt forbundne med fordelingsfunktionen. Det er interessant at bemærke, at effektive fordelingsfunktioner, som kan anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, er i stand til at sikre en tilfredsstillende stabilitet af ikke alene plasmider, med hvilke de er naturligt forbundne såsom i tilfælde af stabilisering af R1-miniplasmider med et R1 *par*-område, men også plasmider, med hvilke fordelingsfunktionen ikke er naturligt forbundet. Et eksempel på sidstnævnte er indsætning af et R1 *par*-område i et ikke-R1 plasmid såsom et pMB1 plasmid eller derivat deraf såsom et pBR322 plasmid eller derivat deraf (disse plasmider er sædvanligvis stabile, men er tilbøjelige til at blive ustabile, når ét eller flere gener, der ikke er naturligt forbundne med plasmidet, indsættes). Et andet eksempel er anvendelsen af et R1 *par*-område til stabilisering af visse plasmidtyper, som i det mindste i ét trin under dyrkningen af bakterier, som indeholder plasmidet, har et lavt kopital, fx et kopital på 0,5-5 kopier pr. celle såsom promiskuøse plasmider (plasmider, der er i stand til at replikere i mange forskellige værtsstammer eller -arter; denne klasse omfatter de såkaldte shuttle-vektorer, der kan replikere i to eller flere typer mikroorganismer) med lavt kopital og derivater deraf, fx RK2. Bortset fra R1 omfatter andre plasmider fra inkompatibilitetsgruppen IncFII, der kræver stabilisering, fx R100 og R6.

En type plasmider, for hvilke stabilisering ifølge den foreliggende opfindelse er vigtig, er betinget runaway-replikationsplasmider, dvs. plasmider, der, når værtsmikroorganismer, som indeholder plasmiderne, dyrkes under visse betingelser, har et konstant lavt plasmidkopital, og som, når mikroorganismerne, som indeholder plasmiderne, dyrkes under visse andre betingelser, mister deres replikationskontrol, således at plasmidkopitalet forøges eksponentielt, indtil værtscellen ophører med at vokse. Runaway-replikationsplasmider, for hvilke stabilisering ifølge opfindelsen er særlig vigtig, er runaway-replikationsplasmider med et kopital, der ikke overstiger ca. 3-5 kopier pr. celle, og især plasmider, hvis kopital ikke overstiger ca. 0,5-1 kopi pr. celle (tallet 0,5 skal betegne, at replikationsfrekvensen er mindre end 1 pr. cellecyklus), når mikroorganismer, som indeholder plasmiderne, dyrkes under sådanne betingelser, som sikrer et sådant

lavt plasmidkopital, og som, når værtsmikroorganismerne dyrkes under visse andre betingelser, der sikrer et væsentligt forøget plasmidkopital, har et kopital i området mindst ca. 500-1000 kopier pr. celle.

- 5 Det lave plasmidkopital under visse betingelser (typisk en lav temperatur såsom en temperatur på ca. 30°C) er ønskeligt, når plasmiderne anvendes som vektorer til indsætning af fremmede gener, som koder for produkter, der er delvis toksiske eller dødelige for værtscellen, da generne som følge af plasmidernes lille replikationshyppighed ved fx
- 10 en lav temperatur kun udtrykkes i små mængder om overhovedet, således at cellerne forbliver ubeskadigede i opformeringstrinnet af dyrkningen. I plasmider med et så ekstremt lavt kopital som det ovenfor anførte under de i opformeringstrinnet anvendte betingelser, såsom dyrkning af celler ved en lav temperatur, medfører mangelen på et
- 15 par-område imidlertid, at plasmidet går tabt fra den mikrobielle population med en frekvens på ca. 1% pr. generation for plasmider med et kopital, der ikke overstiger 3-5 kopier pr. celle, når disse dyrkes under betingelser, som sikrer et sådant lavt kopital. Tabsfrekvensen for plasmider med et kopital, der ikke overstiger ca. 0,5-1
- 20 kopi pr. celle, er ca. 5%/celle/generation. Det er klart, at plasmiderne vil gå tabt fra cellerne, før cellerne har nået en sådan densitet i næringsmediet, at det er økonomisk at inducere runaway-replikation, medmindre de har en fordelingsfunktion til stabilisering deraf; dette er særlig tilfældet ved produktion i stor målestok, som
- 25 kræver mange hundrede generationers cellevækst for at komme op på en kultur i produktionsstørrelse.

- En sådan runaway-replikation kan gøres betinget ved at indsætte en regulerbar promotor oven for det eller de naturlige replikationskontrolgener på plasmidet (en detaljeret beskrivelse af dette fænomen
- 30 findes i nærværende ansøgers samtidigt indleverede ansøgning med titlen "Plasmider med betinget ukontrolleret replikationsopførsel", der er indleveret på samme dag som nærværende ansøgning). Plasmider med runaway-replikationsopførsel kan være af mange forskellige typer, men foretrukne runaway-replikationsplasmider er R1-type plasmider.

I nærværende beskrivelse betegner udtrykket "stabilitet" (og dermed forbundne udtryk) en tabsfrekvens for plasmidet fra værtscellen på mindre end 2×10^{-4} pr. celle pr. generation. Det er faktisk muligt at opnå plasmider, som er lige så stabile som vildtypeplasmider, dvs. med en tabsfrekvens på mindre end 3×10^{-6} pr. celle pr. generation, hvilket svarer til niveauet for mutationshyppighed af gener, ved at inkorporere en Par-funktion i plasmidet. Denne tabsfrekvensværdi (LF) er tydelig, når plasmiderne er stabiliseret med både R1 *par*-område A og R1 *par*-område B, såsom når hele *Eco*R1-A-fragmentet er blevet indsat i plasmiderne.

Som nævnt ovenfor er Par⁺-fænotypen hos plasmid R1 imidlertid blevet lokaliseret til hvert separat *par*-område på *Eco*R1-A-fragmentet. Det har vist sig, at hvert af disse *par*-områder har en stabiliserende virkning på ustabile plasmider, som kan defineres som plasmider, der mangler en stabiliserende eller fordelende funktion. Sådanne plasmider, som fænotypisk er Par⁻, går sædvanligvis tabt fra værtscellen med højere eller lavere frekvens; fx går plasmid R1-derivater, hvorfra *par*-området er blevet fjernet, således tabt fra værtscellen med en frekvens på ca. $1,5 \times 10^{-2}$ pr. celle pr. generation. Tilsvarende går plasmid p15-derivater, som er Par⁻, tabt med en frekvens på ca. 1×10^{-2} pr. celle pr. generation, og nogle plasmid pMB1 (pBR322) derivater (såsom det i eksempel 3.3 beskrevne) kan gå tabt med en frekvens på ca. 6×10^{-3} /celle/generation. Modsat har R1-plasmider, som er stabiliseret med enten *parA* eller *parB* alene, en LF-værdi på ca. 10^{-4} pr. celle pr. generation svarende til 100 ganges stabilisering, når et DNA-fragment, der bærer ét af disse *par*-områder, indsættes i en ustabil vektor; tallene for et tilsvarende p15-derivat er ca. 8×10^{-4} (ParA⁺), 1×10^{-6} (ParB⁺), og tallene for et tilsvarende pMB1-derivat er 5×10^{-5} (ParB⁺). Plasmider, som bærer både *parA*- og *parB*-området, har en LF-værdi på ca. 10^{-6} pr. celle pr. generation eller en 10^4 ganges stabilisering. For at lette overskueligheden er resultaterne for stabiliserede og ustabiliserede replikons af forskellig oprindelse vist i tabel 1. Dette viser, at hvert *par*-område virker uafhængigt af det andet, at *par*-områderne er omtrent lige effektive til stabilisering af i det mindste R1- og p15-plasmider, og at deres virkning er kumulativ. Denne viden kan udnyttes, når man bestemmer den grad, hvormed et ustabil plasmid skal stabiliseres.

Hvis en mindre drastisk stabilisering er nødvendig, dvs. hvis det antages, at det plasmid, som skal stabiliseres, ikke er overordentligt ustabil (med en LF-værdi på mindre end 10^{-2} /celle/generation), kan det være tilstrækkeligt at indsætte et DNA-fragment, som indeholder ét af *par*-områderne for at opnå en tilfredsstillende stabilitet, dvs. forhindre et gradvis tab af plasmidet fra en bakteriepopulation til produktion i stor målestok i løbet af flere hundrede generationer. Hvis plasmidet på den anden side er meget ustabil (med en LF-værdi på mere end 10^{-2}), kan det være nødvendigt eller i det mindste fordelagtigt at indsætte begge *par*-områder for at sikre en ekstrem stabilitet hos plasmiderne.

Tabel 1

Tabsfrekvenser/celle/generation af forskellige replikons

Type replikon	Tabsfrekvens x 10^{-4} /celle/generation			
	Par ⁻	ParA+	ParB+	ParA+ ParB+
R1	150	0,6	1,0	0,04
p15	100	8,0	0,01	0,01
pMB1 (pBR322)	60	ND ¹	0,5	0,1

¹ ND = ingen data

Disse målelige LF-værdier kan udnyttes, når plasmider af en af de ovennævnte typer skal anvendes som vektorer til produktion af genprodukter, og således skal indeholde mindst ét gen, der ikke naturligt er forbundet med plasmidet. I et yderligere aspekt angår den foreliggende opfindelse således en fremgangsmåde til fremstilling af et genprodukt fra plasmid DNA, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at bakterier, som indeholder et plasmid ifølge et hvilket som helst af kravene 1-16, dyrkes, og genproduktet af plasmidet udvindes fra bakteriekulturen. Dyrkningen som sådan udføres hensigtsmæssigt under anvendelse af sædvanlige teknikker, herunder sædvanlige næringsmedier, som vides at være optimale for den pågældende bakterieart. Det er værd at anføre, at der som følge af stabiliseringen ikke

kræves nogen specifik sammensætning af næringsmediet. Udvindingen af genproduktet udføres også i henhold til velkendte metoder, som er tilpasset arten og egenskaberne af det bestemte genprodukt, som fremstilles, værtsbakteriens egenskaber, etc. Dyrkningen fortsætter i

5 mindst 100 bakteriegenerationer; ved produktion i stor målestok kan antallet af cellegenerationer, som er nødvendigt for at opformere bakterien, overstige 100 generationer. Under disse omstændigheder udvælges plasmidets LF-værdi ved tilstedeværelsen af et *par*-område deri på en sådan måde, at tabet af plasmidet er mindre end 2×10^{-4} /celle/generation. Denne LF-værdi kan sædvanligvis opnås ved hjælp

10 af ét *par*- område alene. I nogle tilfælde foretrækkes det imidlertid at opnå LF-værdier for plasmidet på mindre end 10^{-5} /celle/generation, især mindre end 5×10^{-6} /celle/generation.

