

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 832086 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 832086

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 09.06.1983

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 09.06.1983

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 12.12.1983

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

11.06.1982 DE P_3222142.8 15.04.1983 DE P_3313643.2

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Winnacker, Ernst-Ludwig, BRD, SAKSA, (DE)

2 •Esser, Karl, BRD, SAKSA, (DE)

3 •Präve, Paul, BRD, SAKSA, (DE)

4 •Stahl, Ulf, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

5 •Marquardt, Rydiger, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

6 •Wöhner, Gerhard, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä obligatorisesti metyloτροφισten, heterologista DNA:a ekspressoivien bakteereiden ja tätähän tarkoitukseen soveltuvien plasmidien ja heterologisten organismivalmistamiseksi.

Förfarande för framställning av obligatoriskt metylotrofa, heterologt DNA exprimerande bakterier och födetta ändamål lämpade plasmider och heterologa organismer.

Menetelmä obligatorisesti metyilotrofisten, heterologista ekspressoivien bakteereiden ja tähän tarkoitukseen soveltuvien plasmidien ja heterologisten valmistamiseksi

- 5 Keksintö koskee metyilotrofisten mikro-organismien gereettistä manipulaatiota, menetelmää erityisesti obligatorisesti metyilotrofisten bakteereiden, jotka ekspressoivat sisältämäänsä vieras-DNA:a, vieras-DNA:n sisäänvientiin käytettävien plasmidien ja isäntäorganismien valmistamiseksi. Eräälle keksinnönmukaiselle menetelmälle on ominaista, että
 - a) esitetään jostain obligatorisesti, metyilotrofisesta bakteerista peräisin oleva plasmidi,
 - b) tästä ja plasmidista, jossa on valintamarkkeri, valmistetaan hybridiplasmidi, jossa on obligatorisesti metyilotrofiselle bakteerille luonteenomainen replikoni,
 - c) tämä hybridiplasmidi tuodaan transformaation avulla isäntäorganismiin ja siellä lisätään sen kopiomäärää (amplifitseeseen),
 - d) valinnan jälkeen kloorit käsitellään luonteenomaiselle konjugatiivisella plasmidilla ja hybridiplasmidin siirrettävyysdefekti poistetaan,
 - e) näin saadut kloorit konjugoidaan obligatorisesti metyilotrofisten bakteereiden kanssa, jotka toimivat vastaanottajina ja
 - f) halutut kloorit valitaan.
- Menetelmän vaihteessa a) käytetty plasmidi eristetään etupäässä eräältä *Methylomonas*-lajin bakteerilta, erityisesti *Methylomonas clara*-lajilta. Erityisen edullinen on *Methylomonas clara*-kannalta saatu plasmidi pBE3, joka on jätetty saksalaiseen mikro-organismien kokoelmaan säilytettäväksi numerolla DSM 2397, samoinkuin vastaavat plasmidit, joissa on sama replikoni.
- Menetelmävaiheessa b) käytetty plasmidi, jossa on

valintamarkkerit, voi olla plasmidi pBR 322, jota kuvataan julkaisussa Gene 2 (1977) 95-113. Näin saatuja hybridiplas-mideja merkitään seuraavassa pRM_x:ksi.

5 Valintamarkerein varustetuksi plasmidiksi, jota voidaan käyttää menetelmävaiheessa

b) soveltuu myös hybridiplasmidi, joka sisältää geneettistä informaatiota insuliinin ekspressiota varten, kuten eurooppalaisessa patenttihakemuksessa O 032 675 kuvataan.

10 Menetelmävaiheen b) jälkeen saatu hybridiplasmidi viedään transformaation avulla sopivaan isäntäorganismiin, edullisesti *Escherichia coli*in, ja siellä lisätään plasmidin kopiomäärää (amplifizieren).

15 Menetelmävaiheessa d) viedään tähän isäntäorganismiin, joka sisältää hybridiplasmidin, sopiva konjugatiivinen plasmidi, edullisesti RP4. Lisäksi siirrettävyyden puuttuminen korjataan siirtämällä sopiva plasmidi, kuten esimerkiksi Col K ja Col V.

20 Näin valmistettu isäntäorganismi voi sitten menetelmävaiheessa e) siirtää menetelmävaiheessa c) siihen tuodun hybridiplasmidin konjugaation avulla pääasiallisesti plasmidittomalle, obligatorisesti metylo-trofiselle bakteerille, joka toimii vastaanottajana. Vastaanottajina edullisia ovat *Methylomonas*-suvun bakteerit, erityisesti 25 *Methylomonas clara*-laji, ennen kaikkea kanta ATCC 31 226. Tätä kantaa on kuvattu esimerkiksi saksalaisessa patenttiselityksessä 26 33 451 ja US-patenttiselityksessä 4 166 004.

30 Tämän jälkeen menetelmävaiheessa f) valitaan toivottu kloorit kasvattamalla mediumissa, joka hiilenlähteenä sisältää metanolia, ja valinta suoritetaan myös siirretyn resistenssin tai herkkyyden perusteella antibiootteja kohtaan. Näin saadut, obli-gaattiset, metylo-trofiset bakteerit kykenevät ekspressoimaan vieras- 35 DNA:a, siis esimerkiksi tuottamaan insuliinia.

Tämän menetelmän yksityiskohtia esitetään lähemmin esimerkkien puitteissa.

Keksintö koskee edelleen edellä mainitun menetelmän muunnosta, jolla menetelmävaiheet d) ja e) yksinkertaistetaan seuraavasti.

Vaiheessa d) valinnan jälkeen hydridiplasmidi eristetään, ja vaiheessa e) eristetty plasmidi siirretään transformaation avulla obligatorisesti metyloτροφisen bakteerin sferoplasteihin.

Keksintö koskee niin ollen myös metyloτροφisista bakteereista peräisin olevia sferoplasteja, ennen kaikkea sferoplasteja, jotka ovat peräisin *Methylomonas* - suvun bakteereista, etupäässä *Methylomonas clara*-lajilta. Erityisen edullinen on *Methylomonas-clara* ATCC 31226 kanta.

Keksinnönmukaisia sferoplasteja voidaan valmistaa siten, että bakteerit kasvatetaan glysiiniä runsaasti sisältävässä elatusaineessa, joka sisältää osmoottisen stabilisaattorin. Etupäässä on tämä elatusaine heikosti hypotoninen. Tämän valmistusmenetelmän muita edullisia muotoja valaistaan lähemmin seuraavassa.

