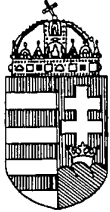


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

209 581 B

(21) A bejelentés száma: 2208/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 05. 08.
(30) Elsőbbségi adatok:
192 273 1988. 05. 09. US

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/52

(40) A közzététel napja: 1990. 05. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1994. 08. 29. SZKV 94/08

(72) Feltalálók:

Ingolia, Thomas Dominick, Indianapolis, Indiana (US)
Skatrud, Paul Luther, Greenwood, Indiana (US)
Miller, James Robert, Indianapolis, Indiana (US)
Kovacevic, Steven, Indianapolis, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana (US)

(74) Képvisező:

S.B.G. & K. Ügyvédi és Szabadalmi Iroda,
Budapest

**(54) Eljárás a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim magasfokú kifejezésére
rekombináns DNS-befogadó gazdasejtekben**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás fokozott dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim magasfokú kifejezésére rekombináns DNS-befogadó gazdasejtekben, melynek során

- a nevezett DNS-befogadó gazdasejtben működőképes promotert, és
- a *Streptomyces clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitását kódoló, a fent em-

lített promoter szabályozta expresszió szempontjából megfelelően elhelyezkedő DNS-szakaszt tartalmazó, rekombináns expressziós DNS-vektort hordozó gazdasejtet

a génexpresszió szempontjából megfelelő körülmények között tenyésztene, és kívánt esetben a keletkezett terméket elválasztják.

A találmány tárgya eljárás a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim magasfokú kifejezésére rekombináns DNS-befogadó gazdasejtekben.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz (DAOCS), más néven expandáz, katalizálja a penicillin-N átalakulását dezacetoxi-cefalosporin-C-vé (DAOC). Ez a reakció olyan fontos antibiotikumok bioszintézisének kulcsfontosságú lépése, mint a *Cephalosporium acremonium* termelte cefalosporinok, illetve a *Streptomyces clavuligerus* és a *S. lipmanii* termelte 7 α -metoxi-cefalosporinok vagy cefamicinek.

A találmány szerinti DNS-molekulák egyetlen megszakítás nélkül transzlálódó szakasz formájában kódolják a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz (DAOCS). E megszakítás nélkül transzkripciója, majd az így nyert mRNS translációja egyláncú, dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz aktivitással rendelkező polipeptidet eredményez. A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimet kódoló DNS-molekulát a *Streptomyces clavuligerus* törzs sejtjeinek genomális DNS-éből különítjük el, és rekombináns expressziós DNS-vektorok előállítására használjuk fel. Ezen expressziós DNS-vektoroknak négy fajtája különösen előnyös: az első *E. coli* sejtekben, a második *Cephalosporium*, a harmadik *Penicillium*, a negyedik pedig *Streptomyces* sejtekben teszi lehetővé a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz igen erőteljes expresszióját.

Az *E. coli* sejtekben termelt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz a penicillin-N dezacetoxi-cefalosporin-C-vé való átalakulását katalizálja. A fenti, találmány szerinti *E. coli* transzformánsok nyers sejt kivonatai dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz aktivitást mutatnak. Ezek az *E. coli* DNS-vektorok és transzformánsok nagy mennyiségű, aktív dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim hatékony előállítását teszik lehetővé. A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim nem csak a dezacetoxi-cefalosporin-C előállítását, hanem más, a penicillin-N-től eltérő penicillinek gyűrűinek tágtágására is felhasználható.

A találmány szerinti *Cephalosporium* DNS-vektorok a gyógyszeriparban használható baktériumtörzsek előállítására alkalmasak. A *Cephalosporium* törzsek a cefalosporin családba tartozó antibiotikumok előállítására használt, gazdaságilag igen fontos mikroorganizmusok. *Cephalosporium* sejteket a találmány szerinti expressziós DNS-vektorokkal transzformálva a transzformánsok sejten belüli dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz koncentrációja megnövekszik. E transzformánsok felhasználásával az ipar fermentációs eljárások hatékonysága, illetve antibiotikum-hozama növelhető. A működőképes dezacetil-cefalosporin-C szintetáz/dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz génnel nem rendelkező *C. acremonium* törzseket a találmány szerinti DNS-vektorokkal transzformálva a cefalosporin-C helyett dezacetoxi-cefalosporin-C-t bioszintetizáló transzformánsokat nyerünk. A dezacetoxi-cefalosporin-C szájon át felszívódó, klinikailag igen fontos antibiotikumok előállítására használható, mint köztestermék.

A találmány szerinti *Penicillium* DNS-vektorokkal legelőnyösebben cefalosporin-szintézist katalizáló en-

zimet bioszintetizálhatunk az igen nagy mennyiségű penicillint előállító *Penicillium* törzsek sejtjeiben. A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz, akár önmagában, akár más enzimekkel, például a dezacetetil-cefalosporin-C szintetáz vagy epimeráz enzimmel együtt (ez az enzim egy hidrolizációs reakció, a dezacetoxi-cefalosporin-C dezacetetil-cefalosporin-C-vé való átalakulását katalizálja) a különböző penicillinek cefalosporinokká való átalakítására használható. Az izopenicillin-N epimeráz és a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz együttes kifejeződése *Penicillium* törzsekben például dezacetoxi-cefalosporin-C termelést eredményez: ez az anyagcseretermék mindeddig ismeretlen a *Penicillium* törzsek körében.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-molekulákat egyszerűen módosíthatjuk úgy, hogy más mikroorganizmusok, így a *Paecilomyces* és *Streptomyces* törzsek, különösen pedig a *S. clavuligerus* fermentációjának hatékonyságát és hozamát növelő expressziós DNS-molekulákat állítsunk elő. Bár a találmány szerinti, dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-molekulák *S. clavuligerus* sejtekből különítjük el, az e DNS felhasználásával előállított DNS-vektorokkal igen sokféle DNS-befogadó gazdasejtben fejeztethetünk ki dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz, amint azt a fentebb leírt *E. coli* expressziós DNS-vektorok is mutatják. A találmány szerinti *E. coli*, *Cephalosporium* és *Penicillium* DNS-vektorok előállítására szolgáló eljárásokat követve más mikroorganizmusokban is működőképes, hasonló DNS-vektorokat hozhatunk létre, egyszerűen a megfelelő szabályozó DNS-szakaszok helyettesítésével, ha ez szükséges. A cefalosporinokat termelő legtöbb mikroorganizmus az antibiotikum-bioszintézis során közös prekursorként használja a penicillin-N-t, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz szubsztrátját. A találmány szerinti, dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-molekulák igen sokféle, penicillin és cefalosporin antibiotikumot termelő mikroorganizmus fermentációjának hatékonyságát és hozamát növelő expressziós DNS-vektorok előállítására használhatók.

A következőkben részletesebben ismertetjük a találmány szerinti eljárást. Az egyértelműség kedvéért és az alábbiakban részletezett, illetve szabadalmi igénypontokkal jellemzett, találmány szerinti eljárás megértését megkönnyítő, az alábbiakban néhány szakkifejezést illetve rövidítést röviden meghatározunk.

amdS: acetamidáz gén; az ábrákon az *Aspergillus nidulans* acetamidáz génjének jelölésére is szolgál.

amdSp: az amdS gén promotere.

Amr: apramicin antibiotikummal szemben rezisztenciát biztosító gén; az apramicin-rezisztens fenotípus jelölésére is szolgál.

Antibiotikum:

mikroorganizmus által termelt, akár változatlan formában, akár korlátozott kémiai módosításokat követően más mikroorganizmusok vagy eukarióta sejtek növekedését gátló, vagy azokat elpusztító anyag.

Antibiotikum-bioszintézis gén:

az elsődleges anyagcsere termékek antibiotikumokká, vagy egy antibiotikumnak egy más, eltérő antibiotikumká való átalakulásában szereplő enzimatis reakcióhoz szükséges enzimet kódoló DNS-szakasz.

