



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/59, 9/64

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	840918
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	07.03.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	07.03.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	10.09.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.07.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
09.03.83 JP 58-38439 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Beppu, Teruhiko, 5-21, Horinouchi-1-chome, Suginami-ku, Tokyo, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Beppu, Teruhiko, 5-21, Horinouchi-1-chome, Suginami-ku, Tokyo, Japan, (JP)
2. Uozumi, Takeshi, 32-8, Takashimadaira-4-chome, Itabashi-ku, Tokyo, Japan, (JP)
3. Nishimori, Katsuhiko, 27-5-303, Hakusan-1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, (JP)
4. Shimizu, Norio, Takayamadanchi 10-10, 2374-24, Okubocho, Hitachi-shi, Japan, (JP)
5. Kawaguchi, Yoshiyuki, 15-11, Kyuden-1-chome, Setagaya-ku, Tokyo, Japan, (JP)
6. Hidaka, Makoto, 16-21, Nishikata-2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Uusia ekspressoointiplasmideja ja niiden käyttö menetelmässä prokymosiinia koodaavan geenin
ekspressoimiseksi E. coli:ssa**
**Nya expressionsplasmider och deras användning i förfarandet för expressering av prokymosin
koderande gen i E. coli**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 73029 (C 12N 15/00), EP A 68691 (C 12N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on parannettuja menetelmiä prokymosiinia koodaavan geenin kopioimiseksi ja ekspressoimiseksi E. coli:ssa. On kehitetty uusia ekspressoointiplasmideja, joissa on prokymosiinia koodaava geeni operatiivisesti liitetty E. coli trp-operoniin. Näitä plasmideja on insertoitu E. coli -isäntäsoluihin transformoimalla, jolloin on saatu E. coli:n uusia kantoja, joilla on suuri ekspressoimiskyky. Keksintö koskee myös menetelmiä tällaisten ekspressoointiplasmidien ja niistä johdettujen E. coli -kantojen valmistamiseksi. Modifioidut solut tuottavat sopivissa viljelyolosuhteissa olennaisen määrän prokymosiinia, jolla aktiivisuuden jälkeen (kymosiinin muodossa) on maidon juoksuusaktiivisuus. Nämä menetelmät ovat käyttökelpoisia prokymosiinin laajassa tuotannossa fermentoimalla ja ovat aikaisempaa tekniikan tasoa parempia.

Uppfinningen avser förbättrade metoder för replikation och expression av prokymosin koderande gen i E. coli. Nya expressionsplasmider med den prokymosin koderande genen operativt fäst vid E. coli trp-operonen har utvecklats. Dessa plasmider har inbörts i E. coli-värdceller genom transformation, att ge nya stammar till E. coli med hög expressionsförmåga. Uppfinningen avser också metoderna för framställning av sådana expressionsplasmider och E. coli-stammar som härletts därifrån. De modifierade cellerna producerar under lämplig odlingsbetingelser en väsentlig mängd av prokymosin vilken efter aktivering (i form av kymosin) uppvisar mjölkklöpnande aktivitet. Metoderna är således användbara vid massiv produktion av prokymosin genom fermentation och är bättre än teknikens ståndpunkt inom området.

Uusia ekspressoointiplasmideja ja niiden käyttö menetelmässä prokymosiinia koodaavan geenin ekspressoimiseksi E. colissa

Keksinnön kohteena on yleisesti geenitekniikka ja
5 erityisesti yhdistelmä-DNA:ta sisältävän prokymosiinia koodaavan geenin tuottaminen sekä tämän hyväksikäyttö mikro-organismien tuottamiseksi prokymosiinin laajaa tuotantoa varten.

Käsitteellä "geenitekniikka" tarkoitetaan in vitro-
10 tekniikkaa, jolla muodostetaan yhdistelmä-DNA, joka sisältää ulkopuolisia geenejä, ja sopiva vektori, valikoidaan DNA halutun geneettisen informaation perusteella ja viedään valikoitu DNA sopivaan isäntä-mikro-organismiin, jolloin vieras geneettinen informaatio tulee isännän täyden geenistön osaksi. Tällä menetelmällä valmistettu geneettisesti
15 manipuloitu mikro-organismi pystyy ekspressoimaan vierasta geeniä soluissaan sopivissa viljelyolosuhteissa ja tuottamaan ainetta (esim. entsyymejä, proteiinia, hormoneja jne), jota tämä geeni koodaa.

20 Entsyyminen proteiini kymosiini tunnetaan myös renniininä. Se on proteolyttinen pääproteiini, jota esiintyy vastasyntyneen märehäijän vasikan mahassa ja aiheuttaa maidon juoksettumisen. Kymosiinia on sen tähden kauan käytetty maitokaseinin koaguloimiseen juustonteossa. Siinä on
25 323 aminohappoa ja sen molekyylipaino on 35 652. On tunnettua, että kymosiinilla on kaksi mahdollista muotoa (A ja B). Nämä kaksi muotoa poikkeavat aminohappo-kodonilla 286 (nukleotidi 857). Kodoni GAT kymosiini A:ssa olisi kodoni GTT kymosiini B:ssä.

30 Prokymosiini (prorenniini) on kymosiinin prekursori, jossa on 42 ylimääräistä aminohappoa kymosiini-molekyylin aminopääteessä ja se muutetaan kymosiiniksi happamissa olosuhteissa hävittämällä ylimääräiset aminohapot. Prokymosiinissa on 365 aminohappoa ja sen molekyylipaino on 40 777.
35 Prorenniinin täydellistä aminohapposekvenssiä ovat selostaneet B. Foltmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74,

231 (1977). Julkaistu sekvenssi osoittautui myöhemmin vääräksi joukolle aminohappopaikkoja. Korjattu sekvenssi on sen tähden annettu kuviossa 1.

Koska vastasyntyneen vasikan juoksutusmahan limakalvo erittää kymosiinia, sitä saadaan vasikoiden mahoista kaupalliseen tuotantoon. Kymosiinin saamiseen vasikoista liittyy useita vakavia ongelmia: tämä menetelmä käsittää lukuisia monimutkaisia työvaiheita, jotka aiheuttavat monia vaikeuksia yritettäessä varmistaa suuria määriä. Se on myös kallista eikä ole viime vuosina pystynyt vastaamaan kaupallisia vaatimuksia. Näistä syistä kymosiinin korvikkeita on alettu hyväksyä juuston teossa. Eräs tällainen korvike on mikrobiininen juoksutin, jota tuottaa *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* tai *Endothia parasitica*. Tällä mikrobijuoksuttimella on kuitenkin kohtuullisen voimakas proteolyyttinen aktiivisuus eikä ole yhtä sopiva juuston kypsyttämisessä kuin itse kymosiini, jolla on spesifinen, mutta silti heikko proteolyyttinen aktiivisuus.

Siten on vielä erittäin merkityksellistä taloudelliselta näkökannalta hankkia suuri määrä kymosiinia.

Tämän keksinnön menetelmässä käytetään uusia ekspressoointiplasmideja, jotka muodostetaan eristämällä DNA-inser-tio-osia, joissa on prokymosiinia koodaavia geenejä aikaisemmin rakennetuista yhdistelmäplasmideista ja liittämällä tämä DNA sopiviin vektoreihin. Ekspressoointiplasmideja käytetään sitten transformoimaan herkkiä mikro-organismeja olosuhteissa, joissa transformointi voi tapahtua. Mikro-organismia kasvatetaan olosuhteissa, jotka edistävät transformanttien, jotka sisältävät yhdistelmä-ekspressoointiplasmidia, korjaamista talteen. Kun isäntä-mikro-organismi on oikein transformoitu, mikrobisoluja voidaan toistuvasti monistaa viljelemällä mikro-organismeja sopivassa elatusaineessa, joka ekspressoii prokymosiinia koodaavaa geeniä tuottamaan prokymosiinia soluissaan. Siten prokymosiinin laaja tuotanto mikro-organismeilla fermentointiviljelyssä

tulee mahdolliseksi toteuttaa ja antaa vasikan kymosiinia kohtuullisin kustannuksin.

Tätä keksintöä koskevia kirjallisuusvitteitä ovat US-patentti nro 4 237 224 (Cohen ja Boyer), JP-patenttihakemus Sho 56-131 631 T. Beppu'lle, K. Nishimori'lle et al., Gene 19, 337 (1982), EP-patenttihakemus nro 68 691 Celltech Ltd.:lle ja EP-patenttihakemus nro 57 350 Collaborative Research Inc.:lle. Erityisesti käsittelynalaisessa JP-patenttihakemuksessa Sho 56-131 631, joka vastaa JP-patenttihakemusta Kokai nro 32 896/83, jätetty 24.8.1981 ja joka on siirretty samalle oikeudenomistajalle, on esitetty ekspressoointiplasmidi, joka sisältää lac⁻UV-promoottorin ja prokymosiini-cDNA:n melkein koko sekvenssin yhdistettynä E. coli beta-galaktosidaasin N-pääteaminohappoihin.

Eräs tämän keksinnön tavoitteista on antaa spesifisiä prokymosiinigeenejä käytettäväksi uusien ekspressoointiplasmidien rakenteluun.

Toisena tämän keksinnön kohteena on antaa uusia ekspressoointiplasmideja ja hyödyntää niitä prokymosiinin suuren ekspressoitumisen aikaansaamiseksi mikrobi-isäntäsoluissa.

Edelleen eräs tämän keksinnön kohde on antaa menetelmiä uusien ekspressoointiplasmidien tuottamiseksi.

Vielä on tämän keksinnön kohteena käyttää E. coli tryptofaanioperonipromoottoria E. coli lac -operonipromoottorin asemesta. Vielä on tämän keksinnön kohteena saada geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja, jotka pystyvät tuottamaan olennaisesti suurempia määriä prokymosiinia kuin mitä tähän asti tunnetuilla mikro-organismeilla voidaan tuottaa.

Edelleen tämän keksinnön yhtenä kohteena on aikaansaada menetelmä prokymosiinin tuottamiseksi käyttäen geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja.

Lopuksi on keksinnön kohteena vielä antaa itse prokymosiinia, joka on tuotettu edellä mainittujen menetelmien mukaisesti.

Läpi koko tämän selityksen "prokymosiinigeeni" määritellään nukleotidien sekvenssiksi, joka koodaa prokymosiinimolekyyliä. Mitä tahansa nukleotidisekvenssin osaa voidaan käyttää, kuten kuviossa 1 on esitetty.

5 Tämän keksinnön menetelmän mukaisesti prokymosiinin ekspressointi isäntäsoluissa ja niiden tuottaminen voidaan toteuttaa seuraavin vaihein:

1. Spesifisiä prokymosiinigeenejä eristetään tunnetuista yhdistelmäplasmideista, kuten edellä on selostettu
10 uuttamalla sopivilla restriktioentsyymeillä.

2. Prokymosiinigeenit liitetään yhteen vektorin ja translaation aloituskodonin kanssa muodostamaan ekspressointiplasmidi. Jos liitetyt prokymosiinigeenit eivät kata koko koodaussekvenssiä prokymosiinia varten, voidaan ylimääräinen synteettinen oligonukleotidi, jossa on koodaussekvenssin
15 puuttuva osa, yhdistää liitettyihin geeneihin. Synteettisellä DNA-palasella voi olla myös translaatiokodoni, joka edullisesti edeltää prokymosiinigeeniosan kärkeä.

3. Sopivia isäntäsoluja transformoidaan ekspressointiplasmidilla kalsiumkloridikäsittelyllä.
20

4. Valikoidaan ampisilliini-resistenttejä transformoituja soluja.

5. Transformoituja soluja viljellään standardiviljelymenetelmin.

25 6. Solujen raakauutteita testataan prokymosiinin läsnäolon suhteen radioimmunoanalyysillä tai proteiinin blotausmenetelmällä.

Eräs erityisen kiinnostava yhdistelmäplasmidi on nimetty pCR301:ksi ja sitä ovat kuvanneet Nishimori et al, Gene,
30 19, 337 (1982). Selostuksia menetelmistä muiden plasmidien rakentamiseksi, joilla on prokymosiini-cDNA'ta, on kuvannut Nishimori et al., J. Biochem., 90, 901 (1981) ja niitä löytyy muista kirjallisuusviitteistä, joihin edellä viitattiin. Nämä plasmidit ovat käyttökelpoisia prokymosiinigeenien lähteenä ja normaalisti niitä rakennetaan seuraavassa kuvatulla tavalla:
35

1. Prokymosiinigeenin lähetti-RNA(mRNA):ta eristetään neljänneistä vasikan mahasta.

2. mRNA muutetaan kaksirihmaiseksi DNA:ksi tavanomaisin menetelmin.

5 3. Synteettisiä liittäjiä liitetään kaksisäikeisen cDNA:n kumpaankin päähän.

4. cDNA-molekyyli yhdistetään sopivaan vektoriplasmidiin (esim. pBR 322).

10 5. Yhdistelmäplasmidi viedään sitten isäntäsoluihin transformoimalla.

6. Oikeiden kloonien tunnistaminen suoritetaan pesäkehybridisointimenetelmällä ja hybridiestetyllä translaatiolla.

7. Kloonien DNA-insertiot sekvenssoidaan Maxamin ja Gilbertin menetelmällä.

15 Proteiinia, jota saadaan prokymosiinia koodaavasta geenistä, josta puuttuu koodaussekvenssin kärkiosasta jonkin verran, nimitetään "prokymosiinin kaltaiseksi proteiiniksi". Prokymosiinia, jossa on metioniini liittyneenä sen N-pääteeseen, voidaan nimittää N-pääte-metionyyli-prokymosiiniksi.
20 Läpi tämän selityksen kumpaakin voidaan nimittää prokymosiiniksi.