Selv om disse meget lave LF-værdier i visse tilfælde kan opnås ved

15 indsætning af bare ét *par*-område (især R1 *par*-område B), kræves sædvanligvis tilstedeværelsen af begge R1 *par*-områder.

I et yderligere aspekt angår opfindelsen gram-negative bakterier, som indeholder plasmider ifølge opfindelsen. Det er en særlig fordel ved plasmiderne ifølge opfindelsen, at der ikke kræves særlige mutanter

20 eller stammer for at sikre bevaring af plasmidet. Således kan der anvendes en hvilken som helst bakterieart og -stamme, som er i stand til at indeholde sådanne plasmider, såsom gramnegative bakterier. Et specifikt eksempel på en bakterie, i hvilken plasmider ifølge den foreliggende opfindelse kan replikere og bevare deres stabilitet, er

25 *Escherichia coli*.

Den foreliggende opfindelse angår sluttelig et DNA-fragment, som er kortere end 19 kb og som er ejendommelig ved, at det omfatter R1 *par*-området A, R1 *par*-området B eller både R1 *par*-område A og R1 *par*-område B. Dette betyder, at i det væsentlige hele DNA-fragmentet, som

30 indsættes i værtsplasmidet, består af ét af de to eller begge *par*-områderne, og det resterende DNA er til stede for at tilvejebringe hensigtsmæssige restriktionssteder til indsætning i et kompatibelt restriktionssted på modtagerplasmidet. Det indsatte DNA-fragment, der omfatter R1 *par*-område A og R1 *par*-område B, bør i henhold til dette

35 princip have en længde, der ikke overstiger ca. 6 kb, især ikke ca.

4 kb, navnlig ikke 3 kb. Når DNA-fragmentet omfatter R1 *par*-område A, har det sædvanligvis en længde, som ikke overstiger ca. 4 kb, især ikke ca. 2,5 kb, navnlig ikke ca. 2 kb. Når DNA-fragmentet omfatter R1 *par*-område B, har det sædvanligvis en længde, som ikke overstiger ca. 2 kb, især ikke ca. 1,5 kb, navnlig ikke ca. 1 kb. Det har overraskende vist sig, at sådanne små og derfor let indførlige DNA-fragmenter har bevaret deres stabiliserende funktion, da *parA*-området ved restriktionsenzymkortlægning er blevet reduceret til et område med en længde på ca. 1800 bp (basepar), og *parB*-området er blevet reduceret til ca. 900 bp. Det er muligt, at genet eller generne, som faktisk meddeler en Par⁺-fænotype, er endnu mindre.

Et alvorligt problem ved konstruktion af hybridplasmider med en Par⁺-fænotype har været mangelen på hurtige og enkle metoder til screening for denne fænotype. Sædvanligvis kan de korrekte hybridplasmider identificeres ved Par⁺-fænotypen, der medfører høj stabilitet af plasmidet ved vækst af plasmidet uden selektionstryk. Denne type screening er imidlertid langvarig og er under alle omstændigheder kun relevant, hvis stamplasmidet nedarves ustabilt. Alternative screeningsmetoder er nu blevet udviklet som beskrevet nedenfor.

20 a) Screening for indsætning af ParA⁺-fragmenter

Hvis to forskellige plasmider (fra hver sin inkompatibilitetsgruppe), der begge bærer *parA*⁺-området, findes i samme celle, fordriver de hinanden med en vis frekvens (inkompatibilitet), sandsynligvis fordi de konkurrerer om cellens fordelingsmekanismer. Denne type *par*-medieret inkompatibilitetsfænotype kan udnyttes til screening for *par*-hybrider. Et ParA⁺-plasmid kan fx transformeres til en Δ *lac* *E. coli*-stamme (fx CSH50), der indeholder et andet plasmid, som bærer *lac*-generne og *parA*⁺-området. Normalt vil det indkommende plasmid udøve *par*⁺-medieret inkompatibilitet mod det ParA⁺-plasmid, som allerede findes i cellen. Som følge af Lac⁺-fænotypen hos det plasmid, der allerede findes i cellen, detekteres en sådan inkompatibilitet let, hvis transformanter udvælges på grundlag af en resistensmarkør, som kun findes på det indkommende plasmid, hvorimod tilstedeværelsen eller fraværelsen af det plasmid, der allerede findes i cellen, iagttages på indikatorsubstrater såsom McConkey-lactosepla-

der. Replikaudpladning af kolonier fra sådanne plader til nye tilsvarende plader afslører selv lave niveauer af fordrivning af det plasmid, som allerede findes i cellen, i form af farveløse kolonier, som viser forekomsten af Lac⁻-celler. En yderligere stabilitetstest eller mere omfattende inkompatibilitetstest kan være påkrævet for at teste egenskaberne af potentielle *parA*⁺-hybridplasmider. Herved er det muligt - ved at anvende den korrekte (kompatible eller måske netop inkompatible) kombination af indkommende og allerede foreliggende plasmider - hurtigt at screene for indsætning af Inc⁺ (Par⁺)-fragmenter i et hvilket som helst plasmid, hvad enten det er ustabilt eller stabilt.

b) Screening for indsætning af *parB*⁺-fragmenter

Eftersom det også er blevet påvist, at to urelaterede plasmider, der begge bærer *parB*⁺-området, er inkompatible med hinanden, kan samme screeningsstrategi som den, der er beskrevet for konstruktionen af *parA*⁺-hybrider, anvendes til konstruktioner af *parB*⁺-hybrider.

c) Screening for indsætning af *parA*⁺, *B*⁺-fragmenter

Udover at kunne fordrive både *parA*⁺- og *parB*⁺-hybridplasmider i henhold til ovenstående beskrivelser muliggør *EcoRI*-A-fragmentet med Tn5-indsætningen en direkte udvælgelse (Km^R) for plasmider, som bærer *parA*⁺, *parB*⁺-fragmentet. På trods af fragmentets store størrelse selekteres der således let for selv meget få hybrider. Et mindre DNA-fragment, som omfatter begge *par*⁺-områder, udøver naturligvis også inkompatibilitet mod både *parA*⁺- og *parB*⁺-plasmider.

Opfindelsen belyses nærmere under henvisning til tegningen, hvor fig. 1-5 og 7-17 viser restriktionskort over de i eksemplerne beskrevne plasmider, fig. 6 viser et detaljeret kort (ikke tegnet i samme målestok) af *PstI*-D-fragmentet fra R1, og fig. 18 viser stabilitetskurver for forskellige typer replikon bærende forskellige *par*-områder sammenlignet med Par⁻-replikons.

- I fig. 1-5 og 7-17 vises lineære restriktionskort over de i eksemplerne beskrevne plasmider, hvor plasmidernes fænotyper og genotyper er vist oven for den vandrette linje, som betegner stamplasmidet. Således betegner *parA* ét af de områder af plasmid R1, som sikrer
- 5 bevaring af plasmidet, *parB* betegner det andet område af plasmid R1, som sikrer bevaring af plasmidet; *iceI* betegner et gen, som medierer immunitet over for colicin E1; *ori* eller *oriV* betegner initieringsstedet for plasmidreplikation; *bla* betegner et gen, som indkoder ampicillinresistens; IR betegner en inverteret gentagen struktur på
- 10 Tn5; Km^R betegner kanamycinresistens; Cm^R betegner chloramphenicolresistens; Ap^R betegner ampicillinresistens; Tc^R betegner tetracyclinresistens; *repA* betegner et gen, der koder for et protein, som kræves for R1-replikation; *lacZ*, *lacY* og *lacA* betegner det indsatte *lac*-operon, hvoraf *lacZ* koder for β -galactosidase, *lacY* koder for
- 15 permease, og *lacA* koder for transacetylase; *repA-lacZ'* betegner en fusion mellem *repA*- og *lacZ*-generne; *copB* betegner et gen, der koder for et polypeptid, som represserer transkription fra *repA*-promotoren (på R1-plasmider); *copA* betegner et gen, der koder for et RNA-molekyle, som inhiberer translation af RepA-RNA; *cI*₈₅₇ betegner et gen,
- 20 som koder for en temperaturfølsom λ -repressor, som kontrollerer λ P_R-promotoraktivitet; P_{deo} betegner *deo*-promotoren. Pilen viser transkriptionsretningen, og "trekanterne" betegner indsætninger af DNA. De sorte områder og de hvide områder betegner indsatte gener; den stiplede linje betegner en sletning.
- 25 Under den vandrette linje er stederne for restriktionsenzym vist, hvor E betegner *EcoR*I; P betegner *Pst*I, B₁ betegner *Bam*HI undtagen i fig. 1 og 5, hvor det uden for Tn5 DNA betegner *Bal*I; H₁ betegner *Hpa*I; E_v betegner *EcoR*V; B₂ betegner *Bgl*II; S₁ betegner *Sal*I; H₃ betegner *Hind*III; og C betegner *Cla*I.
- 30 I fig. 6 er *Pst*I-D-fragmentet blevet kortlagt yderligere; tallene over den vandrette linje viser antallet af basepar mellem restriktionsstederne. Under den vandrette linje er stederne for restriktionsenzym vist, hvor R₁ betegner *Rsa*I; P betegner *Pst*I; og H₁ betegner *Hpa*I.

I fig. 18 vises stabilitetskurver for R1-, p15- og pBR322-derivater, som er konstrueret og testet i eksemplerne. Hver kurve betegner gennemsnittet for mindst to væskeskulturer, som er overvåget i over 100 generationer. Det fremgår af figuren, at plasmider, som indeholder både *parA* og *parB* nedarves yderst stabilt, hvilket også er tilfældet med plasmider, som kun indeholder *parB*, og mini-R1-plasmider, som kun er stabiliseret med *parA*.

Det fremgår af kurverne for Par^- -plasmider, at frekvensen af plasmidbærende celler indledningsvis reduceres eksponentielt som forventet på grund af en konstant tabshyppighed. I senere stadier synes frekvensen for plasmidbærende celler at reduceres hurtigere (vist med de fuldt optrukne linjer) som følge af en lidt hurtigere væksthastighed for plasmidfri celler. Den stiplede linje viser kurven, som er korrigeret med hensyn til denne større væksthastighed for at vise den virkelige tabsfrekvens.