5

Antibiotikum-termelő mikroorganizmus:

bármely, antibiotikumot termelő, vagy, expressziójuk esetén antibiotikum-termelést biztosító géneket hordozó mikroorganizmus, ideértve – bár nem kizárólag – a *Streptomyces*, a *Bacillus*, a *Monospora*, a *Cephalosporium*, a *Paecilomyces*, a *Podospora*, a *Penicillium* és a *Nocardia* fajokat.

10

Antibiotikum-rezisztenciát biztosító gén:

egy antibiotikummal szemben rezisztenciát biztosító fehérjét kódoló DNS-szakasz.

ApR: ampicillin-rezisztenciát biztosító gén; az ampicillin-rezisztens fenotípus jelölésére is szolgál.

20

Bifunkciós (ingázó) klónozó DNS-vektor:

két, rendszertanilag különböző mikroorganizmusban replikálódni és/vagy ezek genetikai állományába beépülni képes rekombináns klónozó DNS-vektor.

25

bGH: szarvasmarha növekedési hormon, illetve az ezt kódoló DNS-szakasz.

bp: a kettősszállú DNS egy bázispárja.

30

CAT: acetil-transzferáz enzimet kódoló, kloramfenikol-rezisztenciát biztosító gén.

cDACS/DAOCS:

a *Cephalosporium acremonium* expandáz (DAOCS)/hidroxiláz (DACS) génje.

35

c1857: a lambdapL promotor hőmérséklet-érzékeny represszorát kódoló gén.

cIPS: a *Cephalosporium acremonium* izopenicillin-N szintetáz enzime, vagy ezt kódoló DNS.

40

Klónozás: egy DNS-szakasz beépítése egy rekombináns klónozó DNS-vektorba.

Kódoló szakasz:

egy, a génről expresszállódó fehérje aminosav-sorrendjét, vagy rRns és tRns gének esetében a génről expresszállódó rRns illetve tRns nukleotid-sorrendjét kódoló génszakasz.

45

Kódoló

szál: az „értelmes” szál, a kettősszállú kódoló szakasz „nem értelmes” szálának komplementere. A nem értelmes szálát írja át az RNS-polimeráz enzim.

50

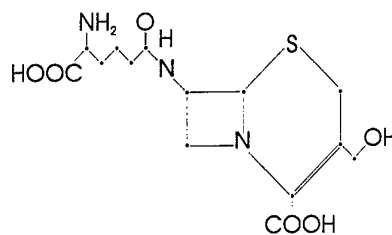
cos: a lambda fág ragadós végszakaszai.

Kozmid: a DNS-befogadó gazdasejtben plazmidként replikálódó, de fág fejekbe is pakolható rekombináns klónozó DNS-vektor.

55

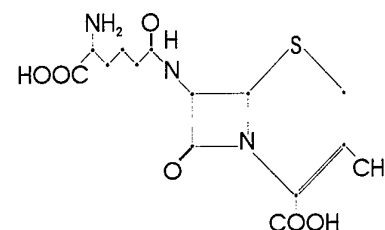
DAC: dezacetoxi-cefalosporin-C; 7-(ω -karboxi- ω -amino-pentanoil-amino)-3-(hidroximetil)-caf-3-em-4-karbonsav.

60



DACS: dezacetil-cefalosporin-C szintetáz: a DAOCS DAC-vé való átalakulását katalizáló enzim.

DAOC: dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz; 7-(ω -karboxi- ω -amino-pentanoil-amino)-3-metil-caf-3-em-4-karbonsav.



DAOCS: a DAOCS gén által kódolt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim; a penicillin-N DAOCS-vé való átalakulását katalizálja.

Gén: promoterből, transzlációs aktiváló szakaszból, kódoló szakaszból és az akár fehérje (és így szükségszerűen egy mRNS), akár tRNS, akár pedig rRNS géntermék expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő, 3' irányban található szabályozó szakaszokból álló DNS-szakasz.

Genomiális génbank:

egy adott élőlény genomját lényegében reprezentáló klónozott DNS-szakaszokat hordozó rekombináns, klónozó DNS-vektor-sorozat.

hGH: emberi növekedési hormon, illetve az ezt kódoló DNS-szakasz.

HmR: higromicin-rezisztenciát biztosító gén; a higromicin-rezisztens fenotípus jelölésére is szolgál.

Hibridizálás:

két egyszálú, DNS, RND vagy DNS és RNS molekula összeolvasztása a létrejövő bázispárok révén teljesen vagy részlegesen kettősszállú molekulává.

IPS vagy IPNS:

izopenicillin-N szintetáz.

Izopenicillin-N szintetáz:

a delta-(L-alfa-amino-adipil)-L-ciszteinil-D-valin izopenicillin-N-né való átalakulását katalizáló enzim, más néven cikláz.

KmR: kanamicin-rezisztenciát biztosító gén; a kanamicin-rezisztens fenotípus jelölésére is szolgál.

lacI:	az E. coli lacI génje.	
lacZalfa:	az E. coli lac operonjából származó béta-galaktoszidáz (lacZ) alfa-fragmense és promotere.	
lppT:	az E. coli lac génjének transzkripció végpontjelző szakasza.	5
lppP:	az E. coli lac génjének promotere.	
M13 ORI:	az M13 fág replikációs kezdőszakasza.	
mel:	a tirozináz gén.	
MCS:	több restrikciós enzim hasítóhelyét tartalmazó klónozó hely.	10
mRNS:	hírvívő (messenger) ribonukleinsav.	
ORI:	egy plazmid vagy DNS-vektor replikációs kezdőszakasza; a DNS-polimeráz enzim megkötődési helyeként, illetve az enzimműködés kezdőpontjaként szolgáló DNS-szakasz.	15
Pen DNS:	Penicillium chrysogenum eredetű DNS.	
pIPS:	a Penicillium chrysogenum IPS génje, illetve IPS-t kódoló szakasza.	
pIPSp:	a Penicillium chrysogenum IPS génjének promotere.	20
pIPSt:	a Penicillium chrysogenum IPS génjének transzkripció végpontjelző szakasza.	
pL:	a lambda bakteriofág baloldali promotere.	
Promoter:	a transzkripció irányával megegyező irányban található, szomszédos DNS-szakasz átírását irányító DNS-szakasz.	25
rbs:	riboszóma-kötőhely; a transzlációs aktiváló DNS-szakasz által kódolt, a mRNS molekula 5'-felőli végén található szakasz, melyhez a riboszómák kapcsolódni képesek.	30
Rekombináns klónozó DNS-vektor:	bármely autonóm módon replikálódó, vagy a DNS-befogadó gazdasejt genomjába beépülni képes DNS-molekula (ideértve – bár nem kizárólag – a plazmidokat), melyhez egy vagy több további DNS-molekulát kapcsolnak vagy lehet kapcsolni.	35
Rekombináns expressziós DNS-vektor:	bármely autonóm módon replikálódó vagy a DNS-befogadó gazdasejt genomjába beépülni képes DNS-molekula, ideértve – bár nem kizárólag – a plazmidokat, amely egy alapvetési illetve gazdasági szempontból értékes polipeptidet vagy RNS-t kódoló DNS-szakasz expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő promotert és más, 5'-irányban elhelyezkedő szabályozó DNS-szakaszokat hordoz.	40
Rekombináns DNS-vektor:	bármely rekombináns klónozó vagy expressziós DNS-vektor.	50
Restrikciós fragmens:	egy vagy több restrikciós endonukleáz enzim működése révén létrejött bármely lineáris DNS-molekula.	55
rRNS:	riboszómás ribonukleinsav.	
Szenzitív DNS-befogadó gazdasejt:	egy adott antibiotikum jelenlétében, az illető antibiotikummal szemben rezisztenciát	60
	biztosító DNS-szakasz hiányában a növekedésre képtelen DNS-befogadó gazdasejt.	
TcR:	tetraciklin-rezisztenciát biztosító gén; a tetraciklin-rezisztens fenotípus jelölésére is szolgál.	
Transzkripció végpontjelző szakasz:	a DNS RNS-polimeráz általi átírását megszakító DNS-szakasz.	
Transzfektáns:	fág-DNS-sel vagy egy fág fehérjeburkába pakolt DNS-sel transzformált DNS-befogadó gazdasejt.	
Transzformáns:	transzformált DNS-befogadó gazdasejt.	
Transzformáció:	a genotípust megváltoztató és a DNS-befogadó gazdasejtben változást előidéző DNS bejuttatása egy DNS-befogadó gazdasejtbe.	
Transzlációs aktiváló DNS-szakasz:	mRNS-sé való átírása után a mRNS fehérjévé való transzlációját elősegítő, a kódoló szakasztól 5'-irányban elhelyezkedő szabályozó DNS-szakasz.	
tRNS:	szállító (transzfer) ribonukleinsav.	
trp:	az E. coli triptofán operonjának promotere, és transzlációs aktiváló DNS-szakasza.	
A kísérő ábrákon bemutatott restrikciós és funkcionális térképek az alábbiakban ismertetendő DNS-vektorok közelítő ábrázolásai. Az ábrákon nem tüntettük fel az összes restrikciós hasítási helyet, így lehetséges, hogy a DNS-vektoron az adott restrikciós helyből több is előfordul, mint ahányat az ábra mutat.		
1. ábra	a pOW380 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
2. ábra	a pCZR336 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
3. ábra	a pOW382 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
4. ábra	a pCZR111 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
5. ábra	a pPS65 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
6. ábra	a pPS67 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
7. ábra	a pPS69 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
8. ábra	a pPS60 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
9. ábra	a pPS63 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
10. ábra	a pPS64 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
11. ábra	a pMLC12 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
12. ábra	a P3SR2 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
13. ábra	a pPS51 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	
14. ábra	a pPS71 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.	