Keksintö koskee edelleen uusien sferoplastien käyttöä vieraan DNA:n tuomiseksi näihin bakteereihin. Ulkopuolinen DNA tuodaan ensi sijassa plasmidin muodossa. Plasmideina tulevat kysymykseen yllä mainitut hydridiplasmidit.

Sferoplastien muodostamiseksi kasvatetaan metyloτροφisia bakteereita jossain sopivassa elatusaineessa, edullisesti jossain minimaalisessa elatusaineessa, sopivaan solutiheyteen saakka. Sopivat solutiheydet ovat $OD_{600:n}$ alueella, joka on etupäässä 0,5 - 1,8, erityisesti 0,9 - 1,4. Näiden viljelmien määritetty määrä siirretään sitten, noin 5-kertaiseen määrään mainittua elatusainetta, joka sisältää lisäksi runsaasti glysiiniä ja osmoottisen stabilisaattorin. Glysiinin määrä voi olla aina kyllästyskonsentraatioon saakka, edullinen on 2-4 paino-%:n määrä.

Osmoottisina stabilisaattoreina tulevat kysymykseen sokerit, kuten sakkaroosi, sokerialkoholit, kuten sor-

biitti, ja polyglykolit, kuten polyetyleeniglykoli 6000. Elatusaine on etupäässä heikosti hypotoimista, mikä säädetään osmoottisen stabilisaattorin sopivan konsentraation avulla. Esimerkiksi 10 paino-%:n sakka-
 5 roosikonsentraatio tai yksimolaarinen sorbiitti on sopiva.

Bakteereita ravistellaan tässä elatusaineessa niin kauan, kunnes faasi-kontrasti -mikroskropissa ei oleellisesti ole havaittavissa yhtään sauvanmuotoisia, mety-
 10 lotrofisia bakteereita. Yleensä voidaan 37°C:ssa suoritettun yhden tunnin pituisen ravistelua jälkeen (100 - 180 kierrosta minuutissa) havaita sferoplastien muodostumien liikkumattomina, pallomaisina rakenteina. Tämä tapahtuma päättyy yleensä noin 4 tunnin kuluttua.

15 Muodostuneet sferoplastit poistetaan varovasti sentrifugoimalla, esimerkiksi 4°C:ssa, 10 minuutin ajan, 2600 g:llä, ja ne lietetään uudelleen sopiviin elatusaineisiin. Sferoplastien stabiloimiseksi tämä uudelleensuspendointiväliaine sisältää myös osmoottisen
 20 stabilisaattorin sopivana konsentraationa, esimerkiksi 15 paino-%:a polyetyleeniglykolia, jonka molekyylipaino on 6000.

Tämä suspensio sekoitetaan likimääräisessä tilavuussuhteessa 5:1 seoksen kanssa, joka sisältää yhtä
 25 paljon sferoplastien uudelleensuspendointiin käytettyä elatusainetta sekä kantajaan siirrettävää DNA:a jossain sopivassa puskurissa. DNA-kantajana-kuten edellä on esitetty - ensisijassa tulee kysymykseen hybridiplasmidi. Tähän tarkoitukseen sopiva puskuri koostuu vesiliuok-
 30 sesta, joka sisältää litraa kohti 10 mmoolia Tris:iä (Tris-[hydroksimetyyli]-aminometaania) sekä 1 mmoolin natriumetyleenidiamiinitetra-asetaattia (TE-puskuria). Tähän liuokseen lisätään osmoottinen stabilisaattori (esimerkiksi kolminkertainen tilavuus sferoplastisuspen-
 35 siota 4 paino-%:na polyetyleeniglykoli 6000-liuoksessa,

ja sekoitetaan varovaisesti. Huoneenlämpötilassa suoritetaan lyhyen seisottamisen jälkeen lisätään noin 10-kertainen tilavuus sferoplastisuspensiota uudelleensuspendoimisväliaineessa, ja seos sentrifugoidaan varovasti (3600 g).

- 5 Saostuma otetaan sitten kaksinkertaiseen tilavuuteen sferoplastien suspensiota, joka on uudelleensuspendointi-
väliaineessa, ja sen seikan tutkimiseksi, onko trans-
formaatio tapahtunut, sivellään agar-levyille. Nämä agar-
levyt vastaavat koostumukseltaan uudelleensuspendointi-
10 väliainetta, ja ne sisältävät 1,5 paino-%:n suuruisen
Bacto-agar-määrän rinnalla vielä valintaan soveltuvan
antibiootin, esimerkiksi 50 ng/ml ampisilliiniä tai
10 ng/ml tetrasykliiniä, jos käytetyt hybridiplasmit
mahdollisesti sisältäisivät vastaavia resistanssigeenejä.
15 Levyjä ~~niku~~kuboidaan 37°C:ssa 1-3 päivää ja mainitussa
nestemäisessä elatusaineessa, joka sisältää sopivan
antibiootin suoritettun kasvatuksen jälkeen resitentit
pesäkkeet tutkitaan plasmidi-DNA:n olemassaolon suhteen
(Humpreys et al., BA 383 (1975) 457-463). Tällöin voi-
20 daan transformaatioon käytetyt plasmidit eristää mety-
lotrofisista bakteereista.

- Keksinnön kohteena ovat edelleen plasmidit, jotka
ovat peräisin *Methylomonas claran* kannasta DSM 2397,
jossa on ob~~l~~igatorisesti, metyilotrofiselle bakteerille
25 ominainen replikoni, siis plasmidit, jotka replikoituvat
Methylomonas-lajissa, etupäässä *Methylomonas* ^{cl}~~clara~~-lajissa,
erityisesti kannassa ATCC 31226, joissa on integroitu
prokaryoottisia tai enkaryoottisia DNA:ita, erityisesti
DNA:ita insuliinin ekspressiota varten.

- 30 Keksinnön kohteena ovat edelleen isäntäorganismit,
joissa on mainittuja plasmideja, samoinkuin isäntäorganismit,
jotka lisäksi sisältävät plasmideja siirrettävyydefektin
poistamiseksi. Edulliset isäntäorganismit sisältävät
kompigatiivisena plasmidina RP4:n ja siirrettävyydefektin
35 kumoamiseksi plasmidin Col K tai Col V. Keksinnön etu on

siinä, että käytetään obligatorisesti metyilotrofisen bakteerin plasmidin replikonia, siis hyvin kapealla isäntä-alueella. Keksinnön mukainen menetelmä osoittautuu täten erittäin varmasti soveltuvan rekombinantti DNA:han, joka
5 sisältää vastuullista informaatiota.

Keksintöä valaistaan lähemmin seuraavissa esimerkeissä. Prosenttiluvut tarkoittavat tällöin painoa, jollei muutoin ole mainittu.