I modsætning hertil går plasmider, som fænotypisk er Par^- , tabt med en frekvens på $1,5 \times 10^{-2}$ /celle/generation for R1-plasmider, 1×10^{-2} /celle/generation for p15-plasmider og 6×10^{-3} /celle/generation for visse pBR322-plasmider, hvorpå der er beskrevet et eksempel i eksempel 3.3. Tabsfrekvenserne for p15 Par^- - og pBR322 Par^- -derivater er faktisk overraskende høje i betragtning af disse vektorers kopital. Kopitallet af p15 er fx i størrelsesordenen 15-20 pr. celle, hvorfor der kan forudsiges en tabshyppighed på 10^{-9} /celle/generation, hvis man antager, at plasmiderne fordeles binomialt. Den iagttagne høje tabshyppighed kan imidlertid let forklares ved, at p15-replikons danner *recA*-afhængige sammenhængende molekyler, antageligvis på grund af mangelen på en *loxP*-lignende adskillelsesfunktion (Austin et al., *Cell* 25, 1981, s. 729-736). Også pBR322-derivater vides at danne sammenhængende molekyler, og når kopitallet daler på grund af fx store klonede fragmenter, følger en væsentlig ustabilitet.

MATERIALER OG METODER

Den anvendte stamme af *Escherichia coli* K-12 var CSH50 (Δ *pro-lac*, *rpsL*; jfr. J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring

Harbor, New York, 1972). Der anvendtes flere plasmider og bacteriophager (tabel 2).

De anvendte forsøgsteknikker var standardteknikker, som anvendes inden for området mikrobiel genetik (J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York, 1972) og genetisk
5 manipulation (Davis, Botstein og Roth, *A Manual for Genetic Engineering; Advanced Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor, New York, 1980).

Alle celler blev dyrket i LB-medium (Bertani, *J. Bact.* 62, 1951, s. 293) med 0,2% glucose og 1 µg/ml thiamin eller A+B-minimalmedium
10 (Clark og Måløe, *J. Mol. Biol.* 23, 1967, s. 99) beriget med 0,2% glucose og 1% casaminosyrer. De anvendte plader var LA-plader indeholdende LB-medium og 1,5% agar.

McConkey-lactoseindikatorplader blev fremstillet som anbefalet af fabrikanten (Difco), og X-gal-plader blev fremstillet ved at tilsætte
15 20-40 µg/ml 5-brom-4-chlorindolyl-β-D-galactosid til A+B-minimalmedium beriget med 0,2% glucose og 1 µg/ml thiamin.

Fysisk-kemiske metoder

Der blev fremstillet klarede lysater i henhold til den af Clewell og
20 Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1969, s. 1159-1166, beskrevne metode.

Fremstilling i lille målestok af plasmid DNA blev udført i henhold til den af Birnboim et al., *Nucl. Acids Res.* 7, 1979, s. 1513-1523, beskrevne metode.

25 Fremstilling i stor målestok og analyse af plasmid DNA blev udført under anvendelse af "dye buoyant" densitetsgradientcentrifugering i henhold til Stougaard og Molin, *Anal. Biochem.* 118, 1981, s. 181.

Der blev udført polyacrylamidgelelektroforese og agarosegelelektroforese af DNA-præparaterne i det væsentlige som beskrevet af Molin og
30 Nordström, *Methods in Plasmid Biology*, Odense Universitet, 1982.

Restriktionsendonukleaserne blev anvendt i overensstemmelse med de forskrifter, der er givet af fabrikanten (Boehringer, Mannheim eller Biolabs, New England), ved 37°C. Dobbelt- og tripeldigerering blev udført ved at starte med det enzym, der krævede den laveste salt-
5 koncentration, og derefter justere med yderligere puffer, før det næste enzym blev tilsat.

Behandling med exonukleasen *Bal31* blev udført som følger: 0,1 enhed *Bal31* blev sat til 50 µg lineært DNA, og der blev udtaget prøver ved 1', 2', 4', 8', 16', 32' og 60' til 60 mM EDTA, ekstraheret med
10 phenol, ethanoludfældet og gensuspenderet i 20 µl TE-puffer. Halvdel af de 20 µl blev digereret med det passende restriktionsenzym, der blev underkastet agarosegelelektroforese for at bestemme den gennemsnitlige størrelse af DNA-sletninger. Til den anden halvdel
15 sættes den passende linker, og blandingen blev liganeret i 48 timer med et overskud af T4 DNA-ligase.

Ligation af kløvet plasmid DNA blev udført som anbefalet af fabrikanten med undtagelse af stumpendeligation, hvor der tilsættes et overskud af T4 DNA-ligase og ATP.

Mikrobiologiske metoder

20 Fordelingstest I: Konstruktionen af Lac⁺-vektorer gjorde det muligt at bestemme Par⁺-fænotypen af et plasmid ved simpelt hen at udstryge på ikke-selektive McConkey-lactoseplader eller X-gal-plader. Bakterier (Δ lac), som indeholder disse plasmider, medierer en Lac⁺-fænotype, der let iagttages som farvede kolonier på indikatorpladerne, hvorimod plasmidfri celler har en Lac⁻-fænotype og optræder
25 som farveløse kolonier.

Fordelingstest II (anvendt for Lac⁻-plasmider): En koloni fra en selektiv plade (en plade indeholdende et antibiotikum) blev udstrøget på en anden selektiv plade. Fra denne plade blev én koloni udstrøget
30 på en IA-plade således, at der blev dannet enkeltkolonier. Fra IA-pladen blev ca. 10 kolonier suspenderet i 1 ml 0,9% NaCl til en fortynding på henholdsvis 10⁻⁴ og 10⁻⁵. 0,1 ml af 10⁻⁴- og 10⁻⁵-

fortyndingerne blev udstrøget på LA-plader. Ud fra disse plader blev 50 koloniers resistensmønster (200 kolonier, hvis der forventes en svag ustabilitet) testet på de hensigtsmæssige selektive plader. Tabsfrekvensen (LF- værdien) beregnes derefter på grundlag af formlen

$$5 \quad LF = 1 - (\nu)^{(1/27)}$$

hvor ν står for frekvensen af plasmidbærende celler og under den forudsætning, at én koloni vokser i 27 generationer. Inherent i denne metode er en stor statistisk fluktuation.

Fordelingstest III: Kvantitative målinger af stabiliteten af Lac⁺- og
 10 Lac⁻-plasmider. En hel koloni blev taget fra en selektiv plade og re-suspenderet i 1 ml 0,9% NaCl til en koncentration på 10^8 celler/ml. 2 x 0,1 ml af 10^{-3} -fortyndingen blev anvendt til at pøde 2 x 10 ml LB-medium, og podningen blev udført ved 30°C under omrystning. Ved en celledensitet på ca. 5×10^8 celler/ml blev kulturerne fortyndet 10^4
 15 og 10^5 gange. 0,1 ml af 10^4 -fortyndingen (5×10^3 celler) blev anvendt til at pøde 10 ml frisk LB-medium, og 0,4 ml af 10^5 -fortyndingen blev udstrøget på McConkey-lactoseplader, og pladerne blev podet ved 30°C natten over. Fortyndingen fra 5×10^8 /ml til 5×10^2 /ml svarer til 20 generationers vækst (2^{20}), således at foran-
 20 dringen i frekvensen af plasmidbærende celler fra én fortynding til den næste svarer til den forandring, som forekommer i løbet af 20 generationers vækst. Mere generelt kan LF-værdien beregnes som følger:

$$\nu_1 = (1 - LF)^{g_1} \text{ og } \nu_2 = (1 - LF)^{g_2}$$

25 hvor ν_1 og ν_2 er frekvensen af plasmidbærende celler efter henholdsvis g_1 og g_2 generationer, og LF er tabsfrekvensen pr. celle pr. generation. Heraf følger, at

$$\nu_1/\nu_2 = (1 - LF)^{g_1 - g_2}$$

og

$$30 \quad LF = 1 - (\nu_1/\nu_2)^{(1/(g_1 - g_2))}$$

Ved at anvende denne formel undgås fejl som følge af fluktuationer i antallet af podende celler på tidspunktet 0. En mere hensigtsmæssig opskrivning af denne formel er

$$LF = \ln(\nu_1/\nu_2)/(g_2-g_1)$$

5 Inkompatibilitetstest

Der blev screenet for plasmider, som formodedes at bære et indsat *par*-område ved at udnytte den iagttagelse, at to i øvrigt kompatible replikons, der bærer *samme par*-område, er inkompatible med hinanden, hvilket medfører tab af ét af de to plasmider i fraværelse af selektionstryk. Testen udføres ved at transformere det plasmid, som skal testes, til en bakteriestamme, der bærer et andet plasmid, idet der udvælges for begge plasmider på dobbeltselektive plader. Efter udstrykning på en dobbeltselektiv plade (en plade indeholdende to forskellige antibiotika) blev inkompatibiliteten målt enten kvalitativt eller kvantitativt.

Til den kvalitative inkompatibilitetstest blev en koloni fra den dobbeltselektive plade udstrøget på en LA-plade til dannelse af enkeltkolonier. Omkring 10 kolonier fra denne plade blev resuspenderet i 1 ml 0,9% NaCl og fortyndet til henholdsvis 10^{-4} og 10^{-5} . 0,1 ml af 10^{-4} - og 10^{-5} -fortyndingerne blev udstrøget på LA-plader. Fra disse plader blev 50 kolonier (eller 200 kolonier, hvis der forventedes en svag inkompatibilitet) testet på de hensigtsmæssige selektive plader. Hvis et Lac⁺-plasmid blev indbefattet i testen, blev der anvendt McConkey-lactoseindikatorplader i stedet for replikaudstrykning på selektive plader. I tilfælde af Lac⁺-plasmider blev screeningen således udført ved at transformere formodede Par⁺-plasmider til en stamme, som allerede indeholdt et Par⁺-hybridplasmid, der medierede en Lac⁺-fænotype. Plasmidinkompatibilitet og således bevis for en specifik Par⁺-fænotype hos det indkommende plasmid detekteres let ved at screene for Lac⁻-kolonier på McConkey-plader, hvilket viser, at det Par⁺-plasmid, som først fandtes i cellen, var blevet destabiliseret. Et eksempel på denne screeningsprocedure er beskrevet i eksempel 4.

Kvantitative inkompatibilitetsmålinger blev udført ved at måle tabsfrekvenserne af Lac⁺-plasmider efter at have etableret heteroplasmidpopulationer som beskrevet ovenfor. LF-værdierne blev målt som beskrevet i afsnittet "Fordelingstest III".

5 Genetiske teknikker

Transformation af bakterier blev udført i henhold til Cohen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 1972, s. 2110-2114, med den modifikation, at når der forventedes en lav transformationsfrekvens, blev behandlingen af de kompetente celler med DNA på is forlænget i flere timer, og cellerne blev efter varmekshok igen afkølet på is i 5-30 minutter. Denne behandling forøgede signifikant transformationsfrekvensen.