15. ábra a pLC2 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.

16. ábra a pPS68 plazmid restrikciós és funkcionális térképe.

A találmány tárgya eljárás a *Streptomyces clavuligerus* expandáz enzimét kódoló DNS-molekulák, rekombináns klónozó és expressziós DNS-vektorok előállítására. A *S. clavuligerus* expandáz enzimét kódoló DNS, valamint az *S. clavuligerus* genomjában a kódoló szakasz 3' vége felől elhelyezkedő DNS-szakaszok egy részének nukleotid-sorrendjét az alábbiak-

ban ismertettjük. A kettősszalú DNS-molekulának csak az „értelmes”, más néven a kódoló szálát mutatjuk be, balról jobbra 5' → 3' irányultsággal. A nukleotidokat megszámoztuk, a számok a DNS-szekvencia felett láthatók. Az expandáz kódoló szakaszában, a szekvencia minden sora alatt a DNS által kódolt aminosav-sorrendet tüntettük fel, balról jobbra amino-terminális → karboxil-terminális vég irányultsággal. Minden aminosav rövidítése az adott aminosavat kódoló triplet alatt található. Az aminosavakat megszámoztuk; a számok az aminosav-szekvencia alatt láthatók.

```

                    10                      30
5'-CCC GGG TGC CGC TGG TCA GCG CCA CCG GAT CGA CCC GTA TGG GCC

                    50                      70                      90
GCG CCG TGG GCC CCC GGG CCG GTG CTC CGG ATC TCG GCG AAC TTC

                    110                      130
TAC ACC ACC GAA GAG GAG ATC GAC CGC CTG GCG GAC GCG CTG GAC

                    150                      170
GCG CTG ACG GGC GAG TGA TCC CCC CGG CTC GCG GAC CGC CTC CCC

                    190                      210
CGC GCT GTT GAC CAC CCG GTT CAC GGA TTA CGA GAG GAT CAG TGA

                    230                      250                      270
GAG TTG ATG GAC ACG ACG GTG CCC ACC TTC AGC CTG GCC GAA CTC
    Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu
        1                      5                      10

                    290                      310
CAG CAG GGC CTG CAC CAG GAC GAG TTC CGC AGG TGT CTG AGG GAC
Gln Gln Gly Leu His Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp
    15                      20                      25

                    330                      350
AAG GGC CTC TTC TAT CTG ACG GAC TGC GGT CTG ACC GAC ACC GAG
Lys Gly Leu Phe Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu
    30                      35                      40

                    370                      390
CTG AAG TCG GCC AAG GAC ATC GTC ATC GAC TTC TTC GAG CAC GGC
Leu Lys Ser Ala Lys Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly
    45                      50                      55

                    410                      430                      450
AGC GAG GCG GAG AAG CGC GCC GTC ACC TCG CCC GTC CCC ACC ATG
Ser Glu Ala Glu Lys Arg Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met
    50                      65                      70

                    470                      490
CGC CGC GGC TTC ACC GGG CTG GAG TCG GAG AGC ACC GCC CAG ATC
Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile
    75                      80                      85

```

510 530
 ACC AAT ACC GGC AGC TAC TCC GAC TAC TCG ATG TGC TAC TCG ATG
 Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met
 90 95 100

550 570
 GGC ACC GCG GAC AAC CTC TTC CCG TCC GGT GAC TTC GAG CGG ATC
 Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser Gly Asp Phe Glu Arg Ile
 105 110 115

590 610 630
 TGG ACC CAG TAC TTC GAC CGC CAG TAC ACC GCC TCC CGC GCG GTC
 Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr Ala Ser Arg Ala Val
 120 125 130

650 670
 GCC CGG GAG GTC CTG CGG GCG ACC GGG ACC GAG CCC GAC GGC GGG
 Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu Pro Asp Gly Gly
 135 140 145

690 710
 GTC GAG GCC TTC CTC GAC TGC GAG CCG CTG CTG CGG TTC CGC TAC
 Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg Phe Arg Tyr
 150 155 160

730 750
 TTC CCG CAG GTC CCC GAG CAC CGC AGC GCC GAG GAG CAG CCC CTG
 Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln Pro Leu
 165 170 175

770 790 810
 CGG ATG GCG CCG CAC TAC GAC CTG TCG ATG GTC ACC CTC ATC CAG
 Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile Gln
 180 185 190

830 850
 CAG ACA CCC TGC GCC AAC GGC TTC GTC AGC CTC CAG GCC GAG GTC
 Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val
 195 200 205

870 890
 GGC GGC GCG TTC ACG GAC CTG CCC TAC CGT CCG GAC GCC GTC CTC
 Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu
 210 215 220

910 930
 GTC TTC TGC GGC GCC ATC GCG ACC CTG GTG ACC GGC GGC CAG GTC
 Val Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val
 225 230 235

950 970 990
 AAG GCC CCC CGG CAC CAT GTC GCG GCC CCC CGC AGG GAC CAG ATA
 Lys Ala Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile
 240 245 250

1010 1030
 GCG GGC AGC AGC CGC ACC TCC AGT GTG TTC TTC CTC CGT CCC AAC
 Ala Gly Ser Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn
 255 260 265

1050 1070
 GCG GAC TTC ACC TTC TCC GTC CCG CTG GCG CGC GAG TGC GGC TTC
 Ala Asp Phe Thr Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe
 270 275 280

 1090 1110
 GAT GTC AGC CTG GAC GGC GAG ACC GCC ACG TTC CAG GAT TGG ATC
 Asp Val Ser Leu Asp Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile
 285 290 295

 1130 1150 1170
 GGG GGC AAC TAC GTG AAC ATC CGC CGC ACA TCC AAG GCA TAG AGA
 Gly Gly Asn Tyr Val Asn Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala
 300 305 310

 1190 1210
 GCA CAC ACC GTC ATG GTC ACA GCA GCA ATC AGT GGT ACC GAC GAG

 1230
 ATA CGC GCG AGG GCG-3',

ahol

A dezoxi-adenil-,
 G dezoxi-guanil-,
 C dezoxi-citidil-,
 T timidil-csoportot,
 Ala alanint,
 Arg arginint,
 Asn aszparagint,
 Asp aszparaginsavat,
 Cys ciszteint,
 Gln glutamint,
 Glu glutaminsavat,
 Gly glicint,
 His hisztidint,
 Ile izoleucint,
 Leu leucint,
 Lys lizint,
 Met metionint,
 Phe fenil-alanint,
 Pro prolint,
 Ser szerint,
 Thr treonint,
 Trp triptofánt,
 Tyr tirozint és
 Val valint
 jelöl.