Esimerkeissä käytetään seuraavia lyhennyksiä:

10 ATP = adenosiniin trifosfaatti

EDTA = etyleenidiamiini - tetraetikkahappo tai -asetaatti (Na)

OD₆₀₀ = optinen tiheys (optical density) 600 nm:ssä

15 TE = puskuri = vesiliuos, joka sisältää litraa kohti 10 mmoolia Tris-HCl:a, pH säädetty 8:aan, sekä 1 mmoolia EDTA:a, samoin pH säädetty 8,0:aan.

Tris (-HU) = Tris - hydroksimetyyli - aminome-
20 taani (-hydrokloridi)

Esimerkki 1

Plasmidin eristäminen M. clara DMS 2397:stä

Plasmidin eristäminen tapahtui oleellisesti Humhreys et al.:n menetelmän mukaan (BBA 383 (1975) 457-463). Tämän
25 lisäksi erotettiin bakteerit sentrifugoimalla 1 litrasta elatusainetta optisen tiheyden ollessa noin 1,0 ja bakteerisakka heitettiin uudelleen 5 ml:aan sakkaroosiliuosta (25 % sakkaroosia liuoksessa, jossa oli 50 mmoolia/l Tris-HCl:a, pH 8,0). Jäähdyttämällä samalla jäiden avulla
30 lisättiin 1 ml lysotsyymi-liuosta (5 mg/ml lysotsyymiä 250 ml/l Tris-HCl-liuoksessa, pH 8,0) sekä 2 ml 0,2 molaarista EDTa-liuosta pH 8,0. Välillä ravistellen inkuboitiin seosta niiden minuutin ajan jäiden päällä. Solujen hajoaminen saatiin aikaan lisäämällä 8 ml seosta, joka
35 muodostui 50 mM/l:ta Tris-HCl:a, 75,5 mM/l:sta EDTA:a ja

0,2%:sta ionisoitumatonta tensidiä (^(R) Triton X-100), pH 8,0. Erittäin viskoosista seosta sentrifugoitiin nopeudella 48000 g, jolloin kirkas hajoamistuote saatiin supernatanttina, 10 ml:aan supernatanttia lisättiin

5 1,1 ml 5 molaarista keittosuolaliuosta sekä 1,1 g polyetyleeniglykolia, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli 6000. Seosta inkuboitiin 4°C:ssa yli yön. Höytäleinen saostuma koottiin 5 minuuttisen. 1500 g:llä suoritetun sentrifugoinnin jälkeen ja liuotettiin 3,5 ml:aan puskuriliuosta (50 mmoolia/l Tris-HCl:a, 5 mmoolia/l EDTA:a,

10 50 mmoolia/l NaCl:a, pH 8,0), ja liuoksen tilavuus mitattiin. Sen jälkeen kun on lisätty 1g CsCl:a millilitraa kohti liuosta sekä 1/15 ml:a 1%:ista, veteen vahvistettua etidiumbromidi-liuosta, sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 16000 g:llä. Tästä sentrifugoinnista saatua supernatanttia sentrifugoitiin tasapainoon saakka (20 tunnin ajan 47000 kierroksella minuutissa, 18°C:ssa, vertikaalisessa roottorissa), ja siinä näkyi ilman UV-valolla suoritettua säteilytystä kaksi selvästi nähtävää, noin

20 senttimetrin päässä toisistaan sijaitsevaa vyöhykettä. Säteilystä UV-valolla, jonka aallonpituus oli 366 nm, saatiin esille fluoressoivat vyöhykkeet, ja alempi olasmidi-vyöhyke kerättiin pistämällä gradientin sivusta neulalla ja vetämällä vyöhyke tämän jälkeen ruiskuun.

25 Etidiumbromidi poistettiin ravistelemalla toistetusti CsCl:lla kyllästetyllä isopropanolilla. 3-kertaisen dialyysin jälkeen, joka suoritettiin 2 litraan tilavuutta vastaan TE-puskuria, kunkin dialyysin ollessa 2 tunnin mittaisen, plasmidi-DNA saatiin niin puhtaana, että sitä

30 voitiin käyttää seuraaviin menetelmävaiheisiin.

Jos DNA-liuoksessa oli vielä epäpuhtauksia, niin se uutettiin kaksi kertaa yhtä suurella tilavuudella fenolia, joka oli kyllästetty 0,1 molaarisella Tris-HCl-liuoksella,

35 pH 8,0 ja sitten 3 kertaa absoluuttisella eetterillä.

Ylimääräinen eetteri puhallettiin pois, liuos laimennettiin 1/9 tilavuudella 3 molaarista natriumasetaatti-liuosta. ja DNA saostettiin lisäämällä yhtä suuri tilavuus isopropanolia. Yli yön suoritettun seisottamisen jälkeen seosta sentrifugoitiin 30 minuutin ajan 12000 g:llä, ja DNA-saostuma pestiin 90 %:isella etanolilla. Tämän jälkeen DNA lyofilisoitiin ja otettiin TE-puskuriin.

Esimerkki 2

DNA:n eristäminen agarosista

Seuraavassa menetelmässä käytettiin Langridge et al.n (Analytical Biochemistry 103 (1980) 264-271) kuvaamaa metodia.

DNA siirrettiin vaakasuoralla 0,5 %:iselle agarosigeelille (alhaalla sulava agarosi, tyyppi VII, no A-4018, Sigma). Elektroforeesin jälkeen tehtiin vyöhykkeet näkyviksi etidiumbromidi-värjäyksen avulla, ja ne leikattiin geelistä. DNA:a sisältävät agarosi-suikaleet sulatettiin 70°C:ssa lasiputkessa, tilavuus mitattiin ja jäädytettiin 37°C:een. Tämän lisäksi lisättiin yhtä suuret tilavuudet jäljempänä kuvattuja butanoli- ja vesifaaseja.

150 ml n-butanolia ravistettiin erotussuppilossa 150 ml:n kanssa yettä, ja faasien erottamisen jälkeen liuotettiin 100 ml:ssa vedellä kyllästettyä butanoli-jaetta 1 g heksadekyyli-trimetyyliammoniumbromidia. Tätä liuosta ravitettiin 100 ml:n kanssa vesijaetta, jolloin voidaan lisätä vaahdonpoistoaine (50 µl Antifoam A, sigma). Yli yön tapahtuneen jakeiden erottumisen jälkeen otettiin nämä talteen erotettuina.