Kuten myöhemmin yksityiskohtaisesti selostetaan viittaamalla edullisiin suoritusmuotoihin, tulisi ymmärtää, että tämä keksintö antaa:

25 1. Menetelmän prokymosiinia koodaavan geenin ekspressoimiseksi E. coli -isäntäsoluissa, jolloin tämä geeni johdetaan transformanteista, jotka sisältävät kloonattua prokymosiini-cDNA:ta, jonka menetelmän mukaisesti:
tämä geeni eristetään transformanteista; siihen liitetään
30 ligatoimalla transkriptio-promoottori ja translaation aloituskodoni muodostamaan ekspressoointiplasmidi; ja valikoidaan transformoituja soluja, joilla on korkeat prokymosiinin, N-pääte-metionyyli-prokymosiinin tai prokymosiinin kaltaisen proteiinin ekspressoointitasot, jolloin geenin on aina-
35 kin viidenneistä koodaavasta kodonista koodaussekvenssin

päähän asti prokymosiinia varten lisäksi oltava yhdistynyt trp L- tai trp E -geenin N-pääteosaan.

2. Menetelmän prokymosiinia koodaavan geenin ekspres-
soimiseksi E. coli -isäntäsoluissa, jolloin tämä geeni joh-
5 detaan transformanteista, jotka sisältävät kloonattua pro-
kymosiini-cDNA:ta ja jossa menetelmässä:
tämä geeni eristetään transformanteista; tähän geeniin lii-
tetään synteettinen oligonukleotidi, jolla on prokymosiinia
koodaavan sekvenssin komplementaarinen osa, joka on poistet-
10 tu tästä geenistä; siihen liitetään ligatoimalla transkrip-
tiopromoottori ja translaation aloituskodoni, kun tätä ei
ole läsnä synteettisessä oligonukleotidissa, ekspresointi-
plasmidin muodostamiseksi; isäntäsoluja transformoidaan eks-
pressointiplasmidilla; ja valikoidaan transformoituja solu-
15 ja, joilla on prokymosiinin tai N-pääte-metionyyli-prokymo-
siinin korkeat ekspresointitasot, jolloin tällä synteetti-
sellä oligonukleotidilla valinnaisesti on translaation aloi-
tuskodoni.

3. Menetelmän prokymosiinin tuottamiseksi ekspresoi-
20 malla prokymosiinia koodaavaa geeniä E. coli -isäntäsoluis-
sa, jolloin tämä geeni johdetaan transformanteista, jotka
sisältävät kloonattua prokymosiini-cDNA:ta ja jolloin mene-
telmän mukaisesti:
eristetään tämä geeni transformanteista; siihen liitetään
25 ligatoimalla transkriptiopromoottori ja translaation aloitus-
kodoni ekspresointiplasmidin muodostamiseksi; transformoi-
daan isäntäsoluja ekspresointiplasmidilla; valikoidaan
transformoituja soluja, joilla on korkeat prokymosiinin
ekspresointitasot ja viljellään transformoituja soluja
30 sopivassa elatusaineessa.

4. Ekspresointiplasmidin, joka sisältää prokymosii-
nia koodaavan geenin ja vektorin siihen operatiivisesti
liitettynä, jolloin vektori johdetaan pBR322-plasmidista
ja sisältää transkriptiopromoottorin ja translaation aloi-
35 tuskodonin.

Esillä olevassa patenttihakemuksessa kuvataan myös spesifistä prorenniiniä koodaavaa geeniä, sitä sisältäviä koodaussekvenssejä, menetelmiä uusien ekspresso-intiplasmidien rakentamiseksi; transformoituja mikro-organismeja; ja
5 niistä tuotetun prokymosiinin.

Kuvio 1 esittää täydellistä nukleotidisekvenssiä prokymosiinia koodaavalle geenille.

Kuvio 2 esittää restriktioentsyymikarttoja vektoriplasmideille, joita tässä keksinnössä käytetään.

10 Kuvio 3 esittää restriktioentsyymikarttoja ekspresso-intiplasmideille, joita tässä keksinnössä käytetään.

Kuvio 4 esittää DNA-sekvenssiä trp-promoottorin läheisyydessä pOCT2-plasmidissa.

Kuvio 5 on kaavio pTRE1:n rakentamiseksi pOCT3:sta
15 pOCT2:n kautta.

Kuvio 6 on kaavio pTRL1:n rakentamiseksi pOCT2:sta ja pBR322:sta.

Kuvio 7 on kaavio pTRP1:n rakentamiseksi pTREI1:sta.

Kuvio 8 on kaavio pCR501:n rakentamiseksi pCR301:stä
20 ja pTRE1:stä.

Kuvio 9 on kaavio pCR601:n rakentamiseksi pCR301:stä, pTRE1:stä ja pTRL1:stä.

Kuvio 10 on kaavio pCR701:n rakentamiseksi pCR501:sta ja pTRP1:stä.

25 Isäntä-mikro-organismi

Voidaan käyttää mitä tahansa mikro-organismia, joka pystyy hyväksymään ja jäljentämään halutut vektoriplasmidit, mutta käytännön syistä käytetään tässä keksinnössä E. coli c 600:n johdannaisia. Erityisen edullinen kanta on E. coli
30 c600 $r_k^- m_k^-$. Soluja viljellään tavanomaisissa viljelyolosuhteissa. Elatusaineet E. coli -kannalle voivat olla esimerkiksi:

	<u>L-liemi</u>	litraa kohti
	Bacto Tryptone	10 g
	(Bifco Lab., Detroit)	
	Bacto Yeast Extracts	5 g
5	(Difco Lab., Detroit)	
	NaCl	10 g
	glukoosi	2 g
	<u>M9-liemi</u>	litraa kohti
	Na ₂ HPO ₄	6 g
10	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	5 g
	NH ₄ Cl	1 g
	CaCl ₂	15 mg
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
15	B1 (tiamiini HCl)	5 mg, jos on tarpeen
	kasaminohappo	2,5 g
	glukoosi	5 g
	ampisilliini	50 mg
20	3-beta-indolyyliakryylihappo	15 mg

- Tavanomaisesti transformointikokeita suoritetaan LB-elatusaineessa, joka sisältää 50 µg/ml ampisilliinia, Norgardin menetelmän mukaisesti (Gene 3, 279 1978). Standardimenetelmissä E. coli -soluja viljellään tiheyteen 10-30 x 10¹² solua/litra 30-40°C:n lämpötilassa.

Promoottori

- Kloonattujen geenien saamiseksi ekspressoitumaan isäntäsoluissa on tarpeen varustaa vektoriplasmit sopivalla promoottorilla; ekspressoitumisen saavuttamiseksi voidaan käyttää useita promoottoreita niin kauan kuin ne ovat yhteensopivia isäntäsolujen kanssa. Tässä keksinnössä käytetään edullisesti E. coli -tryptofaanioperonipromoottoria.

Yhdistelmäplasmidit

- 35 pCR301

Tämän keksinnön mukaisesti geeniä on mukavasti saatavissa primaarisista yhdistelmäplasmideista, kuten edellä

selostettiin. Nämä plasmidit sisältävät prorenniiniä koodaavan geenin, jonka kokoa voidaan vaihdella ja joista joitakin on kartoitettu tarkasti restriktioentsyymiuutolla. Siten voidaan sopivilla restriktioentsyymeillä leikkaamalla
 5 erottaa prorenniiniä koodaavien geenien käyttökelpoisia osia ja käyttää DNA:n lähteenä toista kloonausta varten vektoriplasmidiin. Tällaisten plasmidien eräs edustaja on pCR301. Plasmidi pCR301 sisältää laktoosioperonipromoottorin ja lähes koko prokymosiinigeenisekvenssin (nukleotidistä
 10 nro 13 nukleotidiin nro 1 095), josta puuttuvat ainoastaan neljä ensimmäistä kodonia. Tämä plasmidi johdetaan plasmidista pBR322 (F. Bolivar et al., Gene, 2, 95 (1977)). Nukleotidisekvenssi aloituskodonin ATG ja kloonatun prokymosiinigeenin alun välissä on kuvattu seuraavassa (tämä sekvenssi
 15 vastaa nukleotidiä, joka koodaa beta-galaktosidaasin 10 N-pääte-aminohappoa):

5' - ATG GCC ATG TTA ACG GAT TCA CTG
 Met
 beta-galaktosidaasi
 20 GAA TTC CGG - 3'
 Arg
 prokymosiini

25 Restriktioentsyymikartta pCR301:lle on esitetty kuviossa 3.

pOCT2

Plasmidi pOCT3, pOCT2:n prekursori, on pBR322-plasmidi, jonka EcoRI-kohtaan on yhdistetty DNA-osan, jolla
 30 on trp-promoottori-operaattori, trp L ja trp E'. Mainittu trp-promoottori-operaattoriossa (- 0,5 Kb) on alunperin uutettu plasmidista p trp ED5-1 (R.A. Hallewell ja S. Emtage, Gene, 9, 27, 1980). Tämä DNA täytetään T₄ D-polymeraasilla, johon on liitetty EcoRI-linkkeri. Muodostunut DNA-fragmentti
 35 insertoidaan pBR322:n EcoRI-kohtaan. Plasmidi pOCT3 saatiin ystävällisesti professori K. Matsubara'lta Osakan

yliopistosta, School of Medicine'stä. trp operoni-DNA leikataan pOCT3:sta uuttamalla EcoRI:lla ja kun se on eristetty, se pannaan sitten takaisin pOCT3:n EcoRI-kohtaan sillä tavalla, että leikatut päät kääntyvät ympäri, mikä johtaa pOCT2:een. Siten pOCT3:n transkriptiosuunta on päinvastainen pOCT2:n suunnalle; se on myötäpäivään pOCT2:ssa (5':sta 3':een), kun taas vastapäivään pOCT3:ssa. Kuvio 4 esittää DNA-sekvenssiä (n. 300 emästä) trp-promoottorin läheisyydessä plasmidissa pOCT2.

10 Kuvio 5 on kaavio pOCT3:n rakentamiseksi pOCT2:sta. Restriktioentsyymikartta pOCT2:lle on esitetty kuviossa 2.

pTRE1

Plasmidi pTRE1 johdetaan pOCT2:sta ja siinä on yksi ainoa EcoRI-kohta, koska toinen EcoRI-kohta lähellä ampisilliiniresistenttiä aluetta on poistettu pOCT2:sta. Tämä plasmidi sisältää pOCT2:n koskemattoman trp-operoniosan, kuten kuviossa 2 on esitetty. pTRE1:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

Plasmidia pOCT2 uutetaan osittain EcoRI:llä, mistä on seurauksena EcoRI-kohdan pilkkoutuminen lähellä ampisilliiniresistenttiä aluetta. Yksisäikeiset osat korjataan siten DNA-polymeraasin avulla ja korjatut päät liitetään käyttäen T₄ DNA-ligaasia pTRE1:n valmistamiseksi.

25 Restriktioentsyymikartta pTRE1:lle on esitetty kuviossa 2. Kuvio 5 esittää kaaviota pTRE1:n rakentamiseksi pOCT2:sta.

pTRL1

30 Plasmidissa pTRL1 on DNA-osa pOCT2:sta, jota osaa rajoittavat EcoRI- ja RSaI-kohdat. Tämä osa käsittää 360 emäsparia (tunnistamattomasta EcoR-kohdasta RSaI-kohtaan trp L-alueella), joista jotkut on sekvenssoitu, kuten kuviossa 4 esitetään. pTRL1:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

35 Plasmidi pOCT2 pilkotaan EcoRI:llä ja uutetaan sitten osittain RSaI:lla antamaan 360 emäsparin osan, joka sisältää trp-promoottorialueen (trp L). Tämä osan liitetään

sitten pBR322:n EcoRI-kohtaan antamaan kahta lajia yhdistelmäplasmidia. Toinen on plasmidi pTRL1, jossa transkriptiosuunta trp-promoottorilta on vastapäivään.

Restriktioentsyymikartta pTRL1:lle on esitetty kuviossa 2. Kuvio 6 on kaavio pTRL1:n rakentamiseksi pOCT2:sta.

pTRP1

Plasmidilla pTRP1 on DNA-osa pTRE1:stä, jota osaa rajoittavat HpaI- ja ClaI-kohdat. Tämä osa käsittää n. 4 640 emäsparia, jotka ovat alunperin lähtöisin pBR322:sta. Plasmidilla on myös toinen DNA-osa pTRE1:stä, jota osaa rajoittavat HpaI- ja TaqI-kohdat. Tämä osa käsittää 32 emäsparia, jotka vastaavat trp L -promoottoria. pTRP1:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

Plasmidi pTRE1 pilkotaan HpaI:lla ja ClaI:lla antamaan n. 4 640 emäsparin (bp) suoraketjuisen DNA-osasen. Nämä molemmat osat liitetään yhteen ligatoimalla antamaan pTRP1. Restriktioentsyymikartta pTRP1:selle on esitetty kuviossa 2. Kuvio 7 on kaavio pTRP1:n rakentamiseksi pTRE1:stä.