A fenti DNS-szakasz guanozin + citozin aránya 70%, a DNS-szakasz által kódolt fehérje számított molekulatömege: 34.519 dalton, mért molekulatömege pedig mintegy 34.000 dalton. Az e területen járatos szakemberek felismerik, hogy a fentebb ismertetett DNS-szekvencia a találmány szerinti eljárás igen fontos eleme. Ezt a szekvenciát kémiai szintézissel a szokásos módon, a módosított foszfortriészter módszer szerint eljárva, teljesen védett dezoxi-ribonukleotid oligomerek felhasználásával is előállíthatjuk. E szintetikus eljárások jól ismertek a szakirodalomból; kivitelezésüket pedig lényegében Itakura és munkatársai [Science,

198, 1056. (1977) illetve Crea és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978)] módszere szerint eljárva végezhetjük. Különösen előnyös eljárásokat ismertetnek továbbá Hsiung és munkatársai [Nucleic Acid Research, 11, 3227 (1983)] illetve Narang és munkatársai [Methods in Enzymology, 68, 90. (1980)]. A fenti, manuális szintézis-eljárások mellett a DNS-szekvenciát automata DNS-szintetizáló készülékek, így például a Systec 1450A vagy az ABS (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404) 380A DNS-szintetizáló készülékek felhasználásával is előállíthatjuk.

A genetikai kód degeneráltsága miatt, azaz annak következtében, hogy a legtöbb aminosavat és a transzlációs stop jelet több különböző kódon kódolja, a fenti aminosav-sorrendű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimet számos különböző DNS-szakasz kódolhatja. Minthogy ezek az alternatív DNS-szakaszok ugyanazt a találmány szerinti aminosav-sorrendet kódolják, ezek a szekvencia-változatok is a találmány oltalmi körébe tartoznak.

A találmány szerinti, dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-molekulákat egy *Streptomyces clavuligerus* törzsből különítjük el. Előállítjuk a *S. clavuligerus* törzs teljes genomális DNS-ét reprezentáló genomális génbankot, majd egy dezoxiribo-oligonukleotid próbával szemben homológ DNS-szakaszokat keresünk a génbankban. A próbát a *S. clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz amino-terminális végének aminosav-sorrendjéről nyert adatoknak megfelelően, a genetikai kód és a *Streptomyces* törzsek kodonhasználati jellegzetességeinek ismeretében tervezzük meg és állítjuk elő. A DNS nukleotid-sorrendjének meghatározásával azonosítjuk a *S. clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-vektort.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimet kódoló DNS-vektor azonosítása után elkülönítjük és a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető pUC8 plazmidba építjük be a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént tartalmazó, mintegy 3,0 kb méretű BamHI restrikciós fragmenst, a pOW380 plazmidot állítva így elő. Ezzel a plazmiddal *E. coli* K12 RR1 Δ M15 DNS-befogadó gazdasejteket transzformálunk. Az *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pOW380 transzformánsokat a Northern Regional Research Laboratories (NRRL), Peoria, IL 61604 törzsgyűjteményében, NRRL B-18264 azonosítási szám alatt helyezzük letétbe (a letét kelte: 1987. november 20). A pOW 380 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 1. kísérőábrán mutatjuk be.

A pOW380 plazmid hasznos kiindulási alapul szolgál a találmány szerinti további expressziós DNS-vektorok előállításához. E DNS-vektorok különösen előnyösek a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim rekombináns DNS-befogadó gazdasejtekkel történő előállítására szolgáló eljárás kivitelezése során. Ezen eljárás részeként:

- 1) a nevezett DNS-befogadó gazdasejt
 - a) egy promotert és transzlációs aktiváló DNS-szakaszt, valamint
 - b) a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimet kódoló, és az expresszió szempontjából a nevezett promoterhez képest megfelelően elhelyezett DNS-szakaszt tartalmazó, rekombináns expressziós DNS-vektorral transzformáljuk; és
- 2) az 1) pontban leírtak szerint eljárva transzformált DNS-befogadó gazdasejtet a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expresszióját lehetővé tevő körülmények között tenyésztjük.

A pOW 380 plazmidot az 1. példában leírtak szerint eljárva különíthetjük el az *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pOW380 törzs sejtjeiből. A pOW380 plazmid a találmány szerinti DNS-vektorok előnyös kiindulási

anyaga. A pOW380 plazmid változatlan formában tartalmazza a *Streptomyces clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz génjét; a gént például egy 3,0 kb méretű BamHI restrikciós fragmensként különítjük el a plazmidból. A pOW380 plazmidot kiindulási alapul választva előállítjuk a pOW382 jelű, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *E. coli* sejtekben történő igen erőteljes expresszióját szolgáló plazmidot. A *S. clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasszal végzett további klónozási lépéseket megkönnyítő, egy NdeI restrikciós hasítóhelyet hozunk létre a *S. clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz -3. illetve +3. nukleotidja között.

Az NdeI hasítóhelyet M13 fággal végzett helyspecifikus mutagenézissel hozzuk létre: a mutagenézis során a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén kezdőpont jelző kodonját közvetlenül megelőző, 5' irányban található, nem kódolt szakaszban a GCC bázishármaszt CAT bázishármasra cseréljük. Az e területen járatos szakemberek jól tudják, hogy a DNS helyspecifikus mutagenézisét kiterjedten alkalmazzák restrikciós hasítóhelyek kialakítására az illető DNS-szakaszon belül, továbbá, hogy az előbbi esetben a kódolt aminosav-sorrend nem változik meg. A mutagenézisre szolgáló eljárást és a köztes DNS-vektorokat részletesebben a 2. példában ismertetjük. A fentiek szerint eljárva nyert, pOW381 jelű, és a 2. példában részletesebben leírt plazmid mindössze egy NdeI restrikciós hasítóhely jelenlétében különbözik a pOW380 plazmidtól. A pOW381 köztes plazmidot azután a pOW382 expressziós plazmid előállítására használjuk.

A pOW832 plazmid előállítása során a *Streptomyces clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakaszt a pCZR336 jelű, a lambda fág pL (lambdapL) promotert és transzlációs aktiváló DNS szakaszt, a cI857 hőmérséklet-érzékeny represszor gént, egy tetraciklin-rezisztenciát biztosító gént és a vektor replikációját biztosító DNS szakaszokat hordozó expressziós plazmid vektorba építjük be. A pCZR336 plazmid lambdapL eredetű promotere úgy helyezkedik el, hogy egy kisméretű peptidet kódoló cisztron expresszióját irányítsa. Az e cisztront követő restrikciós helyre építhető be a kívánt gén, melynek expresszióját így a lambdapL promoter irányítja. Alacsony hőmérsékleten (mintegy 30 °C-on) a pCZR336 plazmidon vagy annak származékain kódolt cI857 fehérje működőképes, és így gátolja a lambdapL promotert; ám, ha a hőmérsékletet 42 °C-ra emeljük, a cI857 fehérje inaktiválódik, és a lambdapL promoter a kívánt génterméket kódoló, igen nagy mennyiségű mRNS transzkripcióját idézi elő. A pCZR336 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 2. kísérőábrán mutatjuk be.