Näiden butanoli- ja vesijakeiden lisäyksen jälkeen saatua seosta sekoitettiin perusteellisesti kääntämällä putkea varovasti, ja jakeiden erottumista odotettiin 37°C:ssa. Ylempi, DNA:a sisältävä butanolijae erotettiin, ja jäljelle jäävä vesijae uutettiin vielä kaksi kertaa kuvatulla tavalla bitanolilla. Yhdistetyt butanolijakeet laimennettiin 1/4 tilavuudella 0,2-molaarista NaCl-liuosta, ja niitä

sekoitettiin perusteellisesti. Vesijakeen erottamisen jälkeen seurasi toistettu suolauutto, ja yhdistetyt vesijakeet laimennettiin pisaroittain yhtä suurelle tilavuudelle kloroformia (joka oli puhdistettu aluminiumoksidipylvään avulla). Jään päällä suoritettun puolituntisen seisot-

5 tamisen jälkeen alempi kloroformijae heitettiin pois ja jäljelle jäänyt kloroformi puhallettiin pois ilman avulla. DNA saostettiin isopropanolilla, ja erottamisen jälkeen se lietettiin uudelleen TE-puskuriin.

10 Esimerkki 3

Elektroforeesi polyakryyliamidi-geelillä

DNA-fragmenttien näkyväksi tekemistä ja karakteri-

sointia varten 0,3 MD:ssä käytettiin 8-15 %:ista polyakryyli-

amidi-(PAA)-grelejä. Geelit olivat 1 mm:n paksuisia,

15 30 cm:iä pitkiä ja 14 on leveitä. Puskurina oli seos, joka sisälsi 89 mmoolia boorihappoa, 89 mmoolia Tris-HCl:a ja 2,5 mmoolia EDTA:a ja jonka pH oli 8,2.

8%:isten PAA-geelien valmistamiseksi yhdistettiin 33 ml 24%:ista PAA-varastoliuosta (23,22 g akryyliamidia ja 0,78 g N,N'-metyleenibisakryyliamidia 100 g:ssa vesi-

20 liuosta), 10 ml mainittua elektroforeesipuskuria, joka kuitenkin sisälsi kaikkia komponentteja 10-kertaisena konsentraationa, 6,25 ml 6,4 %:ista 3-etyyliamino-propionitriili-liuosta ja 50,75 ml vettä. Seoksesta poistettiin kaasua vesisuihkupumpun avulla, ja polymeraatio

25 pantiin alulle kiinteällä ammoniumperoksidisulfaatilla. Heti tämän jälkeen geeli kaadettiin, ja ennen elektroforeesin alkua odotettiin vähintään 2 tunnin ajan. Ennen näytteiden siirtämistä geelille, jäljelle jääneen

30 ammoniumperoksidisulfaatin poistamiseksi kytkettiin geelin 100 V:n jännite noin tunnin ajaksi.

Elektroforeesit ajettiin käyttäen 100 V:n jännitettä ja 12 mA:n virtaa.

Esimerkki 4

35 Methylomonas claran kannasta DM 2397 peräisin olevien plasmidin pBE3 karakterisointi

Plasmidi pBE 3:a käsitettiin taulukossa 1 mainituilla restriktioendonukleaaseilla, ja syntyneet fragmentit erotettiin geelillä ajetun elektroforeesin avulla. Nukleaasilla suoritettua kaksoiskäsittelyä ja
 5 yksityisten, pBR 322:ssa kloorattujen fragmenttien karakterisoinnin avulla - kuten myöhemmin kuvataan - saatiin taulukossa 2 ja kuvassa 1 esitetyt tulokset.

Plasmidi pBE 3 on suuremman plasmidin deleetio-mutaatti. Tämän rinnalla on olemassa vielä pienempiä
 10 plasmideja. Kaikki nämä plasmidit ovat tämän keksinnön kannalta samanarvoisia, sikäli kuin ne sisältävät mety-lomonakselle ominaisen replikonin.

Taulukko 1

Kokonaiskuva pBE 3:n karakterisointiin käytetyistä
 15 entsyymeistä

Entsyymi	<u>Fragmenttien</u> lukumäärä
Acc I	1
Xor II	1
Eco RI	5
20 Hinc II	5
Ava I	12
Bal I	vähintään 19
Ei pilkkoutumista seuraavien entsyymien avulla	
Bam HI	
25 Bgl II	
Bst EII	
Eco RV	
Hind III	
Hpa I	
30 Kpn I	
Nru I	
Pst I	
Pvu II	
Sal I	
35 Sma I	

Sph I
 Sst I
 Sst II
 Stu I
 5 Xba I
 Xho I
 Xmn I

Taulukko 2

10 Fragmenttien suuruus (MD:nä), jotka saatiin pilkkomalla pBE 3:a restriktionukleaasien avulla:

	<u>EcoR I:</u>	<u>Hinc II:</u>	<u>Ava I:</u>
	F1 : 4,14	H1 : 6,8	A1 : 2,0
	F2 : 3,09	H2 : 1,42	A2 : 1,72
	F3 : 1,27	H3 : 0,87	A3 : 1,26
15	F4 : 0,91	H4 : 0,31	A4a: 1,03
	F5 : 0,63	H5 : 0,28	A4 : 1,03
			A5 : 0,85
			A6 : 0,66
			A7 : 0,55
			A8 : 0,50
20			A9 : 0,13
			A10: 0,08
			A11: 0,07
	<u>EcoR I +</u>	<u>EcoR I +</u>	
	<u>Ava I :</u>	<u>Hinc II:</u>	
	D1 : 1,35	E1 : 2,29	
25	D2 : 1,22	E2 : 1,83	
	D3a: 1,03	E3 : 1,42	
	D3 : 1,03	E4 : 1,27	
	D4 : 0,85	E5 : 0,91	
	D5 : 0,70	E6 : 0,63	
	D6 : 0,63	E7 : 0,46	
30	D7 : 0,55	E8 : 0,40	
	D8 : 0,54	E9 : 0,31	
	D9 : 0,53	E10: 0,28	
	D10: 0,50		
	D11: 0,40		
	D12: 0,14		
35	D13: 0,12		
	D14: <0,1		
	D15: <0,1		
	D16: <0,1		

Esimerkki 5Restriktiouutot

Yksittäiset uutot suoritettiin 50-100 ml:n kokonaistilavuudessa valmistajan suosittelemalla puskurilla.

- 5 DNA:n täydellisen uuton varmistamiseksi näytteistä inkuboitiin yön yli.