Ekspressoointiplasmidit

Käyttäen jälleen edellä esitettyjä standardimenetelmiä, uutetaan haluttu DNA-osanen, joka sisältää kloonatun prokymosiinigeenin, transformantista ja pilkotaan restriktioentsyymeillä; vektoriplasmidi pilkotaan samalla tavalla; ja osat sekoitetaan ja liitetään. Nämä vaiheet ovat johtaneet ekspressoointiplasmidien pCR501, pCR601 ja pCR701 rakentamiseen, jotka on suunniteltu helpottamaan prokymosiinin ekspressoitumisen saavuttamista E. coli:ssa.

pCR501

Plasmidi pCR501 sisältää pTRE1:n DNA-osan yhdistyneenä n. 1 000 nukleotidin päähän pCR301:stä, jotka koodaavat prokymosiinimolekyyliä. pCR501:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

Plasmidi pTRE1 leikataan EcoRI:lla ja yksisäikeiset osat poistetaan S1-nukleaasin avulla. EcoRI-liittäjä (GGATTTTCC/CCTTTAAGG) liitetään tylppään päähän käyttäen T₄ DNA-ligaasia. Seuraavaksi tätä DNA:ta uutetaan EcoRI:lla

ja SalI:llä antamaan suora DNA-segmentti (a) (n. 4 210 bp). Plasmidi pCR301 leikataan EcoRI:llä ja KpnI:lla DNA-segmentin (b) saamiseksi. Tämä DNA-segmentti on 246 emäsparin sekvenssi, joka sisältää prokymosiinigeenin yhdistyneenä jäämä-

5 beta-galaktosidaasia koodaavaan geeniin. Samalla tavalla pCR301 leikataan KpnI:lla ja SalI:lla. DNA-segmentin (c) saamiseksi. Tämä DNA on prokymosiinigeenin 1 025 emäsparin sekvenssi sen C-pääte mukaan lukien. Jokainen DNA-segmentti liitetään yhteen T₄ DNA-ligaasin avulla. E. coli -kanta C600

10 transformoidaan liitettyllä DNA:lla ja valikoidaan ampicilliiniresistenttejä pesäkkeitä (pCR501).

Kuten kuviossa 3 on esitetty, on pCR501:n analyysi restriktioentsyymi-pilkonnalla paljastunut, että pCR501 sisältää trp-operoni-promoottorin ja n. 1 000 nukleotidia,

15 jotka koodaavat prokymosiinia (nukleotidista nro 13 geenin päähän, nimittäin 5. kodonista 365. kodoniin). Kuvio 8 esittää kaaviota pCR501:n rakentamiseksi pCR301:stä ja pTRE1:stä.

Seuraamalla Maxam-Gilbert'in menetelmää on nukleotidisekvenssin aloitus-ATG-kodonin ja prokymosiinigeenin alun

20 (5. kodoni) välissä analysoitu olevan:

EcoRI
↓
5' - ATG CAA ACA CAA AAA CCG ACT GGG GAA TTC CGG - 3'
Met Arg

25 trp E -alue prokymosiini

Transformoidut solut, joissa on tämä plasmidi, ekspressoivat kloonatun geenin ja tuottavat prokymosiinia trp E -promoottorin säätelyn alaisena.

30 Tällä tavalla tuotetusta prokymosiinista puuttuu aidon prokymosiinin aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssiä ensimmäisestä neljänteen aminohappoon N-päätteellä, mutta sisältää, sen tilalla, kahdeksan aminohappoa (metioniinin ja muita) jotka ovat peräisin edellä mainitusta trp

35 E -promoottorikoodaussekvenssistä sekä myös kaksi aminohappotähdettä, jotka ovat syntyneet beta-galaktosidaasista.

Tätä prokymosiinia nimitetään sen tähden prokymosiinin kaltaiseksi proteiiniksi.

pCR601

Plasmidi pCR601 sisältää pTRE1:n DNA-osan ja 56 emäsparin osasen pTRL1:stä yhdistyneenä samaan koodaussekvenssiin prokymosiinia varten, joka sekvenssi on läsnä pCR501:ssä. pCR601:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

Plasmidi pTRE1 leikataan Hpa:lla ja SalI:lla antamaan suora 4 010 emäsparin segmentti (DNA (d)). Seuraavaksi plasmidi pTRL1 leikataan HpaI:lla ja EcoRI:lla antamaan 56 emäsparin segmentti (DNA (e)), joka sisältää trp L -promoottorin. Molemmat segmentit sekoitetaan ja liitetään yhteen DNA (b):n ja (c):n (jotka molemmat on aikaisemmin saatu pCR301:stä) kanssa T₄ DNA-ligaasin avulla. E. coli -kanta c 600 transformoidaan syntyneellä liitetyllä DNA:lla ja valikoidaan ampisilliiniresistentit pesäkkeet (pCR 601).

Kuten kuviossa 3 on esitetty, on pCR601:n analyysi restriktioentsyymipilkonnalla paljastanut, että pCR601 sisältää trp L -promoottorin ja n. 1 000 nukleotidia, jotka koodaavat prokymosiinia (nukleotidista nro 13 geenin päähän, nimittäin 5. kodonista 365 kodoniin). Kuvio 9 esittää kaaviota pCR601:n rakentamiseksi pCR301:stä, pTRE1:stä ja pTRL1:stä.

Seuraamalla Maxam-Gilbert'in menetelmää on nukleotidisekvenssin aloitus-ATG-kodonin ja prokymosiinigeenin alun (5. kodonin) välissä analysoitu olevan:

EcoRI
↓

5' - ATG AAA GCA ATT TTC GTG GAA TTC CGG - 3'
Met Arg prokymosiini

trp L -alue

Transformoidut solut, jotka sisältävät plasmidin, ekspressoivat kloonatun prokymosiinigeenin ja tuottavat prokymosiinia trp L -promoottorin säätelyn alaisena.

Tällä tavalla tuotetusta prokymosiinista puuttuu aidon prokymosiinin aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssiä ensimmäisestä neljänteen aminohappoon N-päätteellä, mutta sisältää, sen tilalla, kuusi aminohappoa (metioniinin ja
5 muita), jotka ovat peräisin edellä mainitusta trp L -promoottori-koodaussekvenssistä sekä myös kaksi aminohappotähdettä, jotka ovat peräisin beta-galaktosidaasista. Tätä prokymosiinia nimitetään sen tähden prokymosiinin kaltaiseksi proteiiniksi.

10 pCR701

Plasmidi pCR701 sisältää pTRPI:n DNA-osan ja synteettisen nukleotidipalasan yhdistyneenä prokymosiinia koodaavaan sekvenssiin pCR501:stä. pCR701:n rakentaminen suoritetaan seuraavalla tavalla.

15 Plasmidi pTRP1 leikataan HindIII:lla ja SalI:lla antamaan suora DNA-segmentti (f) (n. 4 050 bp). Plasmidi pCR501 leikataan BamHI:lla ja SalI:lla suoran DNA-segmentin (g) (1 264 bp) saamiseksi. Syntetisoidaan synteettinen oligonukleotidi, jossa on 22 emäsparia ja joka on sekvenssi:

20

5' AGCTTATGGCTGAGATCACCAG 3'

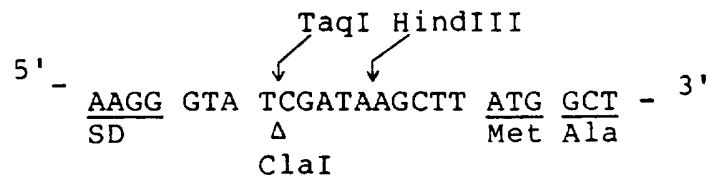
3' ATACCGACTCTAGTGGTCCTAG 5'

Tämä DNA-segmentti (f) korvaa nukleotidisekvenssin,
25 joka on poistettu uuttamalla BamHI:lla, joka leikkaa prokymosiinigeenin 14. nukleotidin. Nämä kolme segmenttiä (f), (g) ja (h) liitetään yhteen T₄ DNA-ligaasin avulla. E. coli c600 transformoidaan liitettyllä DNA:lla ja valikoidaan ampisilliiniresistentit pesäkkeet (pCR701).

30 Kuten kuviossa 3 on esitetty, on pCR701:n analyysi restriktioentsyymipilkonnalla paljastanut, että pCR701 sisältää trp L -promoottorin ja koko prokymosiinia koodaavan sekvenssin (ts. nukleotidista nro 1 geenin päähän asti, nimittäin 1. kodonilta 365. kodoniin). Kuvio 10 esittää kaa-
35 viota pCR701:n rakentamiseksi pTRP1:stä ja pCR501:stä.

Kuten Maxam-Gilbert'in menetelmällä on määritetty sijaitsee SD- (Shinon ja Delgarno) alue 13 nukleotidin päässä ATG-aloituskodonista, joka edeltää prokymosiinigeenin ensimmäistä kodonia (ks. seuraavaa).

5



10

Transformoidut solut, jotka sisältävät plasmidin, ekspressoivat prokymosiinigeeniä ja tuottavat prokymosiinia trp L -promoottorin säätelyn alaisena.

Tällä tavalla tuotettu prokymosiini on N-pääte-metionyyliprokymosiini, jossa metioniini, joka on peräisin aloituskodonista ATG, on yhdistynyt aidon prokymosiinin N-pääteeseen.

Prokymosiinin ekspressoiminen E. coli:ssa

E. coli -solujen, jotka on transformoitu ekspressointiplasmideilla, täyskasvuviljelyn (LB-väliaineessa) annosta viljellään M9-liemessä, joka sisältää 3-beta-indolyyliakryylihappoa (15 µg/ml) ja ampisilliinia (50 µg/ml). Solut korjataan talteen, kun lisääntyminen saavuttaa maksimin. Solut tuhotaan sitten äänikäsittelyllä ja saadaan soluvapaa uute. Tämä uute saatetaan sähköforeesin polyakryyliamidi-geelissä, joka sisältää SDS. Tuoteproteiini havaitaan proteiiniblottausmenetelmällä. Seuraamalla edellä esitettyjä työvaihteita tai radioimmunoanalyysillä on jokaista transformanttikantaa, joka sisältää pCR501, pCR601 tai pCR701 testattu kykynsä suhteen tuottaa prokymosiinia. Analyysi autoradiografialla (Nishimori, Gene, 19, 337 (1982) on paljastanut, että jokainen kanta antaa proteiininauhan, jonka suuruus on yhtä suuri kuin autenttisen prokymosiinin nauha. Lisäksi prokymosiinin tuotantotasoon on arvioitu olevan yli 300 000 molekyyliä solua kohti. Samanlaisia tuloksia on saatu analyysillä käyttäen radioimmunoanalyysiä.

Nämä tulokset ovat osoittaneet, että prokymosiinia syntyy *E. coli* -soluissa, jotka sisältävät plasmidia pCR501, pCR601 tai pCR701, *E. coli* trp operoni -promoottorin transkriptio-säätelyn alaisena ja että tuotantotasot ovat olennaisesti korkeampia kuin aikaisemmin ilmoitetut *E. coli* lac-operonin säätelyn alaisena. Vieläpä korkeammat tuotantotasot ovat mahdollisia käyttämällä samaa kaaviota keksinnön mukaisesti ja saamalla trp-promoottorin yhdistymisiä lähempänä prokymosiinin aloituskodonia, joka edullisesti seuraa prokymosiinigeeninärkeä.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä valmistetuista *E. coli* -kannoista ovat esimerkkejä viljelyt, jotka on talletettu kokoelmaan Fermentation Research Institute, Ibaraki, Japani nimikkeeseen Budapest Treaty ja tunnustetaan tulonumerosta, joka on annettu jokaiselle kannalle.

Tätä keksintöä selostetaan yksityiskohtaisesti valaistamistarkoituksessa ja esimerkein; siitä huolimatta on selvää, että tiettyjä vaihteluita ja muunnoksia voidaan tehdä keksinnön piirissä.

Esimerkki

Kaikissa seuraavissa esimerkeissä TEN-puskuriliuoksen on tarkoitettu olevan liuos, joka sisältää Tris-HCl (20 mM), NaCl (50 mM) ja EDTA (1 mM) ja jonka pH on n. 7,5.

Esimerkki 1

Plasmidin pTRE1 valmistus

Plasmidia pOCT2 uutettiin osittain EcoRI:lla inkuboimalla 20°C:ssa 7,5 min 30 µl:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (1,5 µg 15 µl:ssä TEN), EcoRI (2,5 U, 0,5 µl TEN), EcoRI-puskuria (3 µl) ja H₂O (11,5 µl). Agarosoigeelielektroforeesin jälkeen haluttu DNA eristettiin (40 µl:ssä TEN) ja tätä kuumennettiin 60°C:ssa viisi minuuttia. Tähän DNA-liuokseen (40 µl) lisättiin DNA-polymeraasi I:tä (4 U, 4 µl TEN), 16 mM ATP (4 µl), polymeraasipuskuriliuosta (6 µl), ja H₂O (2 µl). Syntynyttä seosta (koko-naistilavuus 60 µl) inkuboitiin 25°C:ssa 30 minuuttia. Sen jälkeen kun oli lisätty 0,25 M EDTA-liuosta (4 µl), mitä

seurasi fenoli- ja eetterikäsittely, DNA saostettiin etanolilla. Sakka liuotettiin liuokseen (10 μ l), joka sisälsi T_4 DNA-ligaasia (1 U, 1 μ l), 3 mM ATP (2 μ l), ligaasipuskuriliuosta (2 μ l) ja H_2O (5 μ l) ja tätä inkuboitiin 22°C:ssa
 5 kaksi tuntia. Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin TEN-liuokseen. Tämä liuos käytettiin transformoimaan kalsiumilla käsitelty *E. coli* C 600 -kanta. 12 pesäkkeestä saatiin kaksi transformanttia, jotka sisälsivät pTRE1.