A pOW382 plazmid ugyanazt a fent említett első cisztrint, cI857 gént, lambdapL promotert és transzlációs aktiváló DNS szakaszt tartalmazza, mint a pCZR336 plazmid, de mindezek mellett a pOW381 plazmidból származék dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz génnek a lambdapL promoterről kiinduló expressziós szempontjából megfelelően elhelyezkedő kó-

doló szakaszát is hordozza. A pOW381 plazmid 2,4 kb méretű NdeI-BamHI restrikciós fragmense a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz teljes kódoló szakaszát tartalmazza. A pOW382 plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pCZR336 plazmid lambda ϕ L promotere és transzlációs aktiváló szakasza a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DN ϕ s expressziója szempontjából megfelelően helyezkedjen el. A pOQ382 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 3. kísérőábrán mutatjuk be. A pOW382 plazmid előállítására szolgáló eljárást a 3. példában ismerteti részletesebben.

42 °C körüli hőmérsékleten az *E. coli* K12 JM109/pOW382 törzs sejtei igen nagy mennyiségben fejezik ki a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz; az enzim mennyisége megközelíti a sejt teljes fehérjetartalmának 15%-át. Az *E. coli* K12 JM109/pOW382 transzformánsok nyers sejtkivonataival katalizálható a penicillin-N dezacetoxi-cefalosporin-C-vé való átalakulása, míg a nem transzformált *E. coli* K12 JM109 sejtek sejtkivonatai nem katalizálják ezt az átalakulást. Az átalakulási reakció mérésére alkalmas eljárást, illetve a mérés eredményeit a 4. példában ismertetjük.

Igen sok *E. coli* K12 törzs rendelkezik belső eredetű penicillináz-aktivitással, melyet valószínűleg az ampC lókuszt kódol. Célszerű tehát a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz polipeptidet legalábbis részben tisztítani ahhoz, hogy az optimális dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz aktivitást megfigyelhessük. E célból tisztítással elkülöníthetjük a belső eredetű *E. coli* penicillináz aktivitást a kívánt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáztól. A penicillináz káros hatásának kiküszöbölése érdekében, a részleges tisztítás helyett a penicillináz-termelés szempontjából hiánymutáns baktériumtörzset is felhasználhatunk. Egy ilyen törzs, az *E. coli* K12 A85892, a Northern Regional Research Center-től, az NRRL B-18096 azonosítási szám alapján szerezhető be (a letét kelte: 1986. augusztus 8.).

A pOW382 plazmid a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *E. coli* sejtekben, nagy mennyiségben való hatékony előállítását teszi lehetővé. Minthogy az *E. coli*/pOW382 törzs sejtei a teljes sejtfehérje-mennyiség 15%-át megközelítő mennyiségben fejezik ki a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz, és minthogy az *E. coli* tenyésztése kevésbé bonyolult, mint a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz eredetileg termelő mikroorganizmusoké, az *E. coli*/pOW382 transzformánsokkal hatékonyabban és gazdaságosabban állíthatunk elő rekombináns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz, mint a nem-rekombináns, vagy „természetes” dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz termelő mikroorganizmusokkal.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz a 3. példában leírtak szerint eljárva, sejtmentes rendszerben, penicillin-N-ből kiindulva dezacetoxi-cefalosporin-C előállítására használhatjuk. A dezacetoxi-cefalosporin-C nem pusztán hasznos antibiotikum, hanem olyan fontos antibiotikumok előállításának kiindulási anyaga is, mint a cefalexin, és más cefalosporinok (lásd a 4,307,192 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírást). A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz

talán legfontosabb felhasználási területe a penicillin-N-től eltérő penicillinek új típusú cefalosporin-származékokká való átalakítása.

A penicillin- és cefalosporin-termelő mikroorganizmusok sejtmentes kivonatainak felhasználásával nem természetes (a természetben elő nem forduló) β -laktámokat szintetizálhatunk. A találmány szerinti *E. coli* expressziós DNS vektorok alkalmazásával olcsón és hatékonyan állíthatunk elő dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz; az így nyert enzimmel azután a természetben elő nem forduló penicillinek in vitro új típusú antibiotikumokká vagy antibiotikum-alapvázakká alakíthatjuk át.

Az *E. coli* sejtekben történő dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expresszió szempontjából a pOW382 plazmid nem csak a plazmid felhasználásával elérhető, igen erőteljes expresszió miatt különösen előnyös, hanem a plazmidon található szelekciós marker miatt is. Igen sok rekombináns DNS vektor β -laktamáz kódol, így a DNS vektort hordozó sejtek néhány β -laktám antibiotikum, például ampicillin jelenlétében is képesek a növekedésre. Ha azonban a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz tartalmazó sejtmentes kivonatot β -laktámok előállítására kívánjuk felhasználni, akkor a kivonatot nem tartalmazhat β -laktamáz. A pOW382 plazmidon így szelekciós markerként nem β -laktamáz, hanem egy tetraciklin-rezisztenciát biztosító gén található: a gén által kódolt fehérje nem lép reakcióba a β -laktámokkal.

A találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorok azonban nem jellemezhetők kizárólag egyetlen szelekciós markerral.

Az e területen járatos szakember jól tudja, hogy igen sok szelekciós marker használható dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorok előállítására. Ilyen szelekciós marker gének például a kanamicinnel, a kloramfenikollal vagy más antibiotikumokkal szemben rezisztenciát biztosító gének.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz szubsztrátjaként szolgáló, nem-természetes penicillinek keresését kiegészítheti a penicillin-N-től eltérő penicillinek szubsztrátként elfogadó, mutáns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimek keresése. A találmány szerinti eljárás kiindulási alapul szolgál a mutáns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimek vizsgálatához is: a találmány tárgya eljárás a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS szakasz mutagenézissel történő megváltoztatására is. Az *E. coli* az előnyös mikroorganizmus a mutáció klónozási kísérletekhez: a találmány szerinti *E. coli* expressziós DNS vektorokban egyszerűen idézhetünk elő mutációkat a szakirodalomból jól ismert eljárásokkal, így például sugárkezeléssel (röntgen vagy ultraibolya-sugarakkal), kémiai mutagénnel (például etil-metán-szulfonáttal, nitrozoguanidinnal vagy metán-szulfonáttal), vagy helyspecifikus mutagenézissel, a nem-természetes penicillinek szubsztrátjuként felismerő, és az ilyen szokatlan, és/vagy nem-természetes penicillinek nem-természetes cefalosporinokká átalakító mutáns enzimeket állítva így elő.

Amint azt az e tárgyban járatos szakember felis-

merheti, a találmány szerinti eljárás lehetővé teszi a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén kodonjainak tetszőleges megváltoztatását. Minthogy rendelkezésre áll a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén DNS szekvenciája, a természetes dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimtől az aminosav-sorrend bármely pontján eltérő mutáns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimek előállítása mindössze rutinszerű eljárások kivitelezését teszi szükségessé. A fenti mutáns enzimeket mutáns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakaszok kódolhatják, köztük olyan DNS szekvenciák is, melyekben egyes aminosavak kodonjait kiejtettük, illetve újabb kodonokat inszertáltunk a természetes dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS szakaszba. Az ilyen mutáns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimek előállítására szolgáló eljárások is a találmány oltalmi körébe tartoznak, minthogy még ha nem is jósolható meg bizonyosan, hogy egy adott mutáció hatására a kódolt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz elveszti-e enzimátikus aktivitását, a mutáns DNS szakasz pusztán expressziójával megállapítható a mutáció hatása a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz aktivitására.