- Suoritettaessa kaksin- tai useampikertaista uuttoa lisättiin vastaavat entsyymit suurimmaksi osaksi yhtäaikaan DNA:han. Puskuri koostui näissä tapauksissa liuoksesta, joka sisälsi
- 10 litraa kohti 50 mmoolia keittosuolaa, 5 mmoolia Tris-HCl:a (pH säädetty 7,5:een), 6 mmoolia magnesiumkloridia, 6 mmoolia 2-merkaptoetanolia sekä 100 mg naudanseeruminalbumiinia. Kontrollikokeet osoittivat, että entsyymit antoivat tässä puskurissa samat tulokset kuin valmistajan suositteluissa
- 15 puskureissa. Poikkeuksen muodostivat entsyymit, joiden suolantarve oli erittäin korkea. Näissä tapauksissa uutettiin ensin vähäisessä suolakonsentraatiossa yhdellä entsyymillä, ja sitten suolakonsentraation lisäyksen jälkeen lisättiin toinen entsyymi.

- 20 Esimerkki 6

Osittaisuutto Eco RI:llä

- 2 µg plasmidi-DNA:a inkuboitiin 1 yksikön kanssa restriktioentsyymiä 50 µl:n kokonaistilavuudessa 37°C:ssa. Samanlaisia seoksia inkuboitiin eripituiset ajat ja
- 25 reaktiot pysäytettiin eri aikoina kuumentamalla seosta 70°C:een. Kunkin vyöhykeotoksen geelielektroforeettinen analyysi osoitti, kuinka pitkälle uutto määrättyjen aikojen jälkeen oli edennyt.

Esimerkki 7

- 30 Kasvun edellytykset

- Kaikkia käytettyjä Escherichia colin kantoja kasvatettiin L-lihaliemessä (10 g Bacto Tryptonia, 5 g hiiva-uutetta ja 5 g keittosuolaa 1 litrassa vettä). Methylo-
- monas claran kantoja kasvatettiin yhdessä kahdesta,
- 35 seuraavasta minimaalisesta elatusaineesta:

5 M 36: 1,5 % Metanolia
 0,1 % H_3PO_4
 0,083 % K_2SO_4
 0,018 % $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$
 0,036 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0,004 % CaCO_3
 0,015 % Sitruunahappoa
 0,005 % $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
 80 $\mu\text{l/l}$ Hivenaineliuosta

10 V 135 L: 1,5 % Metanolia
 0,16 % K_2SO_4
 0,06 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0,025 % Na_2SO_4
 0,014 % CaCO_3
 0,01 % $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
 15 0,2 % H_3PO_4
 0,28 % NH_3 (25 %)
 0,3 % KNO_3
 0,3 % NaHCO_3
 1 ml/l Hivenaineliuosta

20 Hivenaineliuos: 0,05 g/l H_3BO_3
 0,01 g/l KJ
 0,04 g/l $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 0,04 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0,02 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

25 Esimerkki 8

Hydridivektorien rakenne

Plasmidi pBE 3 pilkottiin restriktioentsyymillä

Eco R I osittain, niin että plasmidin pääosa leikattiin
 30 vain kerran, ja oli lineaariseksi tehdyssä muodossa.
 pBR 322-DNA pilkottiin täydellisesti Eco RI:llä ja tämän
 jälkeen käsiteltiin alkalisella fosfataasilla. Näin
 valmistetut DNA:t yhdistettiin ja inkuboitiin T_4 -DNA-li-
 gaasilla yli yön 14°C :ssa 50 μg :a tätä ligerien seosta
 35 käytettiin sitten transformaatioon CaCl_2 - käsittelyllä

sopivaksi tehdyssä E.colin kannassa HB 101.

Bakteerit siveltiin L-lihaliemilevyille, joissa oli tetrasykliiniä 20 µg/ml, ja inkuboitiin yli yön. Resistentit pesäkkeet siirrettiin tuoreille levyille, ja hyvin kasvaneet kloorit tutkittiin "single colony-lysis":n avulla plasmidi-DNA:n olemassaoloa suhteen, jolla oli suurempi molekyylipaino kuin pBR 322:lla. Kloorit, jotka sisälsivät sellaisen plasmidi-DNA:n, kasytettiin lopuksi 100 ml:ssa L-lihalientä, joko tetrasykliinin kanssa tai ilman sitä, ja bakteereiden kloramfenikolistimuloinnin jälkeen saatiin plasmidi-DNA:a. Entsyymeillä Eco RI ja Ava I suoritettut restriktiouutot osoittavat, että saatiin kuvassa 2 esitetty hybridiplasmidi pRM 21 ja kuvassa 3 esitetty hybridiplasmidi pRM 54.

Näiden rinnalla voitiin identifioida hybridiplasmideja, jotka sisälsivät pBE 3:n fraktioita.

Esimerkki 9

Ligaasi-reaktio

Ligaasi-reaktio suoritettiin 50 µl:n tilavuuksissa DNA:n kokonaiskonsentraation ollessa 20 µl/ml. Puskuri sisälsi litraa kohti 30 mmoolia Tris-HCl:a (pH säädetty 7,5:ksi), 4 mmoolia magnesiumkloridia, 10 mmoolia ditioerytriiniä ja 0,2 mmoolia ATP:a. Näihin annoksiin hitsattiin 1 µl T₄-ligaasia, joka vastasi 400 U:a (1 U vastaa tässä sitä määrää entsyymiä, joka tarvitaan sitomaan 50%:a Hind III:lla pilkotusta lambda-DNA:sta, 30 minuutissa, -16°C:ssa, 20 µl:n tilavuudessa. DNA:n konsentraatio tässä annoksessa nousee noin 330 µg/ml:aan).

Molempien DNA:iden optimi suhde toisiinsa nähden tiettyjä ligaasi-koetta varten laskettiin Dugaiczky et al:n menetelmän mukaisesti, 7 MB 96 (1975) 171. 14°C:ssa inkuboitiin vähintään 16 tunnin ajan.

Esimerkki 10

Konjugaatio

Vastaanottajaa ja luovuttajaa kasvatettiin yön yli aina OD₆₀₀ 1,0 - 1,2:een saakka (vastaanottaja) tai 1,4-1,6:een saakka (luovuttaja), ja yhtä suuret tilavuudet vastaanottajaa ja luovuttajaa yhdistettiin, että seokselle oli käytettävissä suuri pinta-ala. Seosta
 5 inkuboitiin kahden tunnin ajan 37°C:ssa ravistelematta sitä, ja tämän jälkeen siitä siveltiin 200 µl:aa agar-levyille, joiden koostumus teki mahdolliseksi valinnan donoria suhteen sekä uudella, siirrettävän plasmidin välittämällä ominaisuudella varustetun resepto-
 10 rin suhteen. E.coli HB 101:n ja M.claca DSM 2397:n välisessä konjugaatiossa oli nämä metanoliminimaalinelatusainelevyt varustettu antibioottilisällä (siirrettävän plasmidin laadun avulla määritetyllä).