10 Esimerkki 2

Plasmidin pTRL1 valmistus

i) DNA-segmentin (1) valmistus

Plasmidia pOCT2 leikattiin EcoRI:lla 37°C:ssa kaksi tuntia 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (10,6 μ g
 15 100 μ l:ssä TEN), EcoRI-puskuria (12 μ l) ja EcoRI (40 U, 8 μ l TEN). Inkuboinnin jälkeen DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 50 μ l:aan TEN. Leikattua DNA:ta uutettiin osittain RsaI:lla inkuboimalla 20°C:ssa 10 minuuttia 60 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi DNA (49 μ l TEN), BamHI-puskuria (6 μ l), H_2O (3 μ l) ja RsaI (20 U, 2 μ l TEN).
 20 Kaksinkertaisesti leikattua DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 20 μ l:aan TEN. Liuotettu liuos saatettiin sitten polyakryyliamidigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 364 emäsparin suora DNA (0,16 μ g
 25 40 μ l:ssa TEN). Sillä välin EcoRI-liittäjä kinasoitiin T_4 -polynukleotidikinaasilla 37°C:ssa yksi tunti 20 μ l:ssa reaktioseosta, joka sisälsi liittäjää (5 μ g, 5 μ l TEN), ATP (3 mM, 2 μ l), kinatointipuskuria (2 μ l), H_2O (9 μ l) ja kinaasia (22 U 2 μ l:ssa TEN). Kinatointiseos (20 μ l)
 30 lisättiin edellä saatuun DNA-liuokseen (35 μ l), minkä jälkeen lisättiin T_4 DNA-ligaasia (5 U, 5 μ l TEN), ligaasipuskuria (4 μ l) ja ATP (6 mM, 7 μ l). Kokonaisseos (71 μ l) liitettiin yhteen inkuboimalla 22°C:ssa kaksi tuntia. Liitetty DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin
 35 50 μ l:aan TEN. Liuotettuun liuokseen (45 μ l) lisättiin EcoRI (350 U 70 μ l:ssä TEN). EcoRI-puskuria (20 μ l) ja

H₂O (65 μ l). Syntynyttä seosta (200 μ l) inkuboitiin 37°C:ssa kolme tuntia. Inkubointi päätettiin fenolikäsittelyllä ja DNA uutettiin eetterillä, saostettiin etanolilla ja liuotettiin 40 μ l:aan TEN. Liuotettu liuos saatettiin polyakryyli-

5 amidigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen DNA-segmentti (1), jolla on koossapysyvät päät (0,1 μ g 240 μ l:ssa Tris-asetatti-puskuria) eristettiin.

ii) DNA-segmentin (2) valmistus pBR322:sta

Plasmidi pBR322 leikattiin EcoRI:lla inkuboimalla

10 37°C:ssa yksi tunti 30 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (4,5 μ g 20 μ l:ssa TEN), EcoRI-puskuria (3 μ l), H₂O (3 μ l) ja EcoRI (20 U 4 μ l:ssa TEN). Inkubointi päätettiin fenolikäsittelyllä ja DNA uutettiin eetterillä, saostettiin etanolilla ja liuotettiin 40 μ l:aan 10 mM

15 Tris-HCl-puskuria. Liuotettua liuosta käsiteltiin 10 μ l:lla MATE BAP inkuboimalla 65°C:ssa yksi tunti. Inkuboinnin jälkeen MATE BAP poistettiin pesemällä inkuboitu seos 20 μ l:lla 10 mM Tris-HCl-puskuria. Täten DNA-segmentti (2) (4,2 μ g) otettiin talteen 60 μ l:aan 10 mM Tris-HCl-puskuria.

20 iii) DNA-segmentin (1) ja (2) liittäminen

Segmenttiä (1) (0,05 μ g 120 μ l:ssa Tris-asetatti-puskuria) ja segmenttiä (2) (0,14 μ g 2 μ l:ssa 10 mM Tris-HCl-puskuria) sekoitettiin ja sekoitettua liuosta käsiteltiin etanolilla. Syntynyt sakka liuotettiin 50 μ l:aan TEN.

25 40 mikrolitraa liuotettua liuosta saatettiin liitettäväksi käyttäen T₄ DNA-ligaasia (0,9 U 1 μ l:ssa TEN), ligaasipuskuria (5 μ l) ja ATP (6 mM, 5 μ l TEN) inkuboimalla 51 μ l liuosta 22°C:ssa kaksi tuntia. Liitetty DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 50 μ l:aan TEN.

30 iv) Transformointi

20 mikrolitraa edellä liitettyä DNA-liuosta käytettiin transformoimaan kannan E. coli C 600 kelvollisia soluja. N. 1 500 transformantin havaittiin olevan ampisilliini-

35 kahdestakymmenestä transformantista sisälsi plasmidia pTRL1.

Esimerkki 3Plasmidin pTRP1 valmistus

i) DNA-segmentin (3) valmistus plasmidista pTRE1

Plasmidi pTRE1 leikattiin HpaI:lla inkuboimalla

5 37°C:ssa 1,5 tuntia 40 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plas-
midia (2,46 μ g 30 μ l:ssa TEN), HpaI-puskuria (4 μ l) ja
HpaI (30 U 6 μ l:ssa TEN). Leikattu DNA leikattiin edel-
leen ClaI:lla lisäämällä DNA-liuos 10 μ l:aan liuosta, joka
sisälsi ClaI-puskuria (5 μ l) ja ClaI (25 U, 5 μ l TEN) ja
10 inkuboimalla 37°C:ssa 1,5 tuntia. Kaksinkertaisesti leikat-
tu DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 40 μ l:aan
TEN. Liuotettu liuos saatettiin agarosigeelielektroforee-
siin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 4 640 emäsparin suo-
ra DNA-segmentti (3) (2,35 μ g 80 μ l:ssa TEN).

15 ii) DNA-segmentin (4) valmistus plasmidista pTRE1

Plasmidia pTRE1 leikattiin HpaI:lla 37°C:ssa 1,5 tun-
tia 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (8,2 μ g
100 μ l:ssa TEN), HpaI-puskuria (12 μ l) ja HpaI (57 U
8 μ l:ssa TEN). Tähän seokseen lisättiin liuos, joka sisäl-
20 si TaqI (80 U 9 μ l:ssa TEN) ja HpaI-puskuria (12 μ l) ja
HpaI (57 U 8 μ l:ssa TEN). Tähän seokseen lisättiin liuos,
joka sisälsi TaqI (80 U 9 μ l:ssa TEN) ja HpaI-puskuria
(1 μ l). Syntynyttä seosta (130 μ l) inkuboitettiin 65°C:ssa
yksi tunti. Inkuboinnin jälkeen kaksinkertaisesti leikattu
25 DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 40 μ l:aan
TEN. Liuotettu liuos saatettiin polyakryyliamidigeelielektro-
foreesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 32 emäsparin
suora DNA-segmentti (4) (0,054 μ g 40 μ l:ssa TEN).

iii) DNA-segmentin (3) ja (4) liitäntä

30 Seos, joka sisälsi DNA-segmenttiä (3) (0,29 μ g
10 μ l:ssa TEN) ja segmenttiä (4) (0,014 μ g 10 μ l:ssa TEN)
saatettiin liitettäväksi käyttäen T₄-ligaasia (3,6 U
4 μ l:ssa TEN), ligaasipuskuria (3 μ l) ja ATP (6 mM, 3 μ l
TEN). Liitäntäseosta (30 μ l) inkuboitettiin 22°C:ssa kaksi
35 tuntia. Liitetty DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuo-
tettiin 40 μ l:aan TEN.

iv) Transformointi

30 mikrolitraa edellä saatua TEN-liuosta, joka sisältää liitetyn DNA:n, käytettiin transformoimaan kannan E. coli C600 kelvollisia soluja. N. 840:n transformantin havaittiin
 5 olevan ampicilliiniresistenttejä. Kaikki transformantit sisälsivät pTRP1-plasmidin.

Esimerkki 4

Plasmidin pCR501 rakentaminen

i) DNA-segmentin (a) valmistus plasmidista pTRE1

10 Plasmidi pTRE1 pilkottiin inkuboimalla 37°C:ssa kaksi tuntia 120 μ l:ssa reaktioseosta, joka sisälsi plasmidia (8,2 μ g 100 μ l:ssa TEN), EcoRI-puskuria (12 μ l), H₂O (3 μ l) ja EcoRI (25 U 5 μ l:ssa TEN). Fenoliuuton, eetteriuuton, etanolisaostuksen ja liuottamisen jälkeen 50 μ l:aan
 15 TEN leikattu DNA leikattiin edelleen S1 nukleasilla 22°C:ssa puoli tuntia 50 μ l:ssa reaktioseosta, joka sisälsi DNA (25 μ l TEN), SI-puskuria (5 μ l), H₂O (10 μ l) ja SI-nukleasia (100 U, 10 μ l). Inkubointi lopetettiin fenolikäsittelyllä ja DNA uutettiin eetterillä ja saostettiin etanolilla.
 20 Sillä välin EcoRI-liittäjää kinasoitiin T₄ polynukleotidikinaasilla 37°C:ssa yksi tunti 20 μ l:ssa reaktioseosta, joka sisälsi liittäjää (5 μ g, 5 μ l), ATP (3 mM, 2 μ l), kinatoimispuskuria (2 μ l), H₂O (9 μ l) ja kinasia (22 U 2 μ l:ssa TEN). Kinatoimisseos (20 μ l), joka sisälsi EcoRI-liittäjän, lisättiin etanolilla saostettuun
 25 leikattuun DNA:han yhdessä ATP:n (3 mM, 5 μ l) plus 4,5 yksikön kanssa T₄ ligaasia (5 μ l TEN). Seosta (30 μ l) inkuboitettiin 22°C:ssa kaksi tuntia. Tuote-DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 60 μ l:aan TEN. DNA-liuokseen
 30 (50 μ l) lisättiin EcoRI 500 U 50 μ l:ssa TEN), EcoRI-puskuria (20 μ l) ja H₂O (80 μ l). Syntynyttä seosta (200 μ l) inkuboitettiin 37°C:ssa kaksi tuntia. Inkubointi lopetettiin fenolikäsittelyllä ja DNA uutettiin eetterillä ja saostettiin etanolilla. Saostunut DNA leikattiin SaliI:lla inkuboimalla
 35 37°C:ssa 1,5 tuntia 110 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi SaliI (100 U, 20 μ l), SaliI-puskuria (10 μ l), H₂O

(80 μ l). Inkuboinnin jälkeen leikattu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 60 μ l:aan TEN.

DNA saatettiin agarosielektrosätköforeesiin antamaan 3,5 μ g puhdistettua suoraa DNA:ta (a) (4 210 bp)

5 100 μ l:ssa TEN.

ii) DNA-segmentin (b) valmistus plasmidista pCR301

Plasmidi pCR301 leikattiin KpnI:lla inkuboimalla 37°C:ssa 1,5 tuntia 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (7,3 μ g 100 μ l:ssa TEN), KpnI-puskuria (12 μ l),
 10 H₂O (2 μ l) ja KpnI (35 U, 6 μ l TEN). Seokseen lisättiin EcoRI-puskuriliuosta (14 μ l), joka sisälsi EcoRI (30 U, 6 μ l TEN). 140 μ l seosta inkuboitettiin 37°C:ssa yksi tunti. Kaksinkertaisesti leikattu DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 60 μ l:aan TEN. Liuotettu liuos saatettiin
 15 tiin polyakryyliamidigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 246 emäsparia DNA-segmentti (b) (0,03 μ g 4 μ l:ssa TEN).

iii) DNA-segmentin (c) valmistus plasmidista pCR301

Plasmidi pCR301 leikattiin KpnI:lla inkuboimalla 37°C:ssa 1,5 tuntia 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (15 μ g 100 μ l:ssa TEN), KpnI-puskuria (12 μ l),
 20 H₂O (2 μ l) ja KpnI (35 U, 6 μ l TEN). 14 μ l:n SalI-puskuriliuos plus SalI (32 U, 4 μ l TEN), H₂O (2 μ l) lisättiin edellä inkuboituun seokseen. 140 μ l seosta inkuboitettiin edelleen 37°C:ssa yksi tunti. Kaksinkertaisesti leikattu DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 60 μ l:aan
 25 TEN. Liuotettu liuos saatettiin agarosigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 1 025 emäsparin DNA-segmentti (c) 2,15 μ g 180 μ l:ssa TEN).

30 iv) DNA-segmenttien (a), (b) ja (c) liitäntä

Seos, joka sisälsi DNA-segmenttiä (a) 1 μ g 30 μ l:ssa TEN), -segmenttiä (b) (0,03 μ g 4 μ l:ssa TEN) ja -segmenttiä (c) (0,4 μ g 30 μ l:ssa TEN) lyofilisoitiin. Lyofilisoinnin
 jälkeen sakka huuhdeltiin etanolilla. Jokainen saostettu
 35 segmentti liitettiin yhteen 20 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi ligaasipuskuria (4 μ l), ATP (3 mM, 4 μ l), H₂O (1 μ l)

ja T_4 ligaasia (0,9 U, 1 μ l). Inkubointia jatkettiin kaksi tuntia 22°C:ssa. Liitetty DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 40 μ l:aan TEN.

v) Transformointi

- 5 TEN-puskuriliuos (30 μ l), joka sisälsi edellä saadun liitetyn DNA:n, käytettiin transformoimaan E. coli -kanta C600. 20 transformantin havaittiin sisältävän plasmidia pCR501. Yksi niistä talletettiin kokoelmaan FRI E. coli C600 $r_k^- m_k^-$ (pCR501) FERM BP 262:na.