Különösen előnyös a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz szubsztrát-specifitásának megváltoztatása úgy, hogy penicillin-G illetve penicillin-V szubsztrátokból a gyűrűtágítási reakcióban cefalosporin-G illetve a cefalosporin-V keletkezzen. Ez utóbbi antibiotikumokban a cefalosporin-C D- α -amino-adipil-oldallánca helyett fenil-ecetsav- illetve fenoxi-ecetsav-oldallancok találhatók, így igen előnyösen alakíthatók továbbá a szájon át felszívódó, klinikailag felhasználható cefalosporinok fontos ipari köztestermékévé, a 7-amino-dezacetoxi-cefalosporánsavvá.

A találmány oltalmi körét az alábbiakban példaként bemutatott DNS vektorok nem korlátozzák. A találmány tárgya valójában eljárás a *Streptomyces clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimét kódoló DNS molekulák előállítására. A találmány szerinti DNS molekulák felhasználásával a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz bármely olyan DNS befogadó gazdasejtben való expressziójára szolgáló expressziós DNS vektort állíthatunk elő, melyben az expressziós DNS vektor replikálódik, vagy a genomba beépül, továbbá a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expresszióját szabályozó promotor és transzlációs aktiváló DNS szakasz működőképes.

A fentiek szerint tehát, habár az itt példaként bemutatott *E. coli* expressziós DNS vektorok két cisztronosak, és a transzkripció *E. coli* sejtekben a λ bdapL szabályozza, bármely, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *E. coli* sejtekben való expresszióját szolgáló *E. coli* expressziós plazmid, vagy DNS vektor a találmány oltalmi körébe tartozik. A találmány oltalmi körébe tartoznak tehát az *E. coli* sejtekben működőképes replikonnal, így például az olyan plazmidokból, mint a pBR322, a pACYC184, az F, a ColV-K94, az R1, az R6-5 vagy az R100 plazmidokból származó replikonnal rendelkező, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziójára alkalmas expressziós DNS vektorok is.

A találmány oltalmi köre nem korlátozható kizárólag a plazmid DNS vektorokra sem; a találmány oltalmi körébe tartoznak a DNS befogadó gazdasejtben a replikációt illetve a fennmaradást integrációt, illetve vírus-jellegű replikáció útján biztosító, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziójára alkalmas expressziós DNS vektorok is.

A találmány oltalmi köre nem korlátozható a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimet kódoló DNS szakasz expresszióját szabályozó egyetlen adott promotor és transzlációs aktiváló DNS szakasz felhasználására sem. A találmány oltalmi körébe tartozik bármely, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *E. coli* sejtekben való expressziójára használt, *E. coli* sejtekben működőképes promotor és transzlációs aktiváló DNS szakasz felhasználása. Számos, *E. coli* sejtekben működőképes promotor és transzlációs aktiváló DNS szakasz alkalmas a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *E. coli* sejtekben való expressziójának szabályozására. *E. coli* transzkripciós és transzlációs aktiváló DNS szakaszok közé tartoznak – bár nem kizárólag – az *lpp*, a *lac*, a *trp*, a *tac*, a λ bdapL és a λ bdapR promoterek és transzlációs aktiváló DNS szakaszok.

A különféle, fentebb példákkal bemutatott *E. coli* transzkripciós és transzlációs aktiváló DNS szakaszok mellett a találmány szerinti, dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS molekulákhoz más mikroorganizmusokból származó transzkripciós és transzlációs aktiváló DNS szakaszokat is ligálhatunk, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expresszióját az olyan DNS befogadó gazdasejtekben szabályozó expressziós DNS vektorokat nyerve, melyekben az aktiváló DNS szakasz működőképes. Habár a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz előállítása és az *in vitro* felhasználás céljából végzett további tisztítása szempontjából az *E. coli* a legelőnyösebben DNS befogadó gazdasejt, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expresszióját az *E. coli*-tól különböző DNS befogadó gazdasejtekben biztosító DNS vektorok is igen hasznosak, elsősorban az adott mikroorganizmus cefalosporin antibiotikum-termelő-képességének, illetve hatékonyságának növelése céljából.

Számos mikroorganizmus termel β -laktám antibiotikumokat. Az alábbi táblázatban a β -laktám antibiotikumot termelő mikroorganizmusokról mutatunk be egy nem teljes körű felsorolást.

I. TÁBLÁZAT

β -laktám antibiotikumot termelő mikroorganizmusok

MIKROORGANIZMUS	ANTIBIOTIKUM
Agrobacterium	különböző β -laktámok
Arachnomyces minimus	penicillinek és cefalosporinok
Anixiopsis peruviana	penicillinek és cefalosporinok
Cephalosporium	penicillinek és cefalosporinok
acremonium	

MIKROORGANIZMUS	ANTIBIOTIKUM
purpurascens	
polyaleurum	
chrysogenum	
curtipes	
Chromobacterium	különböző β -laktámok
Emericellopsis	penicillinek és cefalosporinok
terricola	
minima	
synnematicola	
glabra	
mirabilis	
salmosynnemata	
Gluconobacter	különböző β -laktámok
Nocardia	cefamicin-C
lactamadurans	nokardicin
uniformis	
Paecilomyces	penicillinek és cefalosporinok
carneus	
persicinus	
Penicillium	különböző penicillinek
chrysogenum	és más β -laktámok
Serratia	különböző β -laktámok
Spiroidium	penicillinek és cefalosporinok
fuscum	
Streptomyces	klavulánsav
antibioticus	aszparenominin-A,
argenteolus	MM 4550 és MM 13902
cattleya	tienamicin
chartreusis	SF 1623 és cefamicin-A és -B
cinnamensis	cefamicin-A és -B
clavuligerus	PA-32413-I, cefamicin-C, A16886A, penicillinek, cefalosporinok, klavulánsav, és más klavámok
fimbriatus	cefamicin-A és -B
flavovirens	MM 4550 és MM 13902
flavus	MM 4550 és MM 13902
fulvoviridis	MM 4550 és MM 13902
griseus	cefamicin-A és -B, karpetimidin-A és -B
halstedii	cefamicin-A és -B
heteromorphus	C2081X, cefamicin-A és -B
hygroscopicus	deacetoxi-cefalosporin-C

MIKROORGANIZMUS	ANTIBIOTIKUM
lipmanii	cefamicin, penicillin-N, 7-metoxi-cefalosporin-C, A16884, MM 4550, MM 13902
olivaceus	epitienamicin-F, MM 4550 és MM 13902
panayensis	C2081X és cefamicin-A és -B
pluracidomyceticus	pluracidomicin-A
rochei	cefamicin-A és -B
sioyaensis	MM 4550 és MM 13902
sp. OA-6129	OA-6129A
sp. KC-6643	karpetimidin-A
tokunomensis	aszparenomicin-A
viridochromogenes	cefamicin-A és -B
wadayamensis	WS-3442-D

Az előző, β -laktám antibiotikumot termelő mikroorganizmusok közül igen sokat antibiotikum-termelésre használ a gyógyszeripar. E mikroorganizmusok antibiotikum-termelőképessége növelhető, és hatékonyabbá tehető az antibiotikum-bioszintézisben résztvevő enzimek sejten belüli koncentrációjának növelésével a fermentáció során. A deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló, találmány szerinti DNS molekulák felhasználásával előállítható expressziós DNS vektorokat a megfelelő DNS befogadó gazdasejtbe transzformálva e vektorok megnövelik a transzformált sejtek sejten belüli deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz koncentrációját, és így fokozzák az illető sejt antibiotikum-termelőképességét, valamint a hatékonyságát, feltéve, ha a DNS befogadó gazdasejt β -laktám antibiotikum-bioszintézis reakcióútja egy, a deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitást feltételező köztes reakciót is tartalmaz.

Egy adott DNS befogadó gazdasejtbe való transzformáció után az illető sejt sejten belüli deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz koncentrációját növelő DNS vektornak a következő DNS szakaszokat kell tartalmaznia:

- 1) a találmány szerinti, deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS molekula; és
- 2) a transzformálandó DNS befogadó gazdasejtben működőképes, továbbá a deacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS expressziója szempontjából a megfelelő irányultsággal és helyzetben található promotor és transzlációs aktiváló DNS szakasz.