Infektion med bacteriophag λ blev udført ved at dyrke 10 ml's kulturer natten over i LB-medium beriget med 0,2% maltose (for at inducere *malB*-proteinet, som er λ -receptoren) under rystning. Cellerne blev vasket med 0,9% NaCl og resuspenderet i 2 ml 0,01 M magnesiumsulfat og inkuberet i 1 time. Fortyndinger af λ -suspensionen (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) blev fremstillet, og 0,1 ml af phagfortyndingen blev anvendt til at inficere 0,2 ml af suspensionen af sultede celler. 10^0 -, 10^{-1} - og 10^{-2} -fortyndingerne af infektionsblandingerne blev udstrøget på selektive plader.

Til transponering af plasmider med Tn5 (Km^R), hvis kilde var phagen λ b221::Tn5, hvis fastgørelsessted var blevet slettet, således at den var ude af stand til at lysogenisere, blev der anvendt en suspension af phagen til at inficere celler, som indeholdt det plasmid, til hvilket transpositionen var ønsket. Infektionen blev udført som ovenfor beskrevet, og kanamycinresistente celler blev udvalgt. Flere tusinde kanamycinresistente kolonier blev samlet, og 0,1 ml af en 10^{-2} -fortynding deraf blev anvendt til at inokulere 100 ml LB-medium. Kulturen blev dyrket natten over, og plasmid DNA blev fremstillet ud fra denne blanding af celler og anvendt til at transformere *E. coli* K12 stamme CSH50 til kanamycinresistens.

Tabel 2

Plasmider og phager

	Plasmid/phag	Kilde
5		
	pKN184	Nordström et al., <i>Plasmid</i> 4, 1980, s. 322.
	pSF2124	So et al., <i>Mol. Gen. Genet.</i> 142, 1975, s. 239-249.
	pJL99	Light & Molin, <i>Mol. Gen. Genet.</i> 184, 1981, s. 56-61.
10	pGA46	An & Friesen, <i>J. Bact.</i> 140, 1979, s. 400-407.
	pKN501	Molin et al., <i>J. Bact.</i> 138, 1979, s. 70-79.
	pF1403-11	Konstrueret ved at indsætte <i>AluI</i> - <i>NaeI</i> -fragmentet fra det basale replikon af plasmid F i <i>SmaI</i> -stedet på pMC1403 (Casadaban et al., <i>J. Bact.</i> 143, 1980, s. 971), hvorved der dannedes en fusion mellem E-genet fra plasmid F og <i>lacZ</i> -genet fra pMC1403.
15		
	pHP34	Prentki et al., <i>Gene</i> 17, 1982, s. 189-196.
20	pMC903	Casadaban et al., <i>J. Bact.</i> 143, 1980, s. 971.
	pKN1562	Molin et al., <i>J. Bact.</i> 138, 1979, s. 70-79.
	pVH1424	Konstrueret af P. Valentin-Hansen ved at indsætte et <i>Sau3A</i> -fragment bærende deo-promotoren fra plasmid pVH17 (Valentin-Hansen et al., <i>EMBO J.</i> , 1982, s. 317) i <i>BamHI</i> -stedet på plasmid pMC1403 (Casadaban et al., <i>op. cit.</i> , s. 971).
25		
	pSKS104	Konstrueret af M. Casadaban ved at indsætte et <i>PvuII</i> -fragment indeholdende <i>lac</i> -promotoren og translationsindledningsområdet fra pM13mp7 (Messing et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> 9, 1981, s. 309) i <i>SmaI</i> -stedet på pMC1403 efterfulgt af homolog rekombination mellem <i>lacZ</i> -segmenterne.
30		
	pBR322	Bolivar et al., <i>Gene</i> 2, 1977, s. 95.
	pMB1	Betlach et al., <i>Fed. Proc.</i> 35, 1976, s. 2037-2043.
35		
	λ b221::Tn5	D.E. Berg, "Insertion and excision of the transposable kanamycin resistance determinant Tn5", i

DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes,
(red. A.I. Bukhari et al.).

ED λ 4 Dempsey og Willetts, *J. Bact.* 126, 1976, s. 166.

5 EKSEMPEL 1

Indsætning af Tn5 (Km^R) i EcoR1-A-fragmentet fra R1

Celler af *E. coli* K-12 stamme CSH50 indeholdende plasmid pKN184, et plasmid, som består af plasmid pSF2124 og det 19 kb lange EcoR1-A-fragment (bærende *parA*- og *parB*-områderne) fra plasmid R1 (Nordström
10 et al., *Plasmid* 4, 1980, s. 322), blev inficeret som beskrevet i MATERIALER OG METODER med en suspension af bacteriophag λ b211::Tn5. Efter udvælgelse for kanamycinresistens på LA-plader indeholdende 200 μ g/ml kanamycin blev kolonierne indsamlet og blandet. 0,1 ml af en 10⁻²-fortynding deraf blev anvendt til at pøde 100 ml LB-medium.
15 Kulturen blev dyrket natten over, og plasmid DNA fremstillet fra kulturen blev anvendt til at transformere *E. coli* K-12 stamme CSH50, idet der blev udvalgt for kanamycinresistens på plader, som indeholdt 200 μ g/ml kanamycin.

Herved fandtes et plasmid, pOU1, som medierer resistens over for
20 kanamycin og har en indsætning af phag DNA svarende til ca. 5 kb (5000 basepar). Plasmidet havde en molekylvægt/størrelse på 34 kb, som blev målt ved at fremstille plasmid DNA og analysere på agarosegeler, og følgende fænotype: Km^R, Ap^R, ParA+, ParB+.

Plasmid DNA blev fremstillet ud fra pOU1, og plasmidet blev kortlagt
25 med restriktionsenzymmer ved at rense plasmid DNA'et, spalte det med ét eller flere restriktionsenzymmer og analysere de resulterende fragmenter ved hjælp af agarosegelelektroforese (jfr. fig. 1). Herved blev λ ::Tn5-fragmentet indsat i EcoR1-A-fragmentet fra pKN184 identificeret som bærende genet kodende for kanamycinresistens, og placenteringen af fragmentet blev bestemt som vist i fig. 1. Plasmid pOU1
30 blev anvendt til yderligere analyse og plasmidkonstruktioner.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU1 er deponeret i Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Grisebachstrasse 8, D-3400 Göttingen, der i det følgende er forkortet til DSM, under deponeringsnummeret 2712.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

5 EKSEMPEL 2

Konstruktion af et plasmid, som egner sig til kloning af *par+*-fragmenter

Plasmid pJL99 (Light & Molin, *Mol. Gen. Genet.* 184, 1981, s. 56-61) bærer en fusion mellem *repA*-genet fra plasmid R1 og *lac*-operonet; 10 plasmidet medierer en Lac⁺-fænotype. *Pst*I-SalI-fragmentet, som bærer *repA-lac*-fusionen, blev udskåret fra pJL99 og indsat i pGA46, som er et p15-replikon (An & Friesen, *J. Bact.* 140, 1979, s. 400-407) til dannelsen af plasmidet pJL124. Et kort over dette plasmid er vist i fig. 2. Plasmid pJL124 medierer også en Lac⁺-fænotype på McConkey- 15 lactoseindikatorplader, men det viste sig, at indsatning af DNA-fragmenter med ringe eller ingen promotoraktivitet i *Pst*I-stedet på pJL124 interfererer med *repA*-promotorens aktivitet på en sådan måde, at disse hybrider ikke længere viser sig som Lac⁺ på McConkey-lactoseindikatorplader. På de mere følsomme X-gal-indikatorplader er 20 transformerende kolonier imidlertid Lac⁺, hvilket viser, at udtryk-kelse af β -galactosidase er nedsat, men ikke fuldstændigt undertrykt i hybriderne. pJL124 kan derfor anvendes til at klonе *Pst*I-fragmenter, eftersom hybridplasmider let detekteres på McConkey-lactoseindikatorplader som Lac⁻-transformanter. Eftersom pJL124 er et p15- 25 replikon og således ustabilt, hvilket let detekteres, da celler, hvorfra plasmidet er gået tabt, danner farveløse kolonier på lactoseindikatorplader uden selektionstryk, kan der endvidere på X-gal-plader screenes for *Pst*I-fragmenter, som er i stand til at stabilisere pJL124.

Programmet for isolering af *Pst*I-*par*⁺-fragmenter består således af følgende trin:

- 1) Ligation af pJL124, kløvet med *Pst*I og *Pst*I-fragmenter fra et andet plasmid.
 - 5 2) Transformation til CSH50 med udstrygning på McConkey-lactose-plader indeholdende chloramphenicol.
 - 3) Testning af kloner, der viser sig som Lac⁻ på McConkey-lactoseplader, for stabil nedarvning af Lac⁺-fænotypen på X-gal-indikatorplader (jfr. MATERIALER OG METODER).
- 10 Stammen *E. coli* CSH50/pJL124 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2760.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 3

Stabilisering af ustabile plasmider med *parA*- og *parB*-områderne

15 1. Mini-R1 replikon

- Plasmid pOU71 (DSM deponeringsnummer 2471), som er et runaway-replikationsderivat af plasmid pKN1562, som omfatter plasmid R1's basale replikon, λ P_R-promotoren og *ci*₈₅₇-repressorgenet fra phag ED λ 4, genet kodende for β -lactamase fra Tn3-transposonen og et unikt *Eco*R1-sted
- 20 (en detaljeret beskrivelse af konstruktionen af pOU71 findes i nærværende ansøgers samtidigt indleverede ansøgning med benævnelsen "Plasmider med betinget ukontrolleret replikationsopførsel", der er indleveret samme dag som nærværende ansøgning), blev kløvet med *Eco*R1, og *Eco*R1-A::Tn5-fragmentet fra pOU1 (jfr. eksempel 1) blev indsat
- 25 efterfulgt af ligation og transformation af *E. coli* stamme CSH50, idet kanamycinresistente celler blev udvalgt på LA-plader, som indeholdt 50 μ g/ml kanamycin.

Transformanterne blev screenet for pOU71's runaway-replikationsfænotype ved udstrygning på LA-plader indeholdende 50 μ g/ml kanamycin

og inkubation ved 42°C. Celler, som indeholder runaway-replikations-plasmider, ophører til sidst med at vokse under disse betingelser. Herved blev plasmid pOU71-184 identificeret, hvilket plasmid havde en størrelse på 25,5 kb og følgende fænotype: ParA+, ParB+, Ap^R, Km^R.

- 5 Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 3). Det fremgår af restriktionskortet, at EcoRI-A::Tn5-fragmentet er blevet indsat korrekt i EcoRI-stedet på pOU71.