10 Esimerkki 5

Plasmidin PCR 601 rakentaminen

i) DNA-segmentin (d) rakentaminen plasmidista pTRE1

Plasmidi pTRE1 leikattiin HpaI:lla inkuboimalla

- 37°C:ssa yksi tunti 40 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (2,46 μ g 30 μ l:ssa TEN), HpaI-puskuria (4 μ l) ja HpaI (35 U, 6 μ l TEN). Inkuboituun seokseen lisättiin sitten 10 μ l liuosta, joka sisälsi SalI-puskuria (5 μ l) ja SalI (20 U, 5 μ l TEN). Seosta (50 μ l) inkuboitiin edelleen 37°C:ssa yksi tunti. Kaksinkertaisesti leikattu DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 40 μ l:aan TEN.
- 20 Liuotettu liuos saatettiin agarosigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 4 010 emäsparin segmentti (d) (2,0 μ g 40 μ l:ssa TEN).

ii) DNA-segmentin (e) valmistus plasmidista pTRL1

- 25 Plasmidi pTRL1 leikattiin HpaI:lla inkuboimalla 37°C:ssa 1,5 tuntia 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (15,4 μ g 100 μ l:ssa TEN), HpaI-puskuria (12 μ l), HpaI (25 U, 5 μ l TEN) ja H₂O (3 μ l). Inkuboituun seokseen lisättiin sitten 20 μ l liuosta, joka sisälsi EcoRI-puskuria (914 μ l) ja EcoRI (30 U, 6 μ l TEN). Seosta (140 μ l) inkuboitiin edelleen 37°C:ssa yksi tunti. Kaksinkertaisesti leikattu DNA saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 40 μ l:aan TEN. Liuotettu liuos saatettiin polyakryyliamidigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristettiin 56 emäsparin segmentti (e) (0,18 μ g 40 μ l:ssa TEN).
- 35

iii) DNA-segmentin (b) valmistus plasmidista pCR301 Toistamalla esimerkin 4 menettely, mutta käyttämällä 32 yksikköä KpnI ja 30 yksikköä EcoRI, leikattiin plasmidi pCR301 KpnI:lla ja sitten EcoRI:lla antamaan 0,46 μ g (40 μ l:ssa TEN) 246 emäsparin DNA-segmenttiä polyakryyliamidigeelielektroforeesin jälkeen.

iv) DNA-segmentin (c) valmistus plasmidista pCR301 Toistamalla esimerkin 4 menettely, mutta käyttäen 30 yksikköä KpnI ja 24 yksikköä SalI, leikattiin plasmidi pCR301 KpnI:lla ja sitten SalI:lla antamaan 3,9 μ g (40 μ l:ssa TEN) 1 025 emäsparin DNA-segmenttiä agarosigeelielektroforeesin jälkeen.

v) DNA-segmenttien (b), (c), (d) ja (e) liitöntä Seos, joka sisälsi DNA-segmenttiä (b) (0,06 μ g 5 μ l:ssa TEN), -segmenttiä (c) (0,49 μ g 5 μ l:ssa TEN), -segmenttiä (d) (0,5 μ g 10 μ l:ssa TEN) ja -segmenttiä (e) (0,49 μ g 5 μ l:ssa TEN), saatettiin liitettäväksi käyttäen T_4 -liigaasia (5,5 U 6 μ l:ssa TEN) ja liitöntäpuskuria (4,5 μ l) plus ATP (6 mM, 4,5 μ l). Liitettyä seosta (45 μ l) inkuboitettiin 22°C:ssa kaksi tuntia. Liitetty DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 60 μ l:aan TEN.

vi) Transformointi

TEN-puskuriliuos (20 μ l), joka sisälsi edellä liitetyn DNA:n, käytettiin transformoimaan E. coli C600 $r_k^- m_k^-$ -kanta. Transformoinnin jälkeen saatiin 27 ampisilliiniresistenttiä transformanttia. Kahdeksan transformantin havaittiin sisältävän pCR601 määritettynä restriktioentsyymiuutolla. Tämä E. coli C600 $r_k^- m_k^-$ (pCR601) -kanta talletettiin kokoelmaan FRI Ferm BP263:na.

30 Esimerkki 6

Plasmidin pCR701 rakentaminen

i) DNA-segmentin (f) valmistaminen plasmidista pTRP1 Plasmidi pTRP1 leikattiin HindIII:lla inkuboimalla 37°C:ssa yksi tunti 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plasmidia (25,2 μ g 100 μ l:ssa TEN), HindIII-puskuria (12 μ l) ja HindIII (48 U, 8 μ l TEN). Inkuboituun seokseen lisättiin

SalI (24 U, 6 μ l TEN) ja SalI-puskuria (14 μ l). Syntyne-
 tä 140 μ l:n liuosta inkuboitiin 37°C:ssa kaksi tuntia. Kak-
 sinkertaisesti leikattu DNA saostettiin etanolilla ja sakka
 liuotettiin 60 μ l:aan TEN. Liuotettu liuos saatettiin aga-
 5 roosigeelielektroforeesiin. Elektroforeesin jälkeen eristet-
 tiin 4 051 emäsparin suora DNA-segmentti (f) (8,2 μ g 120 μ l:ssa
 TEN).

ii) DNA-segmentin (g) valmistus plasmidista pCR501
 Plasmidi pCR501 leikattiin SalI:lla inkuboimalla
 10 37°C:ssa yksi tunti 120 μ l:ssa liuosta, joka sisälsi plas-
 midia (39 μ g 100 μ l:ssa TEN), SalI-puskuria (12 μ l) ja
 SalI (32 U, 8 μ l TEN). Leikattua DNA:ta uutettiin osittain
 BamHI:lla lisäämällä BamHI (25 U, 5 μ l TEN) edelliseen
 seokseen ja inkuboimalla 22°C:ssa puoli tuntia. Tuote-DNA
 15 saostettiin etanolilla ja sakka liuotettiin 60 μ l:aan TEN.
 Tämä liuos saatettiin agarosigeelielektroforeesiin.
 Elektroforeesin jälkeen eristettiin 1 264 emäsparin DNA-seg-
 mentti (g) (2 μ g 80 μ l:ssa TEN).

iii) DNA-segmentti (h)
 20 Saatiin synteettinen oligonukleotidi, jolla oli seu-
 raava sekvenssi:

5' AGCTTATGGCTGAGATCACCAG 3'
 ATACCGACTCTAGTGGTCCTAG 5'

25 iv) DNA-segmenttien (f), (g) ja (h) liitöntä
 Seos, joka sisälsi DNA-segmenttiä (f) (0,68 μ g
 10 μ l:ssa TEN), -segmenttiä (g) (0,25 μ g 10 μ l:ssa TEN),
 ja -segmenttiä (h) (0,046 μ g 10 μ l:ssa TEN) saatettiin
 30 liitettäväksi käyttäen T₄-DNA-ligaasia (1,8 U, 2 μ l:ssa
 TEN) ja liitöntäpuskuria (4 μ l) plus ATP (6 mM, 4 μ l TEN).
 Liitetty seka-DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin
 50 μ l:aan TEN:

v) Transformointi
 35 20 mikrolitraa edellä saatua liitöntäreaktioseosta
 käytettiin transformoimaan E. coli C600:n kelpollisia

- soluja. Saatiin 8 ampisilliiniresistenttiä tranformanttia, määritettynä restriktioentsyymianalyysillä, neljän näistä transformanteista havaittiin sisältävän pCR701. Tämä E. coli C600 $r_k^- m_k^-$ (pCR701) -kanta talletettiin kokoelmaan FRI
- 5 FERM BP 264:nä.

Esimerkki 7

Prokymosiinin ekspressoiminen E. coli:ssa

- E. coli -kantaa, joka sisälsi pCR501, pCR601 tai pCR701, viljeltiin alustavasti LB:ssa 37°C:ssa yli yön.
- 10 1 ml viljelylientä siirrettiin sitten M9-elatusaineeseen (10 ml) ja viljeltiin yksi tunti. Viljelyä jatkettiin 37°C:ssa vielä 3-4 tuntia sen jälkeen kun alustaan oli lisätty 3-beta-indolyyliakryylihappoa (15 mg/l). Solut koottiin talteen linkoamalla kierrosluvulla 15 000 kierr./min. n. 15 mi-
- 15 nuuttia ja suspendoitiin 3 ml:aan PBS-puskuria (150 mM NaCl 20 mM natriumfosfaattipuskurissa, pH 7,0), joka sisältää 1 mM PMSF (fenyylimetyylisulfonyylifluoridia). Tähän suspensioon lisättiin 60 μ l 250 mM EDTA ja 30 μ l lysesyyimiä (10 ml/l) ja seosta pidettiin 0°C:ssa puoli tuntia.
- 20 Syntyneet sferoplastit hajotettiin äänikäsittelyllä ja tähän lisättiin 3,09 ml 8 M ureaa. Solulysaattiseosta inkuboitiin 37°C:ssa yksi tunti. Linkoamisen jälkeen nopeudella 3 000 kierr./min. puoli tuntia sakan päällä olevaa nestettä dialysoitiin PBS vastaan. Dialysaatti saatettiin sitovaan kil-
- 25 pailevaan radioimmunoanalyyysiin (ks. Nishimori et al., Gene). Radioimmunoanalyyysillä prokymosiini immunosaostettiin ja radioaktiivisen aineen (125 I) määrä mitattiin gammasädelaskimella. Sillä välin valmistettiin kalibrointikäyriä vaihtelemalla autenttisen prokymosiinin väkevyyttä. Vertai-
- 30 lemalla immunosaostetun prokymosiinin laskulukemaa kalibrointikäyrien kanssa määritettiin prokymosiinin määrä soluly-saatissa. Tämä koe osoitti, että prokymosiinin ekspressoimistaso oli korkein viljelyliemellä, jossa oli E. coli, joka sisälsi pCR501 (n. 300 000 molekyyliä isäntäsolua kohti)
- 35 ja alin liemellä, jossa oli E. coli, joka sisälsi pCR701.

Edellä saatua äänikäsiteltyä soluvapaata uutetta käsiteltiin itsenäisesti 4M urealla. Linkoamisen jälkeen sakan päällä oleva liuos saatettiin SDS-polyakryyliamidigeelelektroforeesiin ja kulkeutuneet proteiinit siirrettiin siten mikroselluloosasuodattimiin. Nämä suodattimet analysoitiin autoradiografialla, kuten edellä Nishimori'n et al., Gene-julkaisussa on selostettu. Jokaiselle bakteeriuutteelle havaittiin selvästi erottuva nauha, joka vastaa prokymosiinin nauhaa. Vertaamalla näiden nauhojen tiheyttä määritettiin, että E. coli, joka sisälsi plasmidia pCR501, tuotti n. 300 000 prokymosiinimolekyyliä solua kohti. Jokaisen ekspressoointiplasmidia sisältävän isäntäsolun kyvyn tuottaa prokymosiinia arvioitiin olevan järjestyksessä pCR501 $\geq$ pCR601 > pCR701. Tämä pääsuunta on hyvin sopusoinnussa tulosten kanssa radioimmunoanalyysimenetelmästä.

Bakteeri-prokymosiinin renaturoiminen ja aktivoiminen ja maidon juoksuttamisaktiivisuus

Plasmidia sisältävien bakteerien kokonais-sonikaatteja käsiteltiin 8M urealla ja dialysoitiin 25 mM natriumbikarbonaattia (pH 10,0) vastaan urean poistamiseksi. Toisen dialyysin jälkeen 50 mM Tris-HCl-puskuria (pH 7,5) vastaan dialyysaatit aktivoitiin lisäämällä 0,4 M glysiiniä (pH 2,3) ja pitämällä liuos huoneen lämpötilassa 15 minuuttia.

Jokaisen bakteeriuutteen maidonjuoksutusaktiivisuus testattiin Foltman'in menetelmän mukaisesti (B. Foltman, Prochymosin and Chymosin Methods in Enzymology, 19, 42 (1972)). Tässä testissä maidon juoksutusaktiivisuus 10 ml:n kuorittua maitoa koaguloimiseksi 100 sekunnissa 30^o:ssa määritetään yhdeksi kymosiiniyksiköksi (CU). Jokaiselle bakteeriuutteelle, joka oli johdettu ekspressoointiplasmideista, mitattiin maidon juoksutusaktiivisuus näin tuotetun (nimitäin bakteeri-prokymosiinin muuttaminen kymosiiniksi) prokymosiinin aktivoimisen jälkeen; aktiivisuus pCR501:lle oli 9,3 CU/mg ja 3,7 CU/mg pCR701:lle. On todettava, että

bakteeriuute, jossa ei ollut ekspresointiplasmidia, ei antanut minkäänlaista maidon juoksutusaktiivisuutta määritettynä edellä esitetyillä testimenetelmillä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä prokymosiinia koodaavan geenin ekspressoimiseksi *E. coli* -isäntäsoluissa, t u n n e t t u
5 siitä, että yhdistelmäplasmidi pCR501, pCR601 tai pCR701, joilla on kuviossa 3 esitetyt restriktiokartat, viedään isäntäsoluihin transformoimalla.

2. Ekspressointiplasmidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää prokymosiinia koodaavan geenin ja vektorin, joka on operatiivisesti liitetty siihen ja joka on alunperin johdettu plasmidista pBR322 ja sisältää *E. coli* trp-operonipromoottorin ja translaation aloituskodonin, joka ekspressointiplasmidi on pCR501, pCR601 tai pCR701, joilla on kuviossa 3 esitetyt restriktiokartat.