Stabil transzformánsokat természetesen csak akkor nyerhetünk, ha a DNS vektor akár extrakromoszómális elemként, akár a genomiális DNS-be beépülve replikálódik a DNS befogadó gazdasejtben. Egy előnyös DNS vektor tehát tartalmaz a DNS vektornak a gazdasejtben való replikációját, illetve beépülését specifikusan irányító DNS szakaszokat is. Az ilyen specifikus replikációs vagy beépülést irányító DNS szakaszok jelenléte

azonban nem elengedhetetlenül szükséges, minthogy a beépülés bizonyos gyakorisággal nem-specifikus módon is végbemegy, ha a DNS befogadó gazdasejtbe DNS-t juttatunk be. A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektor antibiotikum-rezisztencia gént vagy a DNS vektort hordozó DNS befogadó gazdasejtek szelektálását lehetővé tevő néhány más DNS szakaszt is hordozhat, de az ilyen szelektálható DNS szakaszok jelenléte sem nem szükséges, sem nem kívánatos, ha a DNS vektor beépül a DNS befogadó gazdasejt kromoszomás DNS-ébe,

A találmány szerinti, *Streptomyces clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént kódoló DNS szakasz felhasználásával bármely transzformálható mikroorganizmushoz állíthatunk elő dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorokat a találmányban leírtak szerint eljárva. A fentebb leírt *E. coli* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorok az ilyen sokféle, találmány szerinti expresszió DNS vektort szemléltetik. A találmány szerinti számos előnyös DNS vektor azonban a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz β -laktám antibiotikumot (így penicillineket és cefalosporinokat) termelő sejtekben való expressziójára szolgál.

A találmány szerinti *Penicillium* DNS vektorok a β -laktám antibiotikumot termelő sejtek antibiotikum-hozamának növelésére, illetve a sejt által rendes körülmények között termelt antibiotikum megváltoztatására szolgáló, találmány szerinti DNS vektorok példái. Egy ilyen jellemző DNS vektor a pPS65, a *Penicillium izopenicillin-N*-szintetáz (IPNS) génjének a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS szakasz expressziója szempontjából megfelelően elhelyezett promoterét hordozza. A pPS65 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 5. kisérfőábrán mutatjuk be, míg a pPS65 plazmid előállítására szolgáló eljárást, és számos hasznos köztes plazmid-konstrukciót az 5. példában ismertetünk.

Egy másik jellemző dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektor a pPS67 jelű plazmid *Penicillium*, *Aspergillus* és más, rokon DNS befogadó gazdasejtekben használható. A pPS67 plazmid az *Aspergillus amdS* génjének a *Penicillium* sejtekben is működőképes, a *Streptomyces clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz génje kódoló szakaszának expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő promoterét tartalmazza. A pPS67 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 6. kisérfőábrán mutatjuk be. A pPS67 plazmidot egyszerűen módosíthatjuk úgy, hogy *Penicillium* illetve *Aspergillus* sejtekben használható szelekciós markert hordozza, amint azt a szelektálható *amdS* gént tartalmazó pPS71 és pPS72 DNS vektorok is szemléltetik. A pPS67, pPS71 és pPS72 plazmidok előállítására szolgáló eljárást a 6. példában részletezzük.

A találmány szerinti pPS69 plazmid a *Penicillium* IPNS génjének a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő promoterét, valamint a *Penicillium* IPNS génjének a 3' felőli, nem-

kódoló szakaszból származó, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz 3' felőli végéhez illesztett szabályozó szakaszait tartalmazó DNS-t hordozza. Ezeket a 3' felőli szabályozó szakaszokat a rekombináns fehérjetermék expressziójának fokozására használhatjuk a szabályozó szakaszokat felismerni képes DNS befogadó gazdasejtekben. A pPS69 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 7. kisérfőábrán mutatjuk be. A pPS69 plazmid előállítására szolgáló eljárást a 7. példában részletezzük. A fentiekben ismertetett jellemző dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorok *Penicillium* sejtekbe való bejuttatására szolgáló eljárást a 8. példában mutatjuk be.

A fentiekben, illetve az alábbi példákban ismertetett DNS vektorok pusztán szemléltetik az igen sokféle, találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektort. A 07/021,836 számú, 1987. március 4-én benyújtott amerikai egyesült államokbeli szabadalom, melyre az alábbiakban hivatkozunk, ismerteti a *Cephalosporium acremonium* expandáz-hidroxiláz génjének 5' és 3' felőli szabályozó szakaszait. Ezeket a szabályozó szakaszokat a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakaszhoz kapcsolva, különösen *Cephalosporium* sejtekben jól használható, találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorokat állíthatunk elő. A 02 00 425 számú, 1986. december 10-én benyújtott európai szabadalom, melyre az alábbiakban hivatkozunk, leírja a *Cephalosporium acremonium* IPNS génjének transzkripció és transzláció aktiváló DNS szakaszait: ezeket a szabályozó szakaszokat a találmány szerinti, *Streptomyces clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakaszhoz kapcsolva a *S. clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz (expressziós DNS vektorba történő klónozást, majd a DNS vektor *Cephalosporium* sejtekbe történő transzformációját követően) *Cephalosporium* sejtekben való expressziójára alkalmas rekombináns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént állítva így elő.

A találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorok a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim sejten belüli koncentrációjának bármely sejttípusban, elsősorban β -laktám antibiotikumot termelő sejtekben való növekedésére alkalmas. A pOW380 plazmid a *Streptomyces clavuligerus* dezacetetil-cefalosporin-C szintetáz génjének kódoló szakaszát hordozza, így e plazmid a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén sejtenkénti példányszámának, és így az enzim sejten belüli koncentrációjának növelésére alkalmas DNS vektorok előállítására használható. Minthogy a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS szakaszt *Streptomyces clavuligerus* sejtekből különítjük el, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz különösen alkalmas a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz *Streptomyces* DNS befogadó gazdasejtekben történő igen erőteljes expresszióját lehetővé tevő expressziós DNS vektorok előállítására. A szakirodalom bővelkedik a *Streptomyces* expressziós DNS vektorok előállítására és a

Streptomyces DNS befogadó gazdasejtek transzformálására szolgáló eljárásokban, lásd például Garcia-Dominguez és munkatársai közleményét [Applied and Environmental Microbiology, 53 (6), 1376–1381. (1987)]. A találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakaszt egyszerű módon beépíthetjük egy *Streptomyces* promotert és replikont tartalmazó expressziós DNS vektorba: számos ismert *Streptomyces* promotor és replikon alkalmas erre a célra. A II. táblázatban egy szemléltető jellegű, ám nem kimerítő listát közlünk a *Streptomyces* replikonok forrásaiként felhasználható *Streptomyces* plazmidokról. Az e területen járatos szakemberek felismerik, hogy mindaddig, amíg a replikon működőképességét ez nem érinti, a táblázatban felsorolt plazmidok egészét vagy valamely részét felhasználhatjuk a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént hordozó DNS vektorok előállítására. A plazmidot hordozó DNS befogadó gazdatörzsek nevét, valamint a letét azonosítási számát szintén feltüntetjük a II. táblázatban.

II. TÁBLÁZAT
Streptomyces plazmidok

Plazmid	DNS befogadó gazdasejt	Azonosítási szám
SCP2	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NRRL 15042
SCP2*	<i>Streptomyces coelicolor</i> M110	NRRL 15041
pEL7	<i>Streptomyces ambofaciens</i> /pEL7	NRRL 12523
pUC6	<i>Streptomyces spinosus</i>	NRRL 11439
pUC3	<i>Streptomyces</i> 3022A	NRRL 11441
SLP1	<i>Streptomyces lividans</i>	NCIB ¹ 11417
pNM100	<i>Streptomyces virginiae</i>	NRRL 15156
pEL103	<i>Streptomyces granulosus</i> A339 12.13/pEL103	NRRL 12549
pIJ702	<i>Streptomyces lividans</i>	ATCC ² 39155

¹ = National Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, Post Office Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98DG, Scotland, United Kingdom.