Toisissa kokeissa vastaanottajaa ja luovuttajaa
 15 inkuboitiin yllä kuvatulla tavalla, ja 200 µl tätä seosta siveltiin metanoliminimaalinelatusainelevyille, joissa ei ollut antibioottia. Näitä levyjä inkuboitiin yön yli 37°C:ssa, ja syntyvä balteerikasvu huuhdottiin pois 2 ml:lla metanoli-minimaalinelatusainetta. 200 µl:aa
 20 tätä suspensiota levitettiin sitten metanoli-minimaalinelatusainelevyille, jotka sisälsivät vastaavan antibiootin. Klooneit tulivat esille 48-72 tuntisen levyjen inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa.

Esimerkki 11

25 Enkaryoottisen DNA:n ekspressio M. clarassa

a) Plasmidi pBE 3 kloorattiin tai uudelleen kloorattiin kuvattujen menetelmien mukaisesti pBR 322:n johdannaisissa, jotka enkaryoottisen geenin C-DNA-sekvenssinä sisälsivät apinaninsuliinin sekvenssin.

30 Apinaninsuliinia c-DNA on pBR 322:n Pst I-leikkauskohtaan sillä tavalla sisällytetty, että tämä vieras informaatio ekspressoitui E. colissa β-laktamaasi-promoottorin säätelyn alaisena. Tällöin syntyi fuusio-
 proteiini, joka voitiin osoittaa anti-insuliini-vasta-ai-
 35 neiden avulla (Eurooppalainen patenttihakemus O o32 675).

Apinaninsuliinin c-DNA sisältää kaksi sisäistä Pst I -
leikkauskohtaa. Koodaavaa informaatiota ei voida tämän
vuoksi poistaa plasmidista vahingoittumattomassa muodossa.
Jotta tämän plasmidin replikaatio *M. clara*ssa olisi
5 mahdollista, meneteltiin tämän vuoksi siten, että
M. clara n plasmidi pBE 3:sta peräisin olevat DNA-sele-
venssit liitettiin tähän insuliini-informaatiota ekspres-
soivaan pBR 322-johdannaiseen. Kokeellinen suoritus
tapahtui edellä kuvatulla tavalla. Tällöin voitiin saada
10 joukko hybridiplasmideja, jotka rakenteensa puolesta
erosivat pBR 322-osaan liitetyn apinaninsuliinin
C-DNA:n suhteen edellä kuvatuista hybridivektoreista.
Insuliinigeenin järjestys näiden vektorien pBR 322-osassa
jää tällöin kehitysvaiheessa muuttumatta, niin että
15 myös nämä kloorit ekspres^{soi}oivat insuliiniantigeeni-deter-
minantteja *E. coli*ssa. Eräs näistä klooneista, joka si-
sältää koko PBE 3-sekvenssin, saa nimityksen p InMc 68.

b) pBR 322:n todettu siirrettävyysdefekti voidaan
täydentää plasmidien, kuten esimerkiksi Col K:n Col C:n
20 avulla (Young ja Poulis, Gene 4(1978) 175-179). Tämän
vuoksi siirrettiin yllä kuvattuihin, kalsiumkloridi-käsit-
telyllä päteviksi tehtyihin donor-kantoihin konjuga-
tiivisen plasmidi RP 4:n ja pRM-sarjaa hybridivektorien
kanssa, transformaation avulla vielä lisäksi plasmidi
25 Col K. Ilmaisinkantana, plasmidi Col K:n osoittamiseksi,
käytettiin kolisiinille herkkää kantaa AB 1157 (Warret
et al., MGG 170 (1979) 103-107). *E. coli*-donori-kanto-
ja HB 101 /RP4, Col K, pRM54) tai HB 101 (RP4, Col K,
pRM 21) sekä vastaanottajien *M. clara* ATCC 31226 väli-
30 sissä konjugaatiokokeissa kloonien valitsemiseksi, jotka
sisälsivät hybridivektoria, suoritettiin valinta suurin
tetrasykliiniannosten (50 µg/ml) läsnäollessa metanoli-
minimaali-elatusaineella (M 36).

Lukuisien *M. clara* kloonien analyysi ilmaisi, että
35 noin 10 %:ssa tapauksista saatiin klooneja, jotka sisälsi-

vät vain hybridivektorin. E.colin luovuttajakannan HM 101 (RP4, ColK, pInMc68) sekä M. clara-vastaanottajien ATCC 31226 välissä konjukaatiokokeissa voitiin samalla tavalla saada M.clara-klooneja, joissa oli ainoastaan plasmidi pInMc 68.

c) Saatuja M.clara-klooneja, joissa oli plasmidi pInMc68, kasvatettiin seuraavaksi, ja tutkittiin radioimmuunimäärityksen tai rasvasolumäärityksen avulla insuliinipitoisuutensa suhteen. Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 0032 675 E.colilla tehtyjen havaintoja vastaten voitiin myös M.clara ATCC 31226:n tapauksessa mitata insuliinin arvoja, jotka olivat 1-5 IE/litra. Niin ollen ekspressoituu siis hybridivektorin pInMc 68:n pBR 322-osaan sisältyvä insuliini-informaatio myös M.clarassa oikein ja tehokkaasti.

Esimerkki 12

Methylomonas-claran kantaa ATCC 31226 kasvatetaan minimimaalielatusaineissa M36 OD₆₀₀:n arvoon 0,9-1,4. 20 ml tätä viljelmää siirretään 100 ml:aan M36-elatusainetta, joka lisäksi sisältää 4% glysiiniä ja 10% sakkaroosia. Bakteereita ravistellaan tässä elatusaineessa 4 tunnin ajan 37°C:ssa ja 100-180 kierrosta minuutissa. Faasikontrastimikroskoopissa ei ole sitten enää havaittavissa yhtään pitkänomaisia, liikkuvia bakteereita.

Muodostuneet sferoplastit poistetaan sentrifugoimalla 4°C:ssa, 2600 g:llä, ja ne suspendoidaan uudelleen 1 ml:aan M 36 - elatusainetta, joka lisäksi sisältää 10 %:a sakkaroosia.

Mainitut elatusaineet voivat 10% sakkaroosin tilalla sisältää myös sorbiittia 1 moolin litraa kohti tai 15 % polyetyleeniglykolia, jonka keskimääräinen moolipaino on 6000.

Sferoplastien erottaminen voidaan suorittaa myös 10-minuuttisella sentrifugoinnilla 4°C:ssa ja 3600 g:llä.