Celler, som indeholdt plasmidet, blev dyrket på LA-plader i 100 generationer uden selektionstryk, dvs. uden at blive dyrket på plader indeholdende et antibiotikum; ved bestemmelse i henhold til den i MATERIALER OG METODER beskrevne procedure (fordelingstest II) iagttoges det ikke, at cellerne mister plasmidet, hvorimod pOU71 gik tabt fra celler, som blev dyrket under tilsvarende betingelser, med en frekvens på 1% pr. generation. Det blev således bestemt, at pOU71-184
15 nedarves stabilt med en tabsfrekvens på ca. 10⁻⁶/celle/generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU71-184 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2763.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

2. p15-replikon

- 20 Plasmid pJL124 (jfr. eksempel 2), som er et Par⁻ p15-replikon, blev spaltet med restriktionsenzymet PstI og blandet med plasmid pKN184 (jfr. eksempel 1), som var blevet delvis kløvet med PstI, efterfulgt af ligation. Ligationsblandingen blev transformeret til *E. coli* stamme CSH50, idet der blev udvalgt for chloramphenicolresistens på
25 McConkey-lactoseindikatorplader indeholdende 50 µg/ml chloramphenicol.

Cellerne indeholdende pJL124, som bar ét eller flere PstI-fragmenter (jfr. eksempel 2), blev testet for stabil nedarvning af Lac⁺-fænotypen på X-gal-plader. Et af de stabilt nedarvede plasmider viste sig
30 at indeholde både *parA*- og *parB*-området. Dette plasmid, pOU2, har en størrelse på 24 kb og følgende fænotype: Cm^R, Lac⁺, ParA+, ParB+.

Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 4). Det fremgår af restriktionskortet, at et *Pst*I-fragment er blevet slettet fra *Eco*R1-A-fragmentet.

5 Cellerne indeholdende plasmidet blev dyrket på X-gal-plader i 100 generationer uden selektionstryk, og det blev bestemt, at pOU2 nedarves stabilt med en LF-værdi på mindre end 10^{-6} /celle/generation i mod-sætning til pJL124, som gik tabt fra cellerne med en frekvens på 0,5-1%/celle/generation.

10 Stammen *E. coli* CSH50/pOU2 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2713.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

3. pMB1-replikon

15 Plasmid pF1403-11 (jfr. tabel 2) er et ustabilt nedarvet derivat af pBR322 (et pMB1-replikon), som bærer en fusion mellem et gen fra plasmid F og *lac*-operonet. Plasmidet medierer en Ap^R , *Lac*⁺-fænotype. *Eco*R1-A::Tn5-fragmentet fra plasmid pOU1 (eksempel 1) blev indsat i det unikke *Eco*R1-sted på plasmid pF1403-11 umiddelbart oven for genfusionen efterfulgt af ligation og transformation til *E. coli* stamme CSH50, idet der blev udvalgt for Ap^R på plader, som indeholdt 20 50 µg/ml ampicillin, Km^R på plader indeholdende 50 µg/ml kanamycin og *Lac*⁺ på McConkey-lactoseindikatorplader.

Det resulterende plasmid pOU10 blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 5), og indsætningen af *Eco*R1-A::Tn5-fragmentet blev verificeret. Plasmidet har en størrelse på 25 34 kb og følgende fænotype: Km^R , Ap^R , *Lac*⁺, *ParA*⁺, *ParB*⁺.

Plasmidet blev testet for stabil nedarvning som beskrevet i eksempel 3.1. Det blev således påvist, at pOU10 nedarves stabilt med en LF-værdi på mindre end 10^{-6} /celle/generation, hvorimod pF1403-11 gik tabt fra cellerne med en frekvens på 6×10^{-3} pr. generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU10 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2714.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 4

- 5 Kloning af *Pst*I-fragmenter fra *Eco*R1-A-fragmentet, som stabiliserer pJL124

*Eco*R1-A-fragmentet blev kløvet med et antal restriktionsenzymmer, og det resulterende fysiske kort er vist i fig. 1. Det fremgår af denne figur, at fragmentet består af mange *Pst*I-fragmenter. For at reducere
10 størrelsen af det fragment, der medierer Par⁺-fænotypen, forsøgte man at subklone *par*-områder, der eventuelt blev båret på ét eller flere af *Pst*I-fragmenterne, i screeningsvektoren pJL124 (jfr. eksempel 2). Analyse af flere kloner med den korrekte fænotype - Lac⁻ på McConkey-lactoseplader og stabil nedarvning i fraværelse af selektionstryk -
15 viste, at *Pst*I-D-fragmentet (jfr. fig. 1) medierede denne fænotype. Intet andet enkelt *Pst*I-fragment var i stand til at stabilisere pJL124. Det område, der var ansvarligt for stabilisering af pJL124, og som var placeret inde i det 1,8 kb lange *Pst*I-fragment, blev betegnet *parB*.

- 20 For at analysere *Pst*I-D-fragmentet yderligere, blev fragmentet klonet i det unikke *Pst*I-sted i *bla*-genet på pBR322, hvorved dannedes pOU93 (jfr. fig. 7; plasmidet er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2724). Restriktionskortlægning af dette plasmid viste, at *Pst*I-D-fragmentet indeholder tre *Rsa*I-steder (jfr. fig. 6). *Rsa*I danner
25 stumpe ender, og det 900 bp lange *Rsa*I-fragment blev derfor indsat i *Sma*I-stedet på plasmid pHP34 (Prentki et al., *Gene* 17, 1982, s. 189-196) på følgende måde. pOU93 blev kløvet med *Rsa*I og blandet med pHP34, der var blevet kløvet med *Sma*I, efterfulgt af ligation. Ligationblandingen blev transformeret til *E. coli* stamme CSH50, som
30 allerede indeholdt plasmid pOU94 (et p15-derivat, som fænotypisk er Lac⁺ og ParB⁺; jfr. fig. 8; plasmidet er deponeret i DSM under depo-

neringsnummeret 2725), idet der blev udvalgt for ampicillinresistens på plader indeholdende 50 µg/ml ampicillin.

Som følge af den inkompatibilitet, som udtrykkes af *parB*⁺-områder, som bæres på forskellige plasmider, går pOU94 tabt, når et andet
 5 plasmid, som fænotypisk er *ParB*⁺, indføres i *E. coli*-cellerne, hvorved det er muligt at udvalge for korrekte indsætninger og transformanter ved at stryge cellerne ud på McConkey-plader og screene for farveløse kolonier (Lac⁻). Et sådant inkompatibelt plasmid pHP34-
 10 fik betegnelsen pOU13. Plasmidet har en størrelse på 5,3 kb og følgende fænotype: Tc^R, Ap^R, *ParB*⁺.

Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 9). Kortlægningen viste, at *RsaI*-fragmentet var blevet omdannet til et 900 bp langt *EcoRI*-fragment, idet *SmaI*-stedet
 15 på pHP34 er flankeret af to *EcoRI*-steder.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU13 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2716.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

Det 900 bp lange *EcoRI*-fragment fra pOU13 blev indsat i *EcoRI*-stedet
 20 på pOU101, som er et Ap^R, Cm^R runaway mini-R1-derivat (en detaljeret beskrivelse af konstruktionen af pOU101 findes i nærværende ansøgers samtidigt indleverede ansøgning med titlen "Plasmider med betinget ukontrolleret replikationsopførsel", der er indleveret samme dag som
 25 nærværende ansøgning), med et unikt *EcoRI*-sted i *cat*-genet (genet, der koder for Cm^R), til dannelselse af plasmid pOU14, som har en størrelse på 8,2 kb og følgende fænotype: Cm^S, Ap^R, *ParB*⁺.

Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 10).

Plasmidet blev testet for stabil ned arvning som beskrevet i eksempel
 30 3.1. Det blev således påvist, at ved 30°C nedarves pOU14 stabilt med

en LF-værdi på mindre end 1×10^{-4} /celle/generation, hvorimod pOU101 går tabt fra cellerne med en frekvens på 1% pr. generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU14 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2717.

- 5 Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 5

Stabilisering af mini-R1 plasmider med *parB*-fragmentet

- Plasmid pOU90, som er et runaway-replikationsderivat af pKN1562, som omfatter plasmid R1's basale replikon, λP_R -promotoren og cI_{857}^- repressoren fra phag ED λ 4, genet kodende for β -lactamase fra Tn3-transposonen og *EcoR*I-A-fragmentet fra pKN184 (en detaljeret beskrivelse af konstruktionen af pOU90 findes i nærværende ansøgers samtidigt indleverede ansøgning med benævnelsen "Plasmider med betinget ukontrolleret replikationsopførsel", der er indleveret samme dag som
- 10 nærværende ansøgning), i hvilket derivat *EcoR*I-A-fragmentet fra pKN184 er blevet indsat, blev kløvet med *Sal*I og liggeret til dannelsen af plasmid pOU61. Plasmidet blev transformeret til *E. coli* stamme CSH50, idet der blev udvalgt for Lac^- fænotype på McConkey-plader.
- 15 pOU61 blev kortlagt med restriktionsenzymer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 11). Af restriktionskortet fremgår det, at pOU61 bærer den 3,6 kb lange højre ende af *EcoR*I-A-fragmentet indeholdende *parB*-området. Plasmidet har en størrelse på 10 kb og følgende fænotype: $ParB^+$, Ap^R , Lac^- . Plasmidet blev testet for stabil nedarvning som
- 25 beskrevet i eksempel 3.1. Det blev således påvist, at pOU61 nedarves stabilt med en LF-værdi på mindre end 1×10^{-4} /celle/generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU61 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2723.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 6

Stabilisering af plasmid pF1403-11 med *parB*-fragmentet

Plasmid pOU1 (jfr. eksempel 1) blev kløvet med *Sall* og blandet med plasmid pF1403-11, som også var blevet kløvet med *Sall* efterfulgt af
 5 ligation og transformation til *E. coli* stamme CSH50, idet der blev udvalgt for ampicillinresistente kolonier på McConkey-lactoseindikatorplader. Nogle af disse Lac⁺-kloner blev screenet for stabil ned-arvning af Lac⁺-fænotypen på McConkey-plader som beskrevet i MATERIA-
 LER OG METODER.

10 De stabilt nedarvede plasmider blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 12). Det fremgår af restriktionskortet, at de bærer *Sall*-fragmentet fra pOU1, hvorpå *parB*-området er placeret. Plasmidet bestående af pF1403-11 og *Sall*-fragmentet fra pOU1 fik betegnelsen pOU12. Det havde en størrelse på 16 kb og
 15 følgende fænotype: ParB⁺, Lac⁺, Ap^R. pOU12 blev nedarvet stabilt med en LF-værdi på mindre end 5×10^{-5} /celle/generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU12 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2715.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

20 EKSEMPEL 7

Stabilisering af p15-plasmider med *parA*-fragmentet

Plasmid pMC903 (Casadaban et al., *J. Bact.* 143, 1980, s. 971) blev kløvet med *EcoR*1, og *EcoR*1-fragmentet fra plasmid pOU43 (jfr. fig. 13; DSM deponeringsnummer 2720) bærende *parA*-området blev indsat
 25 efterfulgt af ligation og transformation til *E. coli* stamme CSH50. Det resulterende plasmid fik betegnelsen pOU45 og havde en størrelse på 13,4 kb og følgende fænotype: ParA⁺, Lac⁻, Ap^R, Km^R.

Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymmer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 14). Af restriktionskortet fremgår det, at *parA*-området er blevet indsat i *lac*-operonet, som derved inaktiveres.

- Da plasmidet blev testet for stabilitet som beskrevet i MATERIALER OG
 5 METODER, viste det sig, at det blev nedarvet stabilt med en LF-værdi på 8×10^{-4} /celle/generation, hvorimod pMC903 har en LF-værdi på 1%/celle/generation.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU45 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2721.

- 10 Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 8

Stabilisering af mini-R1 plasmider med *parA*-området

- EcoR*I-fragmentet fra pOU43 blev indsat i et mini-R1 plasmid, pOU82 (DSM deponeringsnummer 2482), der omfatter plasmid R1's basale replikon, λP_R -promotoren og *cI*-repressorgenet fra phag ED λ 4, genet, som
 15 koder for β -lactamase, fra Tn3-transposonen, *deo*-promotoren og den aminoterminalende af *lacZ*-genet fra pVH1424, og resten af *lac*-operonet fra pSKS104 (en detaljeret beskrivelse af konstruktionen af pOU82 findes i nærværende ansøgers samtidigt indleverede ansøgning
 20 med benævnelsen "Plasmider med betinget ukontrolleret replikationsopførsel", som er indleveret samme dag som nærværende ansøgning). Plasmid pOU82 medierer Ap^R og Lac⁺-fænotyperne og har et unikt *EcoR*I-sted, som er anvendeligt til kloning af *EcoR*I-fragmenter. Dette plasmid går tabt med en frekvens på 1% pr. generation i fraværelse af
 25 selektionstryk.

Et plasmid, i hvilket det 2,4 kb lange *EcoR*I-fragment var blevet indsat i én orientering, fik betegnelsen pOU47. Plasmidet havde en størrelse på 14 kb og følgende fænotype: ParA⁺, Lac⁺, Ap^R.

pOU47 blev kortlagt med restriktionszymer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 15).

Stammen *E. coli* CSH50/pOU47 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2722.

- 5 Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

- Eco*R1-fragmentet, der bar *parA*-området, blev yderligere reduceret med 400 bp ved hjælp af exonukleasen *Bal*31; sletningsproceduren blev udført som beskrevet i MATERIALER OG METODER under anvendelse af det unikke *Bam*HI-sted på pOU47. Det konstruerede plasmid fik betegnelsen
- 10 pOU472. Plasmidet havde en størrelse på 13 kb og følgende fænotype: *ParA*+, *Lac*+, *Ap*^R.

pOU472 blev kortlagt med restriktionszymer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 16). Det fremgår af restriktionskortet, at pOU472 bærer det 2,0 kb lange *Eco*R1-fragment, som genereres ved *Bal*31-sletningen.

- 15 Da plasmidet blev testet for stabilitet som beskrevet i MATERIALER OG METODER, viste det sig at blive nedarvet stabilt, hvilket betyder, at hele *parA*-området er indeholdt i det 2,0 kb lange *Eco*R1-fragment.

Stammen *E. coli* CSH50/pOU472 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2726.

- 20 Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 9

Konstruktion af et mini-R1 plasmid bærende *parA*-området

- Plasmid pOU90 (jfr. eksempel 5) blev spaltet med *Bam*HI og delvis med *Sau*3A for at slette en del af *Eco*R1-A-fragmentet, idet de 6 kb, der
- 25 sidder yderst til venstre, blev bevaret, efterfulgt af ligation. Det resulterende plasmid pOU91 blev transformeret til *E. coli* stamme CSH50. pOU91 har en størrelse på 18,75 kb og følgende fænotype: *Par*+,

Ap^R, Lac+. Plasmidet blev kortlagt med restriktionsenzymer som beskrevet i eksempel 1 (jfr. fig. 17).

Plasmidstabilitet blev bestemt ved at dyrke celler, som indeholdt pOU91 (og som kontrol celler, der indeholdt pOU82), på McConkey-plader uden selektionstryk ved 30°C i 25 generationer; de celler, som var transformeret med pOU91, dannede røde kolonier (Lac+), hvorimod celler, der var transformeret med pOU82, dannede både røde og hvide kolonier, hvilket viste, at pOU82 under den selektionsfri periode var gået tabt fra nogle af cellerne.

10 Stammen *E. coli* CSH/pOU91 er deponeret i DSM under deponeringsnummeret 2483.

Deponeringen er foretaget i overensstemmelse med Budapesttraktaten.

EKSEMPEL 10

Konstruktion af et *parA*+, *parB*+ mini-R1-plasmid

15 Plasmid pOU82 (jfr. eksempel 8) kløves med *EcoR*I, og *EcoR*I-fragmentet fra pOU43 (jfr. eksempel 7 og fig. 13) bærende *parA*-området indsættes. Fra dette *EcoR*I-fragment slettes de 500 bp, som sidder yderst til venstre, herunder ét *EcoR*I-sted, ved hjælp af exonukleasen *Bal*31. I dette plasmids unikke *EcoR*I-sted sættes *EcoR*I-fragmentet fra pOU13
 20 (jfr. eksempel 4 og fig. 9). Det resulterende plasmid, som medierer en *ParA*+, *ParB*+-fænotype, kan derefter transformeres til *E. coli* stamme CSH50, som allerede bærer plasmid pOU94, og screenes for i det væsentlige som beskrevet i eksempel 4 med undtagelse af, at pOU82 derivatet medierer en svag Lac+-fænotype, hvilket betyder, at kolonier af celler, som indeholder dette plasmid, kun vil være røde i
 25 centrum og farveløse i kanten, når de dyrkes på McConkey-lactose-indikatorplader.

EKSEMPEL 11

Konstruktion af et *parA*⁺, *parB*⁺ mini-R1-plasmid

- Plasmid pOU61 (jfr. eksempel 5) kløves med *EcoR*I, og *EcoR*I-fragmentet fra pOU43 bærende *parA*-området indsættes efterfulgt af ligation. Det resulterende plasmid, som medierer en *ParA*⁺-, *ParB*⁺-fænotype, kan derefter transformeres til *E. coli* stamme CSH50, som allerede bærer plasmid pOU2, og screenes for ved en metode, som svarer til den i eksempel 4 beskrevne metode. Kolonier af celler, som indeholder det ønskede plasmid, optræder som farveløse kolonier (*Lac*⁻) på McConkey-lactoseplader.

(I hele den nærværende beskrivelse og krav betegner udtrykkene *par* og *Par* udtrykkelsen af en fordelingsfunktion, hvor *par*⁻, *Par*⁻, *par*⁺ eller *Par*⁺ ikke specifikt er angivet.)

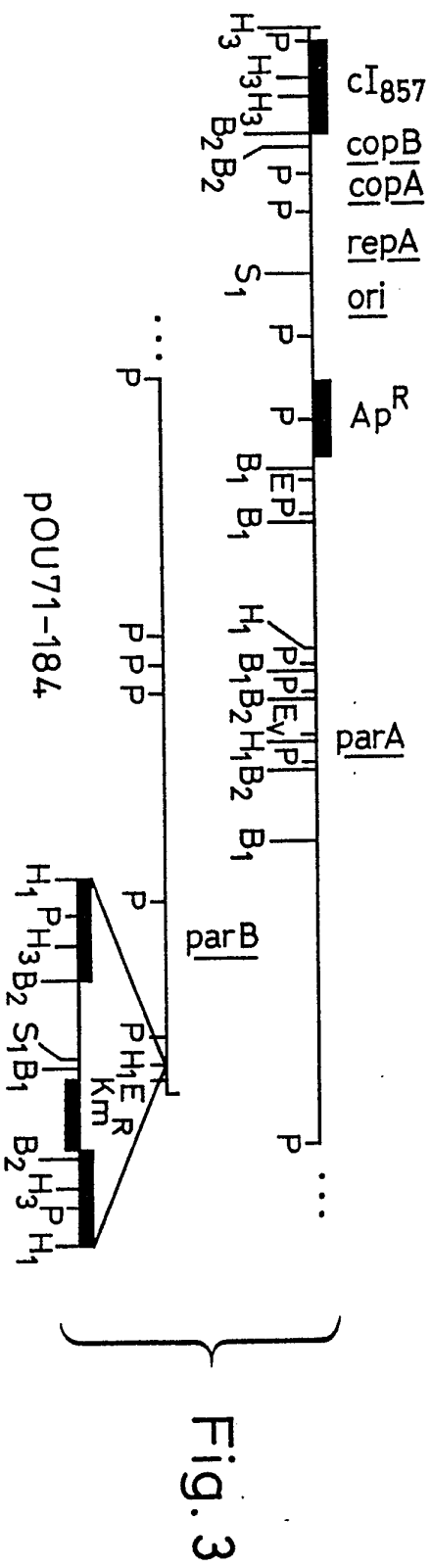
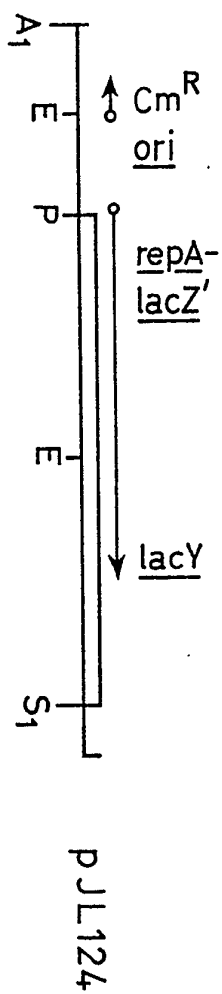
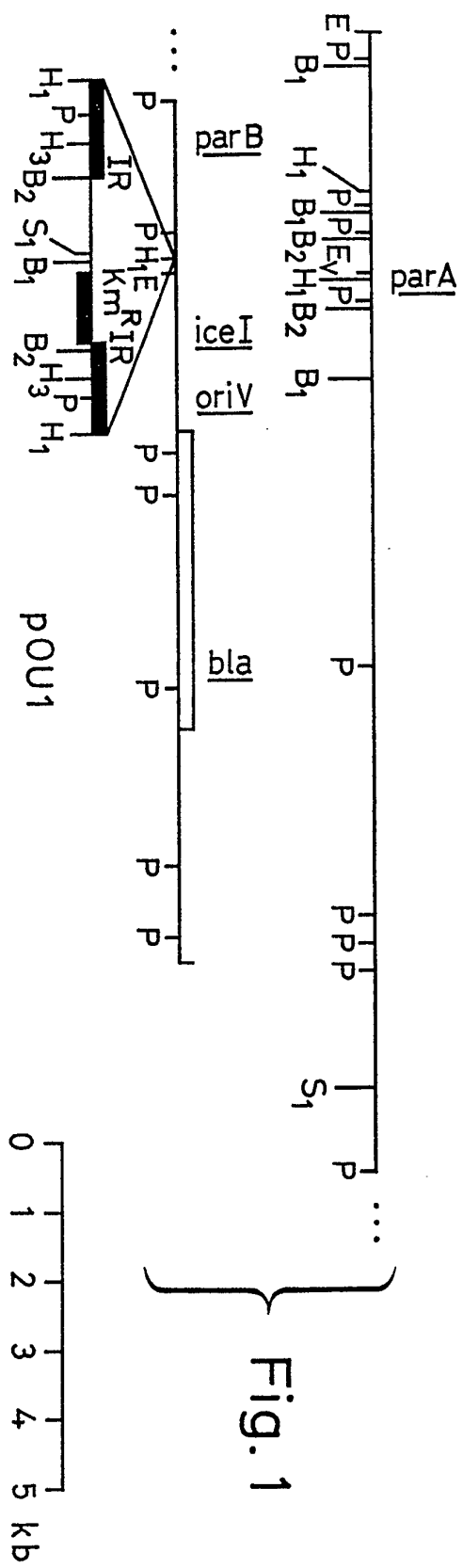
PATENTKRAV