3. Menetelmä plasmidin pTRE1 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

(1) uutetaan osittain pOCT2, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, EcoRI:lla EcoRI-kohdan leikkaamiseksi lähempänä Ap^r -geeni-osaa;

(2) korjataan leikatut yksisäikeiset DNA-osat DNA-polymeraasin avulla; ja

(3) yhdistetään korjatut leikatut päät yhteen ligatoimalla käyttäen T_4 DNA-ligaasia.

4. Menetelmä plasmidin pTRL1 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

(a) uutetaan pOCT2, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, EcoRI:lla ja osittain RsaI:lla suoran DNA-segmentin tuottamiseksi, jossa on 360 emäsparia;

(b) siihen liitetään kinasoitu EcoRI-liittäjä, mitä seuraa uuttaminen EcoRI:lla DNA-segmentin (1) tuottamiseksi;

(c) uutetaan plasmidia pBR322 EcoRI:lla, mitä seuraa käsittely MATE BAP:lla DNA-segmentin (2) tuottamiseksi; ja

(d) liitetään DNA-segmentit (1) ja (2) T_4 DNA-li-

gaasin avulla.

5. Menetelmä plasmidin pTRP1 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa

5 (a) uutetaan plasmidia pTRE1, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, HpaI:lla ja ClaI:lla peräkkäin antamaan DNA-segmentti (3), jossa on noin 4640 emäsparia;

(b) uutetaan pTRE1:tä, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, HpaI:lla ja TaqI:lla peräkkäin antamaan DNA-segmentti (4), jossa on 32 emäsparia; ja

10 (c) liitetään DNA-segmentit (3) ja (4) T_4 DNA-liigaasin avulla.

6. Menetelmä plasmidin pCR501 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

15 (a) uutetaan plasmidia pTRE1, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, EcoRI:lla ja S1:llä peräkkäin antamaan suora DNA-segmentti, jolla on tylpät päät;

(b) siihen liitetään EcoRI-liittäjä, mitä seuraa uutto EcoRI:lla ja SalI:lla antamaan suora DNA-segmentti (a), jossa on noin 4210 emäsparia;

(c) uutetaan pCR301:tä, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, KpnI:lla ja EcoRI:lla peräkkäin antamaan suora DNA-segmentti (b), jossa on 246 emäsparia;

25 (d) uutetaan itsenäisesti pCR301:tä, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, KpnI:lla plus SalI:lla antamaan DNA-segmentti (c), jossa on 1025 emäsparia; ja

(e) liitetään DNA-segmentit (a), (b) ja (c) yhteen T_4 DNA-liigaasin avulla.

30 7. Menetelmä plasmidin pCR601 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

(a) uutetaan plasmidia pTRE1, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, HpaI:lla ja SalI:lla peräkkäin antamaan suora DNA-segmentti (d), jossa on 4010 emäsparia;

35

(b) uutetaan plasmidia pTRL1, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, HpaI:lla ja EcoRI:lla peräkkäin antamaan suora DNA-segmentti (e), jossa on 56 emäsparia;

5 (c) uutetaan plasmidia pCR301, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, KpnI:lla plus EcoRI:lla ja vastaavasti KpnI:lla plus SalI:lla antamaan DNA-segmentti (b), jossa on 246 emäsparia, ja segmentti (c), jossa on 1025 emäsparia, ja

10 (d) liitetään DNA-segmentit (b), (c), (d) ja (e) yhteen T₄ DNA-ligaasin avulla.

8. Menetelmä plasmidin pCR701 valmistamiseksi, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, t u n - n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa

15 (a) uutetaan plasmidia pTRP1, jolla on kuviossa 2 esitetty restriktiokartta, HindIII:lla ja SalI:lla peräkkäin antamaan suora DNA-segmentti (f), jossa on 4050 emäsparia;

(b) uutetaan plasmidia pCR501, jolla on kuviossa 3 esitetty restriktiokartta, SalI:lla ja osittain BamHI:lla antamaan DNA-segmentti (g), jossa on 1264 emäsparia

(c) saadaan synteettinen oligonukleotidi [DNA-segmentti (h)], jolla on nukleotidisekvenssi:

25 5' AGCTTATGGCTGAGATCACCAG 3'
ATACCGACTCTAGTGGTCCTAG5'
3'

ja

30 (d) liitetään DNA-segmentit (f), (g) ja (h) yhteen T₄ DNA-ligaasin avulla.

9. Menetelmä prokymosiinin tuottamiseksi ekspressoimalla prokymosiinia koodaavaa geeniä E. coli -isäntäsoluissa, t u n n e t t u siitä, että isäntäsoluja, jotka on transformoitu plasmidilla pCR501, pCR601 tai pCR701, joilla on kuviossa 3 esitetyt restriktiokartat, viljellään elatusaineessa.

Patentkrav

1. Förfarande för expressering av en prokymosin
kodande gen i E. coli-värdceller, k ä n n e t e c k -
5 n a t därav, att expressionsplasmiden pCR501, pCR601 el-
ler pCR701 med restriktionskartorna som visas i figur 3,
införs i värdcellerna genom transformering.

2. Expressionsplasmid, k ä n n e t e c k n a d
därav, att den innehåller en prokymosin kodande gen och
10 en vektor ansluten operativt därtill, varvid vektorn ur-
sprungligen härletts från plasmiden pBR322 och innehåller
E. coli trp-operonpromotorn och en initiatorkodon för
translation, vilken expressionsplasmid är pCR501, pCR601
eller pCR701 med restriktionskartorna som visas i figur
15 3.

3. Förfarande för framställning av plasmiden pTRE1
med restriktionskartan som visas i figur 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar stegen, där
(1) pOCT2 med restriktionskartan som visas i figur 2
20 delvis extraheras med EcoRI för att klippa EcoRI-stället
närmare Ap^r-gendelen;
(2) de klippta ensträngade DNA-delarna repareras medelst
DNA-polymeras; och
(3) de reparerade klippta ändorna sammanfogas genom liga-
25 tion under användning av T₄ DNA-ligas.

4. Förfarande för framställning av plasmiden pTRL
1 med restriktionskartan som visas i figur 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar stegen, där;
(a) pOCT2 med extraktionskartan som visas i figur 2
30 extraheras med EcoRI och delvis med RsaI för att produ-
cera ett lineärt DNA-segment med 360 baspar;
(b) till det anslutes den kinaserade EcoRI-sammanlänkaren
varefter följer extrahering med EcoRI för att framställa
DNA-segmentet (1);
35 (c) plasmiden pBR322 extraheras med EcoRI, varefter föl-
jer behandling med MATE BAP för att producera DNA-seg-

mentet (2); och

(d) DNA-segmenten (1) och (2) sammanfogas med hjälp av T_4 DNA-ligas.

5 5. Förfarande för framställning av plasmiden pTRP1
med restriktionskartan som visas i figur 2, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det omfattar stegen, där:
(a) plasmiden pTRE1 med restriktionskartan som visas i
figur 2 extraheras med HpaI och ClaI i följd för att
framställa DNA-segmentet (3) med ca 4640 baspar;
10 (b) pTRE1 med restriktionskartan som visas i figur 2
extraheras med HpaI och TaqI i följd för att producera
DNA-segmentet (4) med 32 baspar; och
(c) DNA-segmenten (3) och (4) sammanfogas medelst T_4 DNA-
ligas.

15 6. Förfarande för framställning av plasmiden
pCR501 med restriktionskartan som visas i figur 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar stegen,
där:
(a) plasmiden pTRE1 med restriktionskartan som visas i
20 figur 2 extraheras med EcoRI och S1 i följd för att pro-
ducera ett lineärt DNA-segment med trubbiga ändor;
(b) EcoRI-sammanlänkaren anslutes därtill, varefter föl-
jer extrahering med EcoRI och SalI för att framställa det
lineära DNA-segmentet (a) med ca 4210 baspar;
25 (c) pCR301 med restriktionskartan som visas i figur 3
extraheras med KpnI och EcoRI i följd för att producera
det lineära DNA-segmentet (b) med 246 baspar;
(d) pCR301 med restriktionskartan som visas i figur 3
extraheras självständigt med KpnI plus SalI för att fram-
30 ställa DNA-segmentet (c) med 1025 baspar; och
(e) DNA-segmenten (a), (b) och (c) sammanfogas medelst T_4
DNA-ligas.

7. Förfarande för framställning av plasmiden
pCR601 med restriktionskartan som visas i figur 3,
35 k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar stegen,
där

(a) plasmiden pTRE1 med restriktionskartan som visas i figur 2 extraheras med HpaI och SalI i följd för att producera det lineära DNA-segmentet (d) med 4010 baspar;
 (b) plasmiden pTRL1 med restriktionskartan som visas i
 5 figur 2 extraheras med HpaI och EcoRI i följd för att producera det lineära DNA-segmentet (e) med 56 baspar;
 (c) plasmiden pCR301 med restriktionskartan som visas i figur 3 extraheras med KpnI plus EcoRI, respektive med KpnI plus SalI för att producera DNA-segmentet (b) med
 10 246 baspar och segmentet (c) med 1025 baspar; och
 (d) DNA-segmenten (b), (c), (d) och (e) sammanfogas medelst T_4 DNA-ligas.

8. Förfarande för framställning av plasmiden pCR701 med restriktionskartan som visas i figur 3,
 15 k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar stegen, där:

(a) plasmiden pTRP1 med restriktionskartan som visas i figur 2 extraheras med HindIII och SalI i följd för att producera det lineära DNA-segmentet (f) med 4050 baspar;
 20 (b) plasmiden pCR501 med restriktionskartan som visas i figur 3 extraheras med SalI och delvis med BamHI för att producera DNA-segmentet (g) med 1264 baspar;
 (c) det erhålls en syntetisk oligonukleotid [DNA-segmentet (h)] som har nukleotidsekvensen

25 3'
 5' AGCTTATGGCTGAGATCACCAG
 ATACCGACTCTAGTGGTCCTAG5'
 3'

och
 30 (d) DNA-segmenten (f), (g) och (h) sammanfogas medelst T_4 DNA-ligas.

9. Förfarande för framställning av prokymosin genom expressering av en prokymosin kodande gen i E. coli-värdceller, k ä n n e t e c k n a t därav, att
 35 man odlar värdceller, som transformerats med plasmiden pCR501, pCR601 eller pCR 701 med restriktionskartorna som visas i figur 3, i ett näringsmedium.

FIG. 1a

-20
 TGCTACTTGCTGCTTCGGCTCTCTCCAGGGC
 LeuLeuAlaValPheAlaLeuSerGlnGly

20 40 60 80 100
 GCTGAGATCACCGATCCCTCTGTACAAAGGCAAGTCTCTGAGGAAGCGCTGAAGAGCATGGGCTTCTGGAGGACTTCCTGCAGAAACAGCAGTATG
 AlaGluIleThrArgIleProLeuTyrLysGlyLysSerLeuArgLysAlaLeuLysGluHisGlyLeuLeuGluAspPheLeuGlnLysGlnGlnTyrG

120 140 160 180 200
 GCATCAGCAGCAAGTACTCCGGCTTCGGGGAGGTGGCCAGCGTGCCCTGACCAACTACCTGGATAGTCAGTACTTTGGGAAGATCTACCTCGGGACCC
 lyIleSerSerLysTyrSerGlyPheGlyGluValAlaSerValProLeuThrAsnTyrLeuAspSerGlnTyrPheGlyLysIleTyrLeuGlyThrP

220 240 260 280 300
 GCCCCAGGAGTTCACCGTGTGTTTGACACTGGCTCCTCTGACTTCTGGGTACCCCTCTATCTACTGCAAGAGCAATGCCTGCAAAACACCAGCGCTTC
 oProGlnGluPheThrValLeuPheAspThrGlySerSerAspPheTrpValProSerIleTyrCysLysSerAsnAlaCysLysAsnHisGlnArgPhe

320 340 360 380 400
 GACCCGAGAAAGTCGTCCACCTTCAGAACCTGGGCAAGCCCTGTCTATCCACTACGGGACAGGCAGCATGCAGGCATCCTGGGCTATGACACCGTCA
 AspProArgLysSerSerThrPheGlnAsnLeuGlyLysProLeuSerIleHisTyrGlyThrGlySerMetGlnGlyIleLeuGlyTyrAspThrValT

420 440 460 480 500
 CTGTCTCCAACATTGTGGACATCCAGCAGACAGTAGGCCTGAGCACCCAGGAGCCCGGGGACGTCTTCACCTATGCCGAAATTCGACGGGATCCTGGGGAT
 hrValSerAsnIleValAspIleGlnGlnThrValGlyLeuSerThrGlnGluProGlyAspValPheThrTyrAlaGluPheAspGlyIleLeuGlyMe

520 540 560 580 600
 GGCCTACCCCTCGCTCGCTCAGAGTACTCGATACCCGTGTTTGACAACATGATGAACAGGCACCTGGTGGCCCAAGACCTGTCTCGGTTTACATGGAC
 tAlaTyrProSerLeuAlaSerGluTyrSerIleProValPheAspAsnMetMetAsnArgHisLeuValAlaGlnAspLeuPheSerValTyrMetAsp