Esimerkki 13

0,5 ml:a esimerkin 12 mukaan saatua suspensiota selvitetään 0,1 ml:n kanssa seosta, joka koostuu yhtä suurista osista uudelleensuspendointielatusainetta ja TE-puskuria, johon plasmidi pRM 21 sisältyy. Tähän seokseen lisätään 1,5 ml 4 prosenttista polyetyleeniglykoli 6000 -liuosta ja sekoitetaan varovaisesti. Tämä seoksen annetaan seisoa huoneenlämmössä 2 minuutin ajan, siihen lisätään 5 ml uudelleensuspendointielatusainetta, ja se sentrifugoidaan 3600 g:llä.

Saostuma otetaan 1 ml:aan uudelleensuspendointielatusainetta ja sivellään agar-levyille, jotka koostumukseltaan vastaavat uudelleensuspendointielatusainetta ja sisältävät lisäksi 1,5 % Bakto-agaria ja ampisilliinia 50 µg/ml. Levyjä inkuboidaan 37°C:ssa 3 päivän ajan, ja pesäkkeet kasvatetaan M36-elatusaineessa, joka sisältää ampisilliinia 50 µg/ml. Näin saaduista bakteereista voitiin eristää transformaatioon käytetty plasmidi pRM21.

Ampisilliinin sijaan voidaan tässä menetelmässä käyttää myös tetrasykliiniä 10 µg/ml konsentraationa.

Sama tulos saadaan, kun mainitun plasmidin tilalla käytetään plasmidia pRM 54.

Esimerkki 14

Jos työskennellään esimerkin 13 mukaan, käytetään kuitenkin pIN Mc 68:ssa plasmidina ja jos valinta suoritetaan 50 µg/ml:n avulla tetrasykliiniä, niin saadaan *Methylomonas clara*-klooneja, joissa on tämä plasmidi ja jotka valmistavat insuliinia.

Patenttivaatimukset

1. Hybridiplasmideja, joissa on DSM 2397:n plasmidin replikoni.

5 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen plasmidi, t u n -
n e t t u siitä, että se replikoituu Methylomonas-suvun
bakteerissa, edullisesti Methylomonas clara-lajin baktee-
rissa, erityisesti kannassa ATCC 31226.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen plasmidi,
10 t u n n e t t u siitä, että siinä on integroitu eukaryoot-
tinen DNA, erityisesti insuliinin ekspressoitumista varten.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen plasmidi,
t u n n e t t u siitä, että siinä on integroitu prokaryoot-
tinen DNA.

15 5. Menetelmä obligatorisesti metyloτροφisten baktee-
reiden valmistamiseksi, jotka ekspressoivat sisältämäänsä
vieras-DNA:a, t u n n e t t u siitä, että

a) obligatorisesti metyloτροφisesta bakteerista DSM
2397 eristetään plasmidi,

20 b) tästä ja plasmidista, jossa on valintamarkkeri,
valmistetaan hybridiplasmidi, jossa on obligatorisesti mety-
loτροφiselle bakteerille ominainen replikoni,

c) hybridiplasmidi viedään transformaation avulla
isäntäorganismiin ja siellä lisätään sen kopiomäärää,

25 d) seulonnan jälkeen kloonit käsitellään sopivalla
konjugat^{tiiv}~~tiiv~~isella plasmidilla ja siirrettävyysdefekti pois-
tetaan,

e) näin saadut kloonit konjugoidaan resipienttina toi-
mivien obligatorisesti metyloτροφisten bakteerien kanssa,
30 joissa edullisesti ei ole plasmideja, ja

f) toivotut kloonit seulotaan.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että resipienttina on Methylomonas-suvun,
edullisesti Methylomonas clara-lajin bakteeri, erityisesti
35 kanta ATCC 31226.

7. Patenttivaatimuksen 5 tai 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi, jossa valintamarkkerit ovat, on pBR 322 ja/tai se sisältää geneettisen informaation insuliinin ekspressiota varten.

5 8. Jonkin patenttivaatimuksista 5-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäorganismi on Escherichia coli, konjugatiivinen plasmidi on RP4 ja siirrettävyysdefekti poistetaan viemällä sisään plasmidi Col K tai Col V.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 5-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmävaiheiden d) ja e) sijaan resipienttina toimiva obligatorisesti metylo-

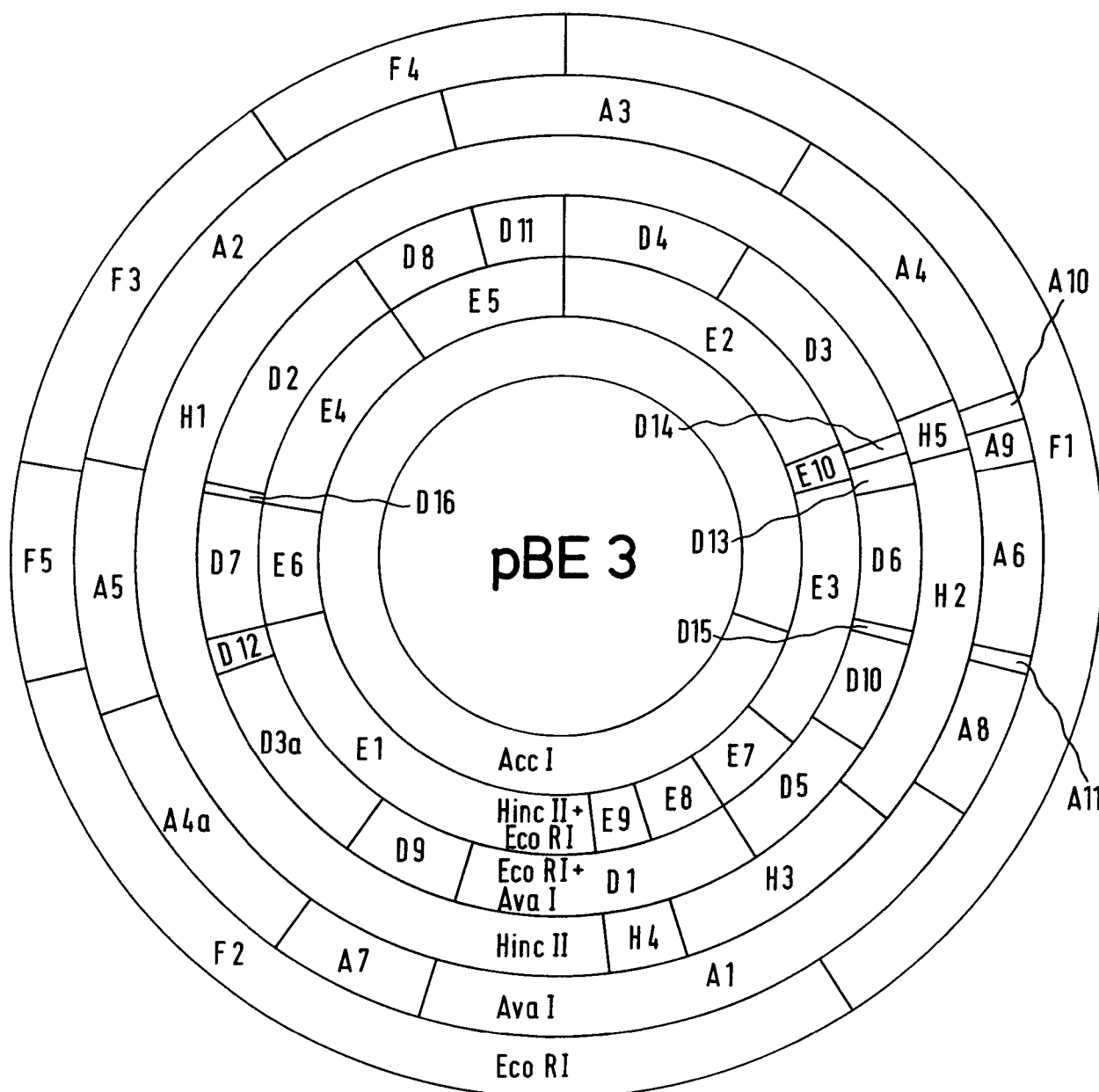
10 trofinen bakteeri muutetaan sferoplasteiksi ja hybridiplasmidi viedään sisään transformaation avulla.