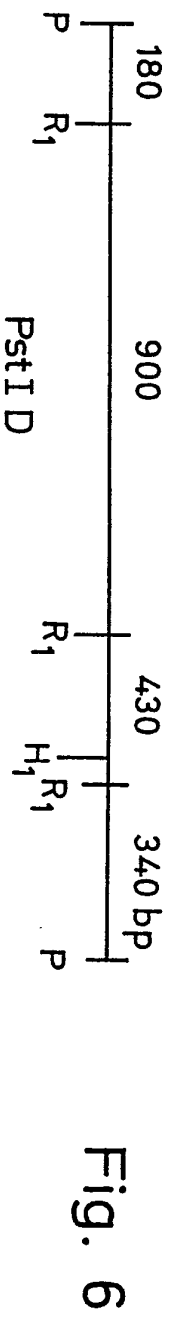
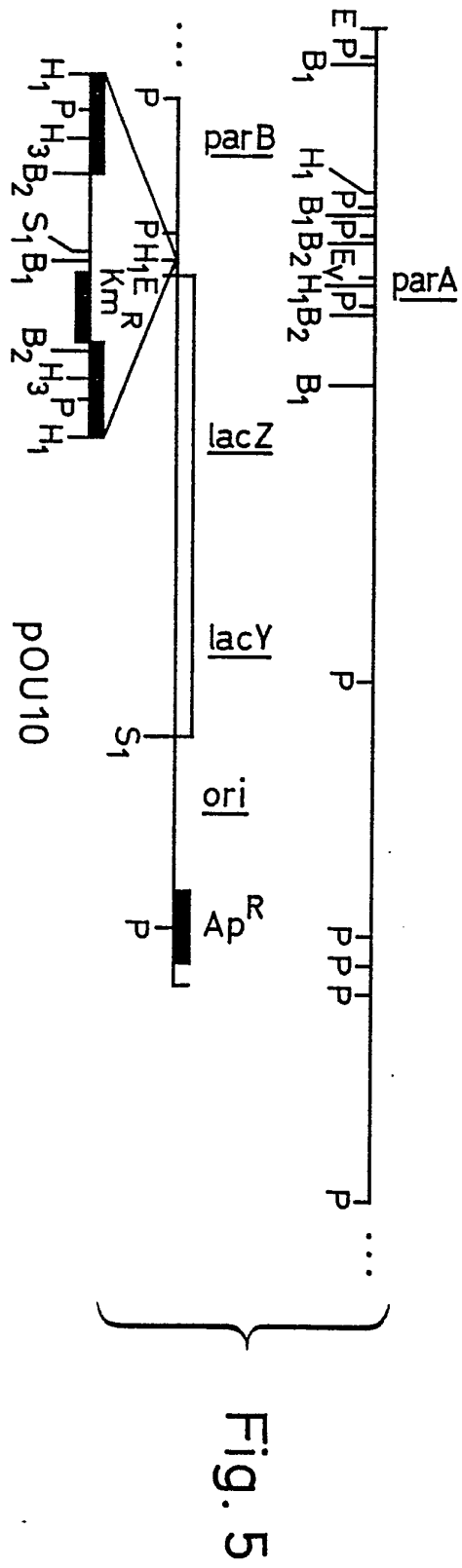
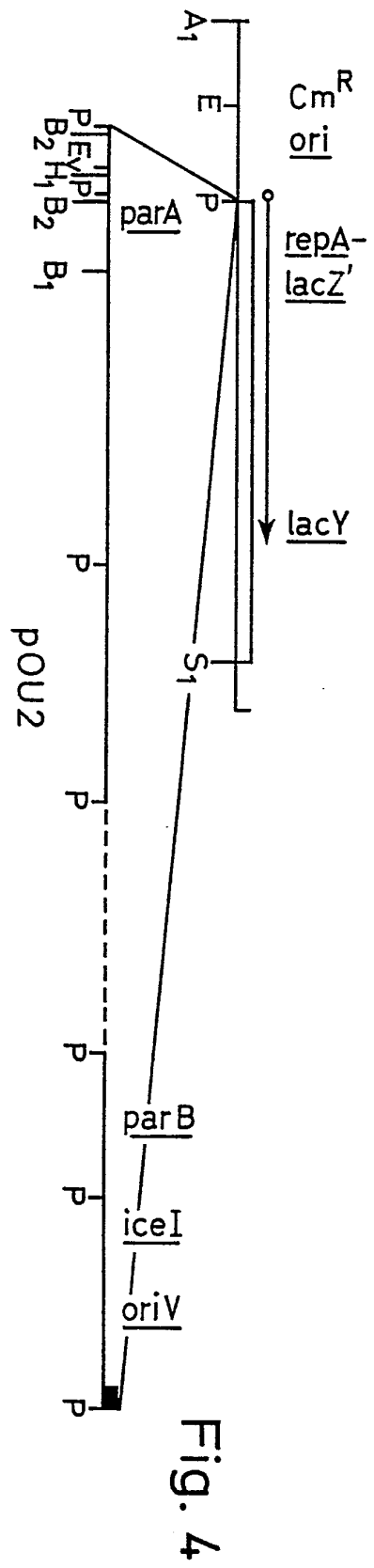
1. Plasmid, der replikerer i gram-negative bakterier,
k e n d e t e g n e t ved, at det bærer et eller flere indsatte gener, som ikke naturligt er forbundet med plasmidet, og som er stabiliseret ved et indsat DNA-fragment, som er kortere end 19 kb, hvilket DNA-fragment omfatter den plasmidstabiliserende DNA-sekvens R1 *par*-område A, den plasmidstabiliserende DNA-sekvens R1 *par*-område B eller både R1 *par*-område A og R1 *par*-område B.
2. Plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det indsatte DNA-fragment omfatter R1 *par* region A og R1 *par* region B og har en længde, der ikke overstiger 6 kb, især ikke 4 kb, navnlig ikke 3 kb.
3. Et plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det indsatte DNA-fragment omfatter R1 *par*-område A og har en længde, der ikke overstiger 4 kb, især ikke 2,5 kb, navnlig ikke 2 kb.

4. Et plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det indsatte DNA-fragment omfatter R1
par-område B og har en længde, der ikke overstiger 2 kb, især ikke
overstiger 1,5 kb, navnlig ikke 1 kb.
- 5 5. Et plasmid ifølge hvilket som helst af kravene 1-4,
k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere omfatter et gen, der
koder for antibiotikaresistens.
6. Et plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det er et p15-plasmid eller et derivat
10 deraf eller et højkopitals-plasmid med et bredt værtsspektrum, eller
et derivat deraf.
7. Et plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det er et pMB1-plasmid eller et deri-
vat deraf, såsom et pBR322plasmid eller et derivat deraf.
- 15 8. Et plasmid ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at det i det mindste i ét trin under
dyrkingen af bakterier, der indeholder plasmidet, har et lavt kopi-
tal.
9. Et plasmid ifølge krav 8,
20 k e n d e t e g n e t ved, at det har et kopital på ca. 0,5-5 kopier
pr. celle.
10. Et plasmid ifølge krav 8 eller 9,
k e n d e t e g n e t ved, at det vælges blandt plasmider af inkom-
patibilitetsgruppen IncFII, herunder R1 og derivater deraf;
25 F og derivater deraf;
og lavkopitalsplasmider med et bredt værtsspektrum og derivater
deraf.
11. Et plasmid ifølge krav 8 eller 9,
k e n d e t e g n e t ved, at det er et betinget runaway-replika-
30 tionsplasmid.

12. Et plasmid ifølge krav 11,
k e n d e t e g n e t ved, at det, når værtsmikroorganismer inde-
holdende plasmidet dyrkes under betingelser, der sikrer et lavt, kon-
stant plasmidkopital, har et kopital, der ikke overstiger ca. 3-5
5 kopier pr. celle, og som, når værtsmikroorganismene dyrkes under
andre betingelser, som sikrer et væsentligt forøget plasmidkopital,
har et kopital i et område, der er mindst ca. 500-1000 kopier pr.
celle.
13. Et plasmid ifølge krav 12,
10 k e n d e t e g n e t ved, at det har et plasmidkopital, der ikke
overstiger ca. 3-5 kopier pr. celle ved én temperatur, og et plasmid-
kopital, der er i området mindst ca. 500-1000 kopier pr. celle ved en
højere temperatur.
14. Plasmid ifølge krav 12 eller 13,
15 k e n d e t e g n e t ved, at plasmidkopitallet, når det ikke
overstiger ca. 3-5 kopier pr. celle, er i området ca. 0,5-1 kopi pr.
celle.
15. Et plasmid ifølge krav 1, 12, 13 eller 14,
20 k e n d e t e g n e t ved, at en regulerbar promoter er indsat oven
for plasmidets native replikationskontrolgen R.
16. Et plasmid ifølge et hvilket som helst af kravene 12-15,
k e n d e t e g n e t ved, at det er et plasmid af R1-type.
17. Gram-negativ bakterie,
25 k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder et plasmid ifølge et
hvilket som helst af de foregående krav.
18. Bakterie ifølge krav 17,
k e n d e t e g n e t ved, at den er *Escherichia coli*.
19. Fremgangsmåde til fremstilling af et genprodukt af plasmid-DNA,
30 k e n d e t e g n e t ved, at bakterier, som indeholder et plasmid
ifølge et hvilket som helst af kravene 1-16, dyrkes, og genproduktet
af plasmidet udvindes fra bakteriekulturen.