170 180 190 200

FIG. 1b

620	640	660	680	700
AGGAATGCCAGGAGCATGCTCACGCTGGGGGCCATCGACCCGTCCTACTACACAGGGTCCCTGCACCTGGGTGCCCGTGACAGTGCAGCAGTACTGGC				
ArgAsnGlyGlnGluSerMetLeuThrLeuGlyAlaIleAspProSerTyrTyrThrGlySerLeuHisTrpValProValThrValGlnGlnTyrTrpG				
(Asp)				
720	740	760	780	800
AGTTCACTGTGGACAGTGTACCATCAGCGGTGTGGTGTGGCCGTGTGAGGGTGGCTGTGAGCCATCCTGGACACGGGCACCTCCAAAGCTGGTCGGGCC				
InPheThrValAspSerValThrIleSerGlyValValValAlaCysGluGlyGlyCysGlnAlaIleLeuAspThrGlyThrSerLysLeuValGlyPr				
820	840	860	880	900
CAGCAGCGACATCCTCAACATCCAGCAGGCCATTGGAGCCACACAGAACCAAGTACGATGAGTTTGACATCGACTGCGACAACCTGAGCTACATGCCCACT				
oSerSerAspIleLeuAsnIleGlnGlnAlaIleGlyAlaThrGlnAsnGlnTyrAspGluPheAspIleAspCysAspAsnLeuSerTyrMetProThr				
920	940	960	980	1000
GTGGTCTTTGAGATCAATGGCAAAATGTACCCACTGACCCCTCCGCCTATACCAAGCCCAAGACCCAGGGCTTCTGTACCAGTGGCTTCCAGAGTGAAATC				
ValValPheGluIleAsnGlyLysMetTyrProLeuThrProSerAlaTyrThrSerGlnAspGlnGlyPheCysThrSerGlyPheGlnSerGluAsnH				
1020	1040	1060	1080	1100
ATTCAGAAATGGATCCTGGGGATGTTTTCATCCGAGAGTATTACAGCGTCTTTGACAGGGCCCAACAACCTCGTGGGGCTGGCCAAAACCATCTGATC				
IsSerGlnLysTrpIleLeuGlyAspValPheIleArgGluTyrTyrSerValPheAspArgAlaAsnAsnLeuValGlyLeuAlaLysThrIle *				
1120	1140	1160	1180	1200
ACATCGCTGACCAAGAACCTCACTGTCCCCACACACCTGCACACACATGCATGAGCACATGTGCACACACACAGATGAGGTTTCCAGA				
1220	1240			
CAGATGATTCCTCAATAAACGTTGCTCTTCGCAAAAAA				

88
66
88
88
66

FIG. 2

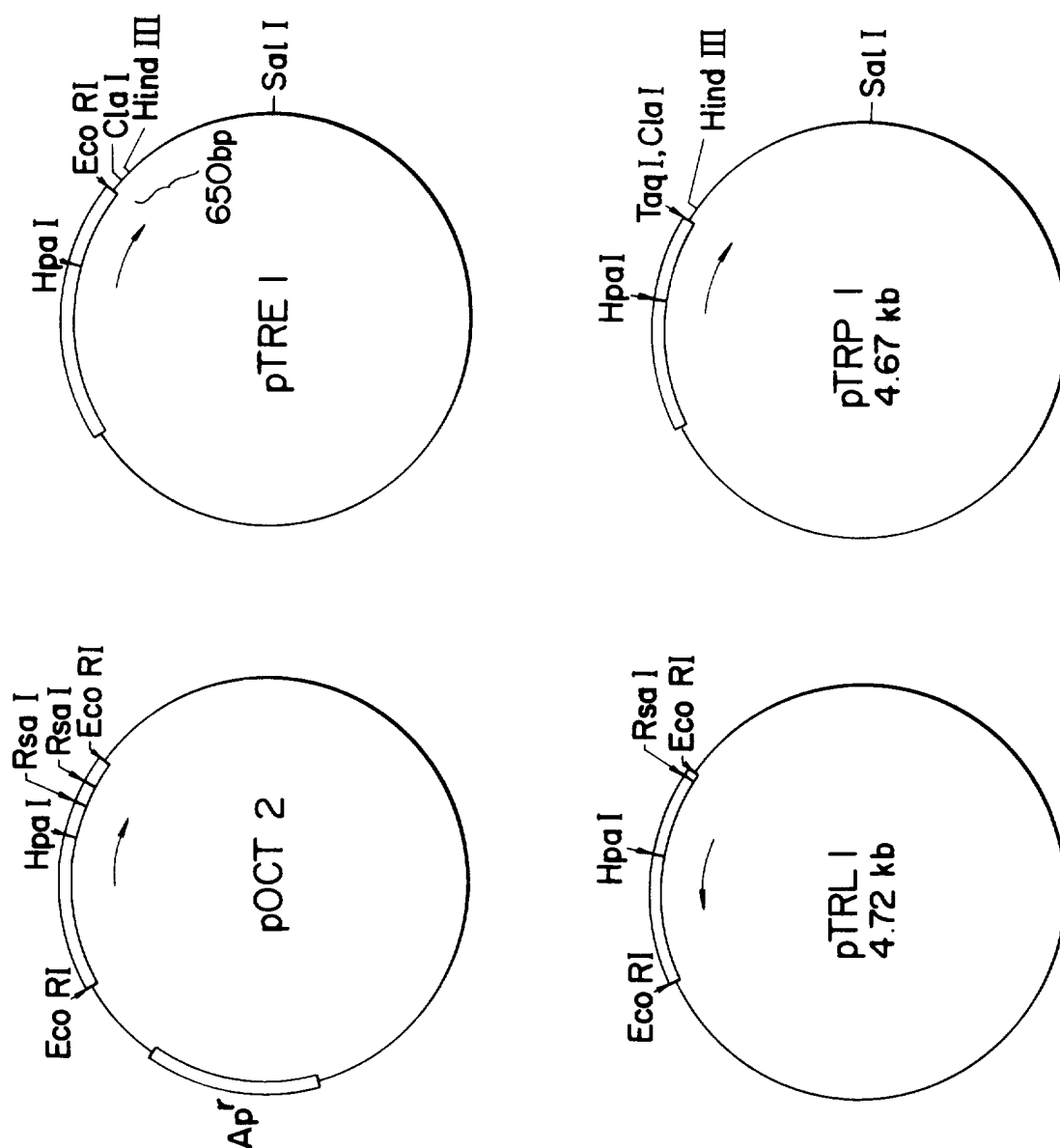


FIG. 3

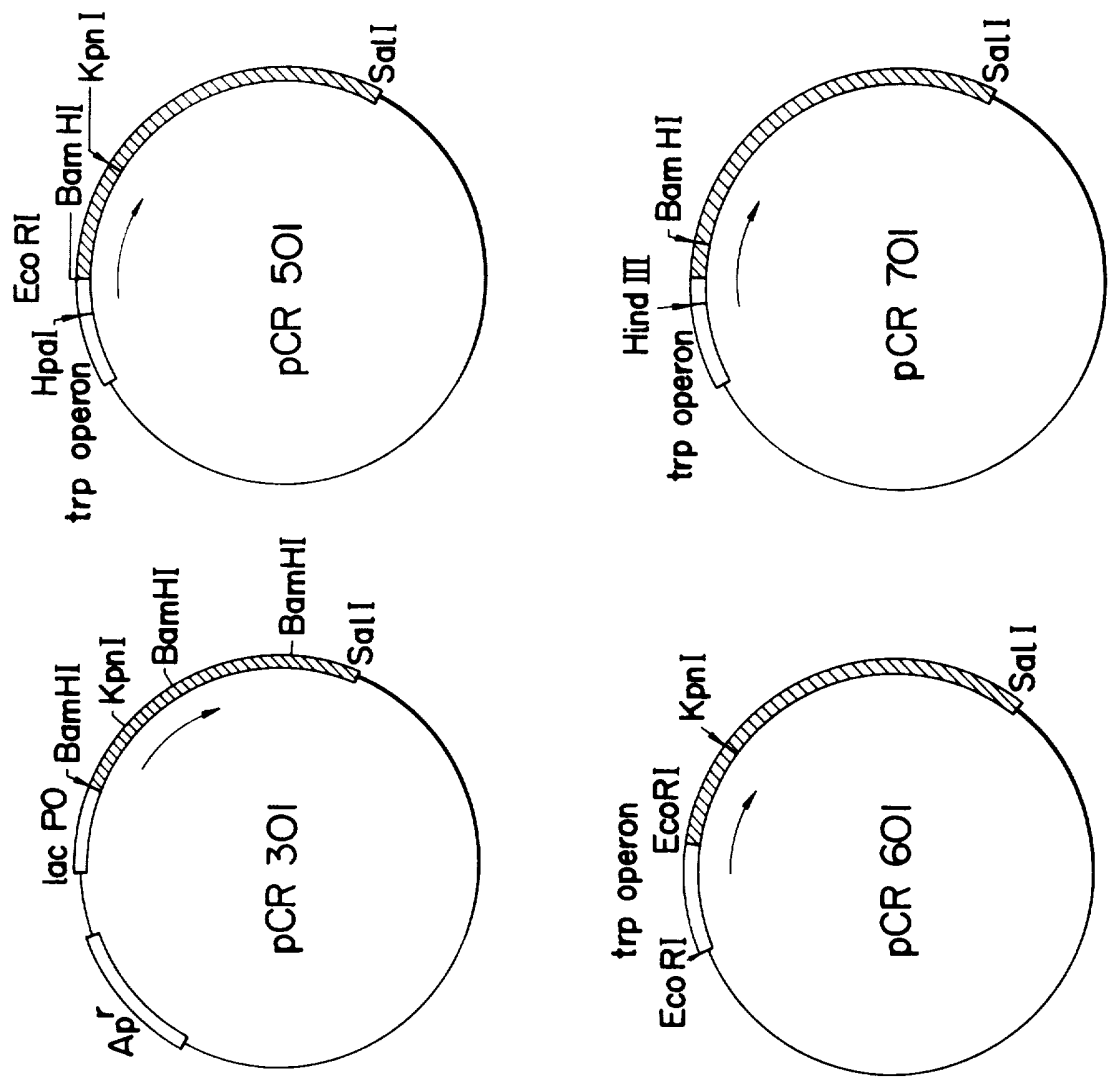


FIG. 4

5' CTCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTGCGCCGA
CATCATAACGGTTCTGGCAAATATTCTGAAATGAGCTGTTGA
CAATTAATCATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAAGTTCACGT
Trp L AAAAAGGGTATCGACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAAGG
SD
TTGGTGGCGCACTTCCTGAAACGGGCAGTGTATTCACCATGC
GTAAAGCAATCAGATACCCAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTT
Trp E TTTTGAACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAACACAAAAC
EcoRI SD
CGACTGGAATTCTC 3'