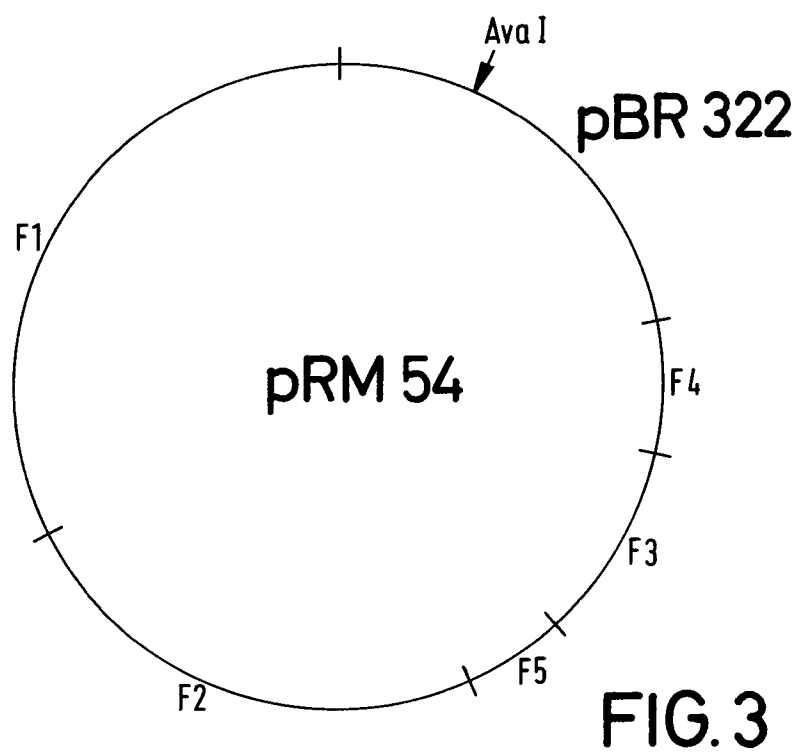
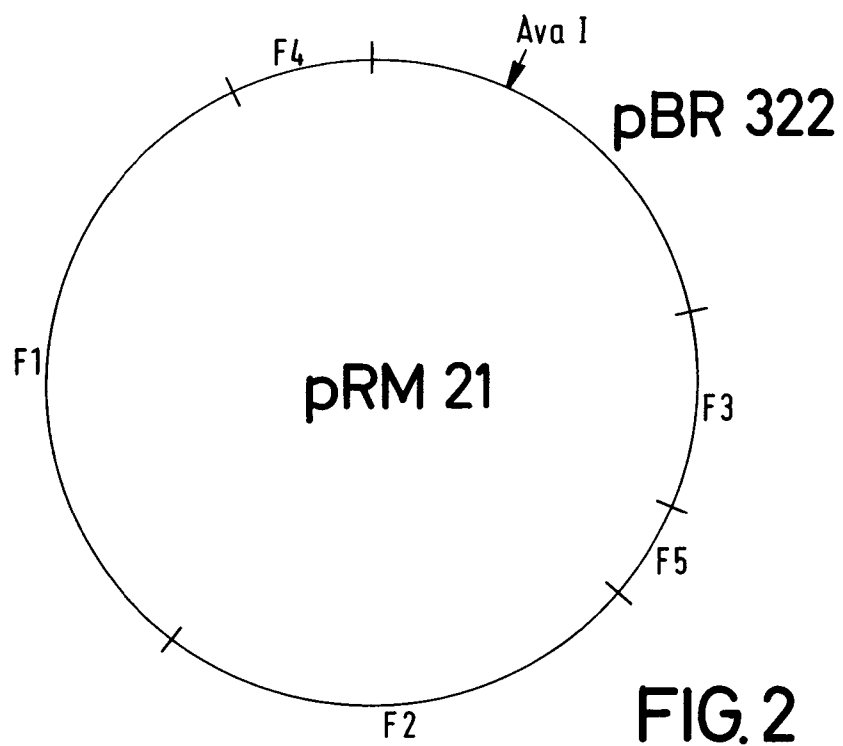
10. Menetelmä patenttivaatimuksessa 9 mainittujen sferoplastien valmistamiseksi metylo-

15 trofisisista bakteereista, t u n n e t t u siitä, että bakteerit viljellään runsaasti glysiiniä sisältävässä elatusaineessa, joka sisältää osmoottisen stabilisaattorin, jolloin elatusaine on edullisesti heikosti hypotoninen ja sisältää 2-4 paino-% glysiiniä.

20 11. Plasmidi DSM 2397:stä.

FIG. 1





Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga

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

FI

CH

DE

DK

FR

GB

H 2003926 (CRK 1/02)

NO

SE

US

EP H 35831 ja 37273 (C12N15/00)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chem Abstr. vol. 98(1983) 14119 2 · Eur. J. Appl.
Microbiol. Biotechnol. 1982, 15(4) s. 223-6

28/2-85 Teuvo Saarelma

Allekirjoitus