20. Fremgangsmåde ifølge krav 19,
k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen udføres i mindst 100
bakteriegenerationer.
21. Fremgangsmåde ifølge krav 20,
5 k e n d e t e g n e t ved, at tabet af plasmidet er mindre end 2×10^{-4} /celle/generation.
22. Fremgangsmåde ifølge krav 21,
k e n d e t e g n e t ved, at tabet af plasmidet er mindre end 10^{-5} /celle/generation.
- 10 23. Fremgangsmåde ifølge krav 22,
k e n d e t e g n e t ved, at tabet af plasmidet er mindre end 5×10^{-6} /celle/generation.
24. DNA-fragment, som er kortere end 19 kb,
k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter R1 *par*-området A, R1
15 *par*-området B eller både R1 *par*-område A og R1 *par*-område B.
25. DNA-fragment ifølge krav 24 omfattende R1 *par*-områderne A og B,
k e n d e t e g n e t ved, at det har en længde, der ikke overstiger
6 kb, især ikke 4 kb, navnlig ikke 3 kb.
26. DNA-fragment ifølge krav 24 omfattende R1 *par*-området A,
20 k e n d e t e g n e t ved, at det har en længde, der ikke overstiger
4 kb, især ikke 2,5 kb, navnlig ikke 2 kb.
27. DNA-fragment ifølge krav 24 omfattende R1 *par*-området B,
k e n d e t e g n e t ved, at det har en længde, der ikke overstiger
2 kb, især ikke 1,5 kb, navnlig ikke 1 kb.





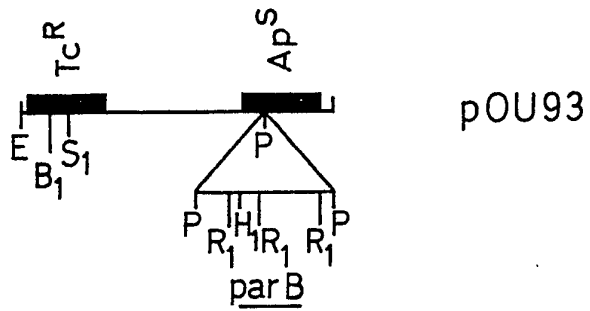


Fig. 7

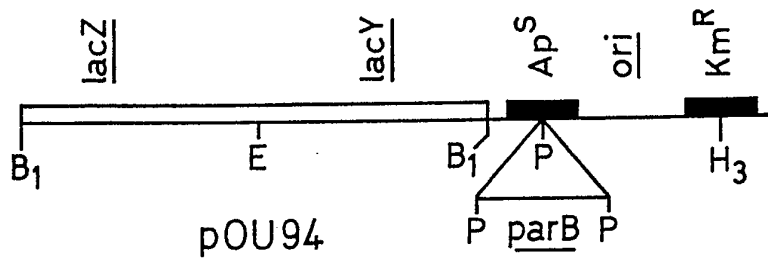


Fig. 8

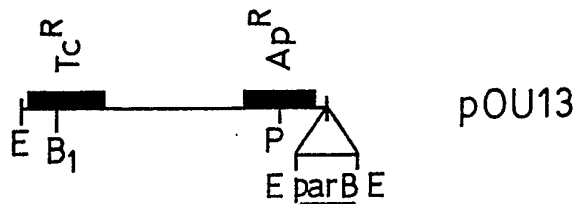


Fig. 9

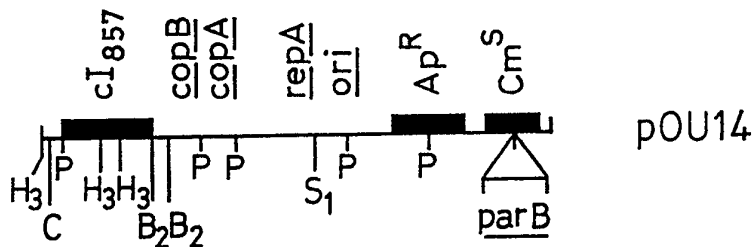


Fig. 10

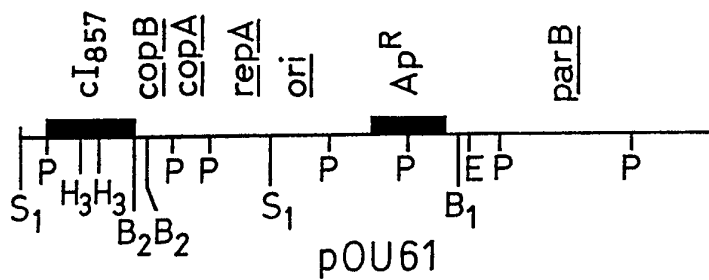


Fig. 11

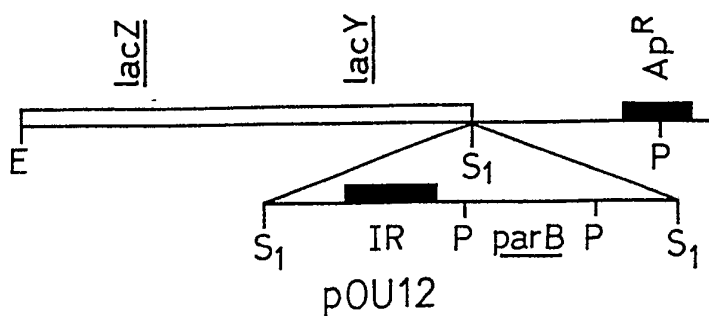


Fig. 12

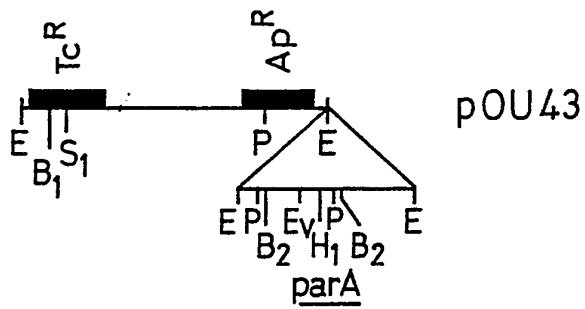


Fig. 13

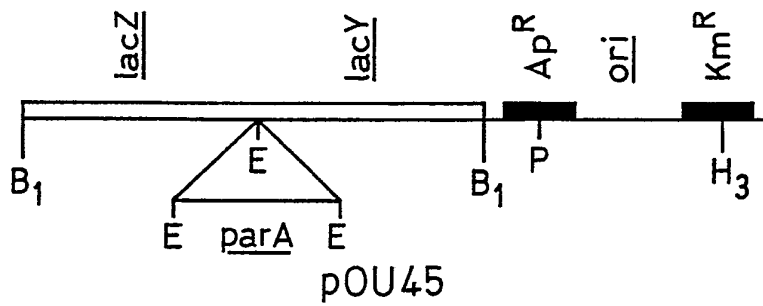


Fig. 14

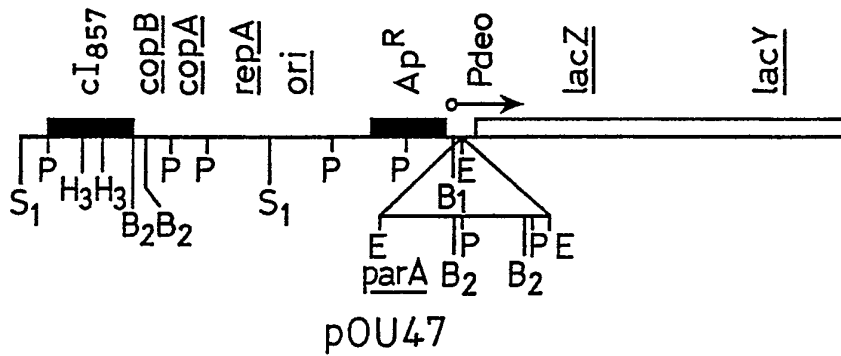


Fig. 15

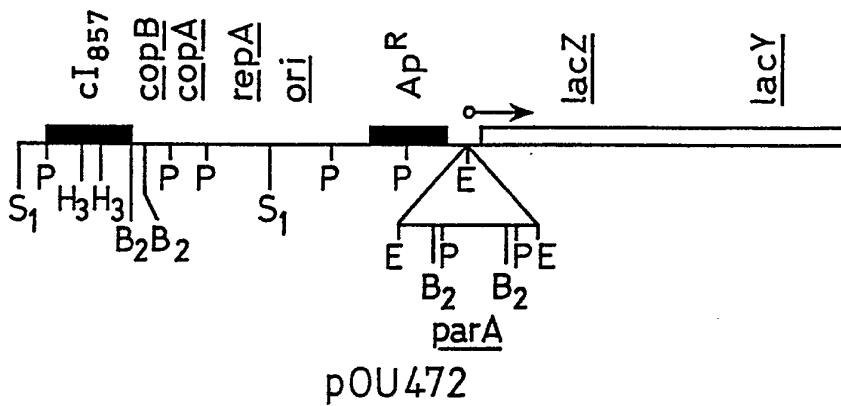


Fig. 16

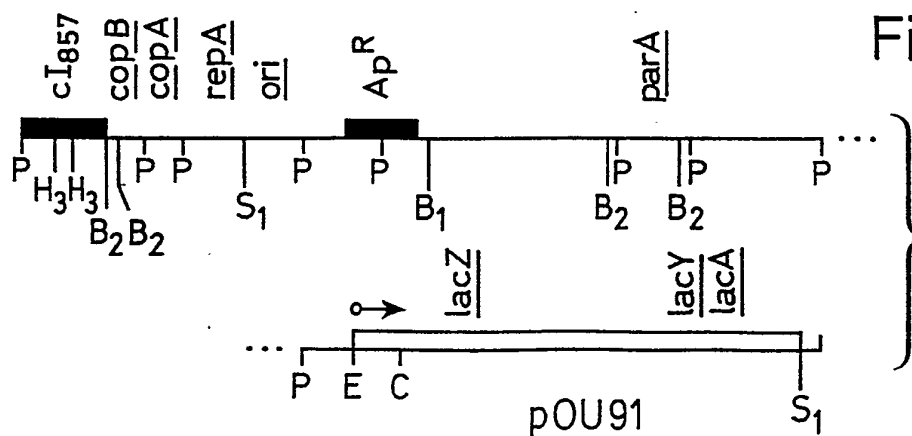


Fig. 17

Fig. 18