FIG. 5

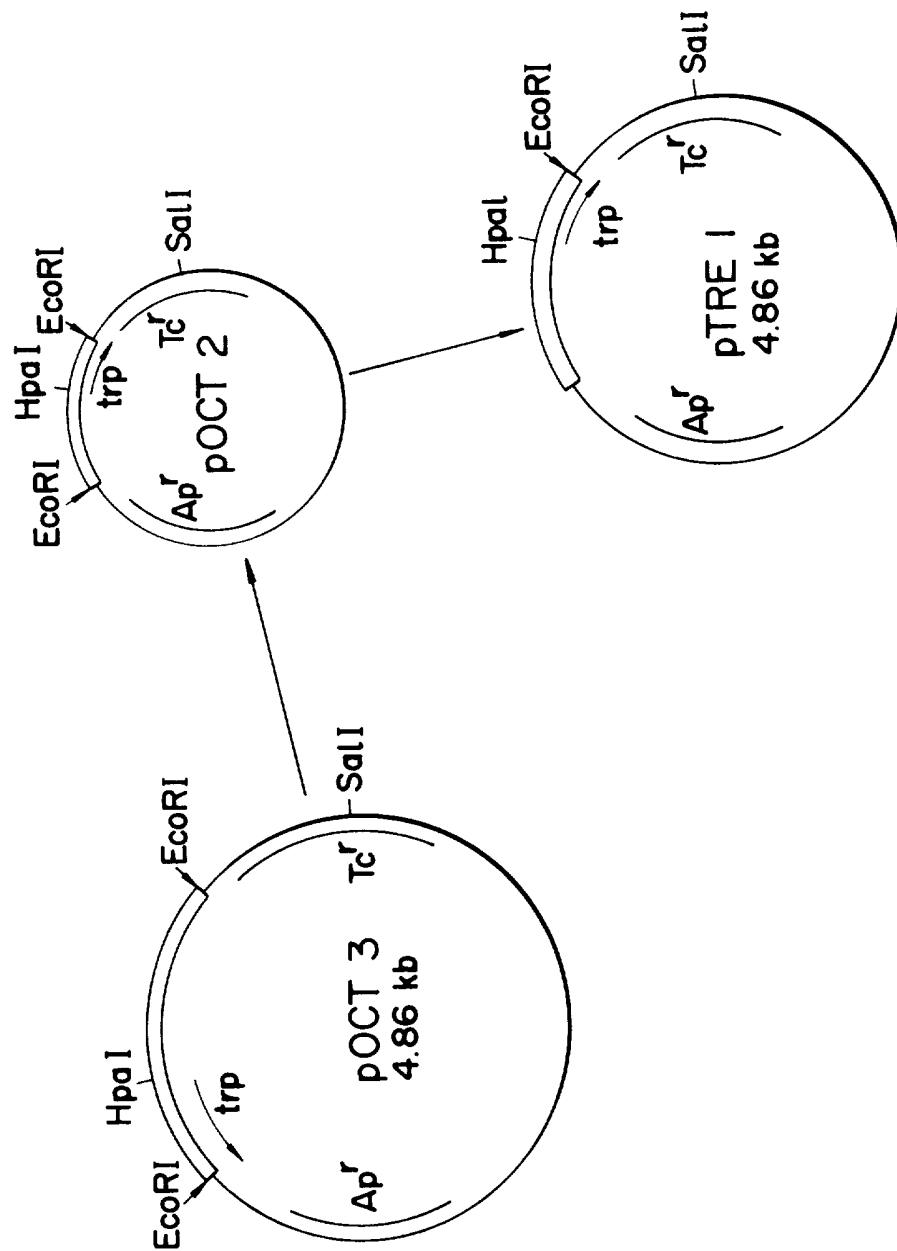


FIG. 6

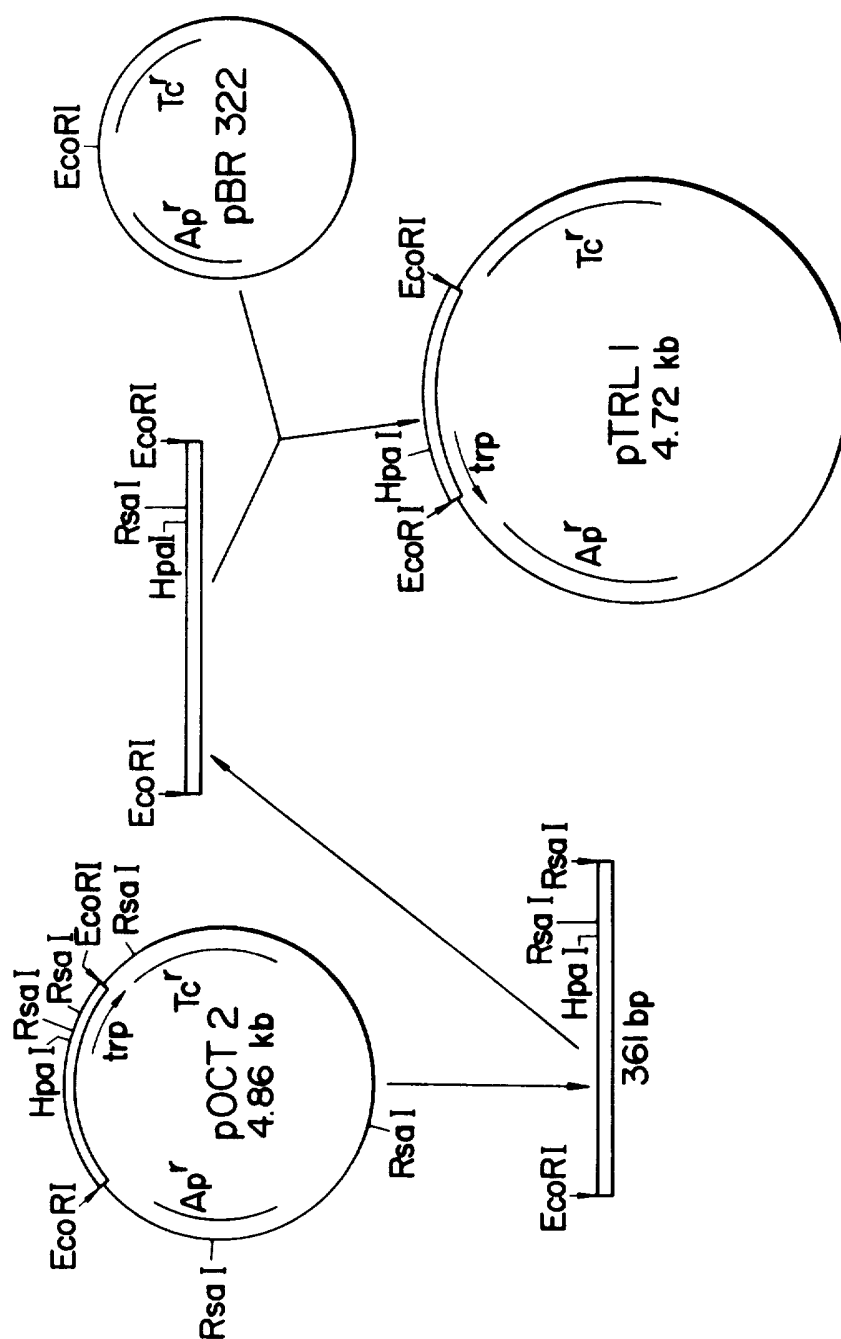


FIG. 7

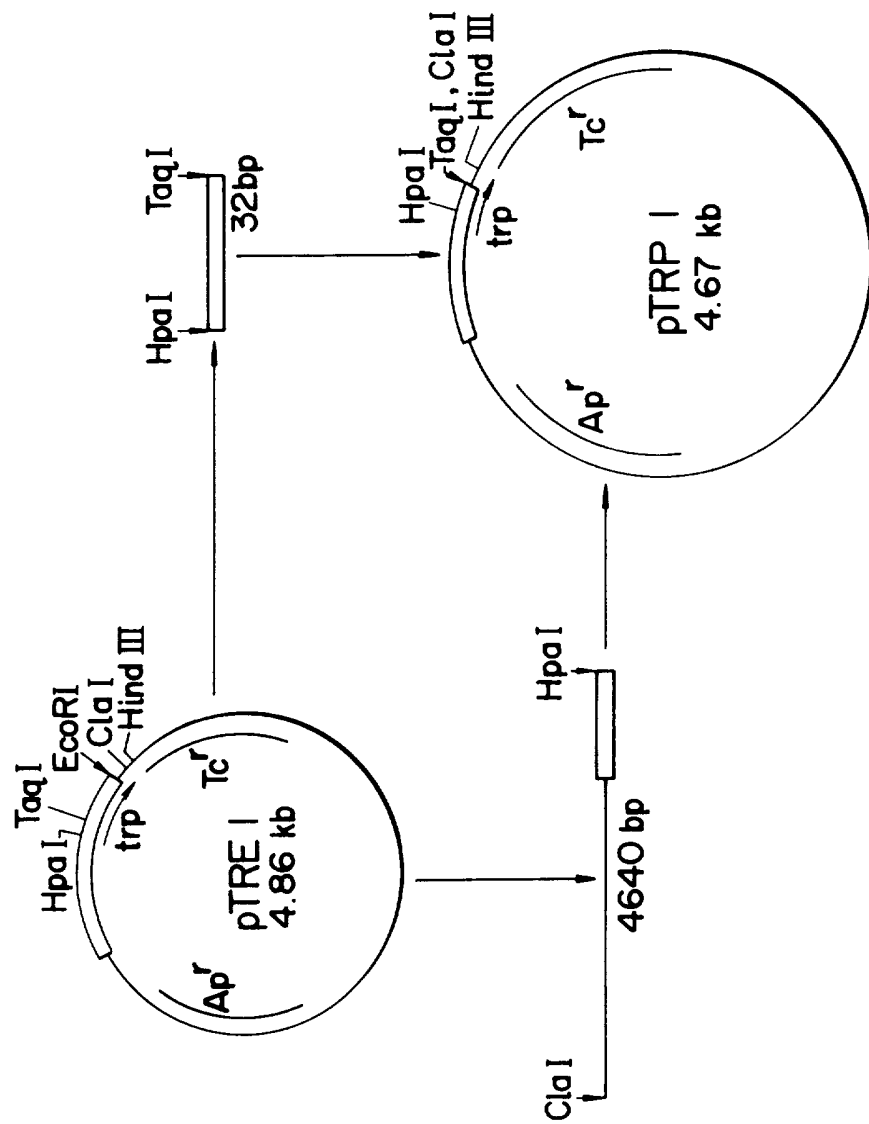


FIG. 8

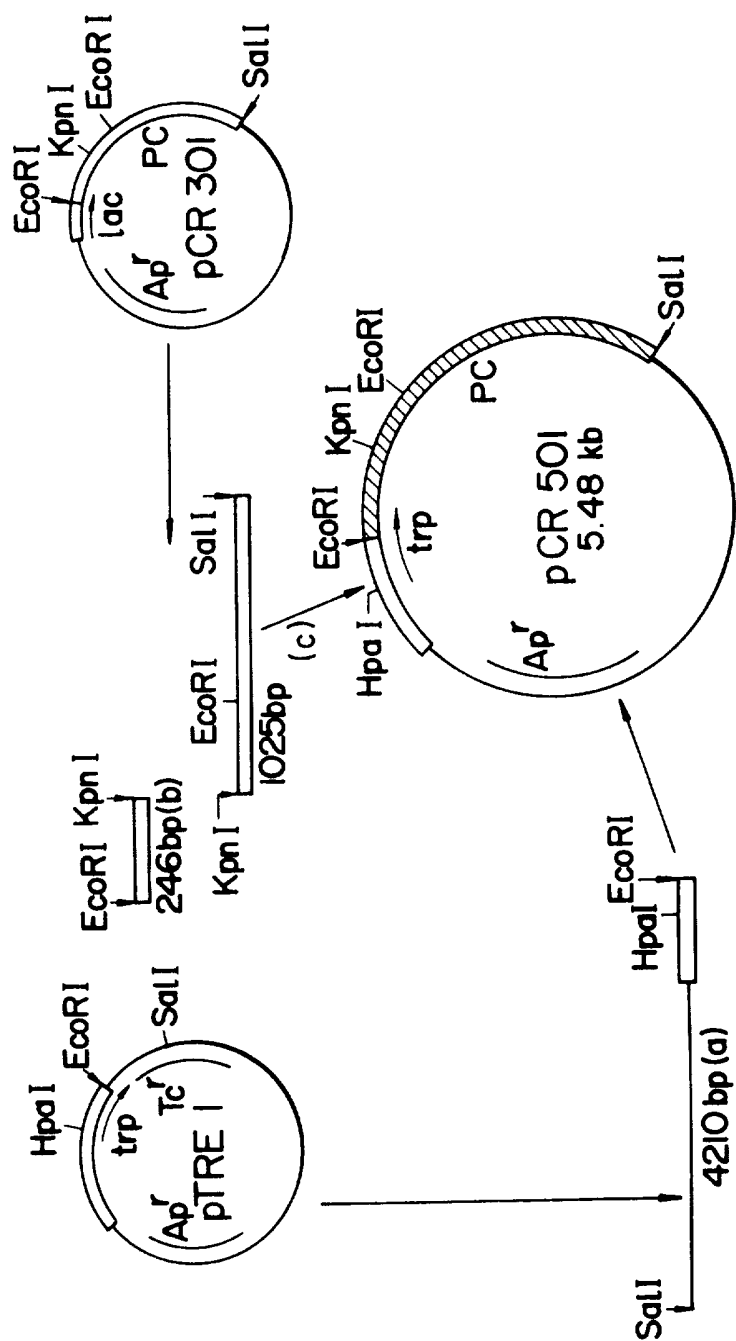


FIG. 9

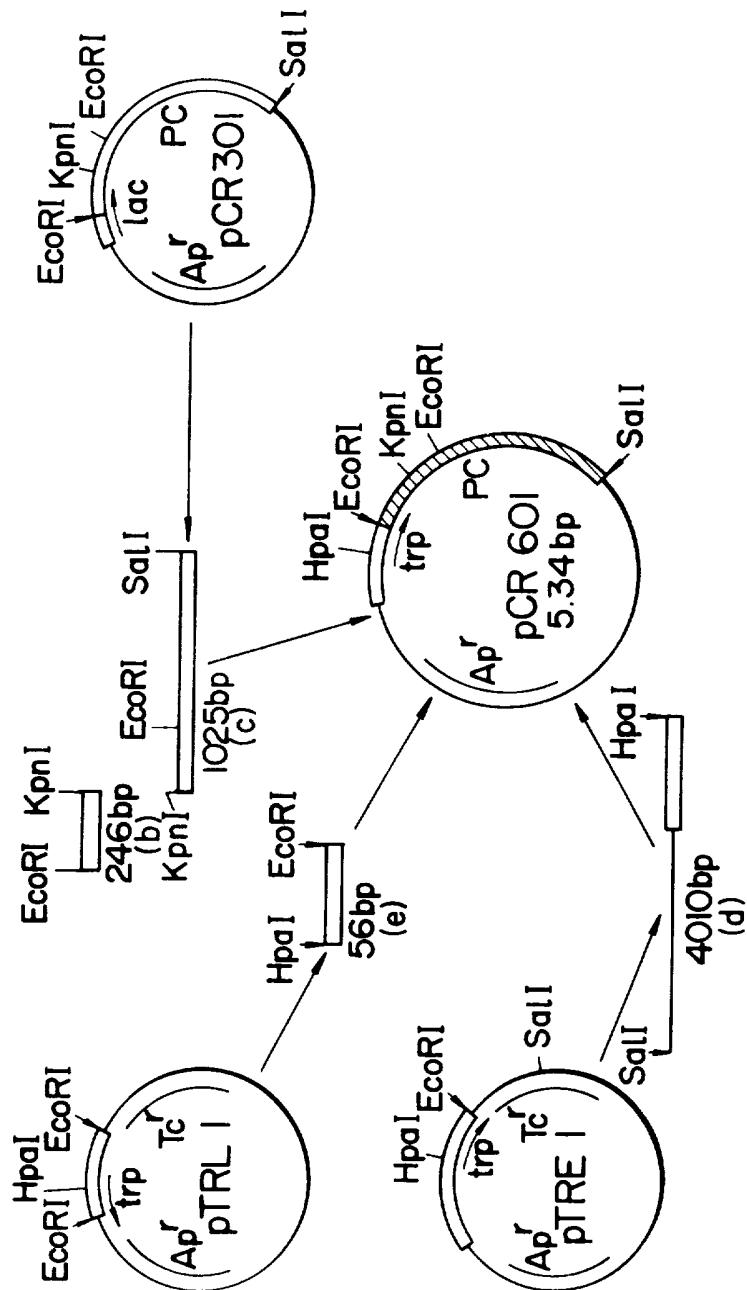


FIG. 10