² = American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852.

A találmány szerinti *Streptomyces clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz expressziója más *Streptomyces* törzsekből, valamint *Penicillium*, *Cephalosporium* vagy bármely más, DNS befogadó gazdasejtből származó transzkripció és transláció aktiváló DNS szakaszokkal szabályozva az adott mikroorganizmusban felhasználható rekombináns dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént állíthatunk elő.

Az alábbi példák a találmány szerinti eljárás szemléltetése és jellemzésére szolgálnak, nem korlátozzák azonban a találmány tartalmi körét.

1. példa

A.) Az *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pOW380 törzs tenyésztése

Az *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pOW380 törzs liofilezett tenyésztését a Northern Regional Research Laboratories (NRRL), Peoria, IL 61604 törzsgyűjteményéből, az NRRL B-18264 azonosítási szám alapján (a letét kelte: 1987. november 20.) szerezzük be, és az alábbi eljárásban közvetlenül „tenyészetként” használjuk.

1 1, 100 μ g/ml ampicillinnel kiegészített TY jelű folyadék táptalajt (amely l-enként 8 g triptont, 5 g nátrium-kloridot és 5 g élesztő kivonatot tartalmaz) az *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pOW380 törzs egy tenyészetével beoltunk, majd 37 °C hőmérsékleten, levegőztetve, egy éjszakán át (15–18 órán át) inkubálunk. Az így nyert tenyészetet a pOW380 plazmid forrásaként használjuk.

B.) A pOW380 plazmid elkülönítése

Az 1. példa A.) pontjában leírtak szerint eljárva előállított tenyészetet 5500 fordulat/perc fordulatszámmal, 4 °C hőmérsékleten, 10 percen át centrifugálva kiülepítjük a sejteket. A centrifugálással nyert felülúszót elöntjük. A sejtüledéket 28 ml, 25% szacharózt és 50 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsavat tartalmazó oldatban felfuszpendáljuk. 1 ml, 50% glicerint, 0,25 mól/l Tris-sósavat (pH = 8,0), valamint 20 mg/ml koncentrációban lizozim enzimet tartalmazó oldatot, továbbá 1,5 ml, 0,5 mól/l koncentrációjú, pH = 8,0 vegyhatású etilén-diamino-tetraecetsav-oldatot adunk a sejtuszpenzióhoz, és az elegyet összekeverjük. Az így nyert szuszpenziót jégfürdőben, 15 percen át inkubáljuk. Óvatosan elkeverve 3 ml lizis-oldatot (3 ml, 10%-os Triton-X100; 75 ml, pH = 8,0 vegyhatású, 0,25 mólos etilén-diamino-tetraecetsav; és 7 ml víz elegye) mérünk a lizozim enzimmel kezelt sejtekhez. Az így nyert oldatot további 15 percen át jégfürdőben inkubáljuk.

A sejtüledéket 17 000 fordulat/perc fordulatszámmal, 4 °C hőmérsékleten, 45 percen át végzett centrifugálással távolítjuk el az oldatból. 28,6 g cízium-kloridot és 1 ml, 5 mg/ml koncentrációjú etidium-bromid-oldatot mérünk a 30 ml térfogatú felülúszóhoz. Az oldatot ezután vízzel 40 ml-re egészítjük ki, majd ultracentrifuga-csőbe töltjük. Az ultracentrifuga-csövet lezárjuk, és az oldatot 49 500 fordulat/perc fordulatszámmal, 18 órán át centrifugáljuk. Az így nyert, plazmid-DNS-t tartalmazó, ultraibolya-fényben láthatóvá tett folyadéksávot elkülönítjük, sóval telített izopropilal extrahálva eltávolítjuk az etidium-bromidot, majd háromszori puffercserével, 20 térfogatnyi TE pufferral (10 mmól/l Tris-sósav, pH=7,5; 1 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsav) szemben dializáljuk. A dializált oldatot összegyűjtjük, majd 2 térfogat etanol és 0,05 térfogat 3 mólos nátrium-acetát-oldatot adagolunk. Az etanolos elegyet -20 °C hőmérsékletre hűtjük, majd a plazmid DNS-t 10 000 fordulat/perc fordulatszámmal,

-10 °C hőmérsékleten, 30 percen át centrifugálva kiüleptítjük. Az így nyert üledéket 1 ml TE pufferban oldjuk fel, majd azonos térfogatú fenol:kloroform eleggyel (1:1, térfogat-arány) extraháljuk. A vizes fázishoz 0,1 térfogat 3 mólos nátrium-acetát-oldatot és 2 térfogat etanol mérünk, -20 °C hőmérsékleten 30 percen át inkubálunk, majd 15 000 fordulat/perc fordulatszámmal, 20 percen át centrifugálva kiüleptítjük a DNS-t. Az így nyert DNS-üledéket előbb 70%-os, majd 100%-os etanollal mossuk, végül szárítjuk.

A fentiek szerint eljárva nyert 1,5 mg pOW380 DNS-t 1,5 ml 0,1 × tömény TE pufferban oldjuk fel, és -20 °C hőmérsékleten tároljuk. A pOQ380 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 1. kísérőábrán mutatjuk be.

2. példa

Az mOW380 fág előállítás

Azonos plazmidokat különböző módszerekkel, és különböző eredetű génszakaszok felhasználásával is előállíthatunk. Az mOW380 fagot úgy állítjuk elő, hogy a pOW379 kozmid 3 kb méretű, a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gént hordozó BamHI restrikciós fragmensét és az M13 vektor replikatív formáját (RF) ligáljuk. A *Streptomyces clavuligerus* genomialis kozmid génbankból származó pOW379 kozmidot nem csak az *S. lipmanii* IPNS génjével való hibridizálás, hanem a tisztított *S. clavuligerus* expandáz amino-terminális aminosav-sorrendje és a mikroorganizmus-faj kodonhasználati gyakoriságainak ismeretében tervezett, várhatóan a legjobb egyezést biztosító DNS-próbával való hibridizálás alapján azonosítjuk. A kívánt M13 fág klónt akár a fenti, várhatóan a legjobb egyezést biztosító próbával, plakk hibridizációval, akár restrikciós analízissel azonosíthatjuk. A találmány szerinti eljárás szempontjából azonban az MOW380 fág előállítása lényegesen leegyszerűsíthető, minthogy a pOW380 plazmid is felhasználható a *S. clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz génjének forrásként. Az M13-származék MOW380 fág az *S. clavuligerus* expandáz enzimét kódoló DNS szakasz 5' felőli végén egy NdeI restrikciós felismerőhely kialakítását célzó, helyspecifikus mutagenézis igen jól használható köztesterméke.

A.) A pOW380 plazmid 3 kb méretű BamHI restrikciós fragmensének elkülönítése

Az 1. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva előállított pOW380 plazmid DNS 25 µg-ját, 25 µl 0,1 × tömény TE pufferban feloldva 40 µl 10 × tömény BamHI puffer (1,0 mól/l nátrium-klorid, 100 mmól/l Tris-sósav, pH=7,5, 100 mmól/l magnézium-klorid), 335 µl desztillált víz és 5 µl (50 egység) BamHI restrikciós endonukleáz enzim elegyéhez mérjük, és az oldatot elkeverjük. A restrikciós endonukleáz enzimek, hacsak másként nem jelezzük, a New England Biolabs, 32 Tozer Road, Beverly, MA 01915 termékei. Az alábbiakban szereplő enzimaktivitás-egységek definíciói megegyeznek a gyártó megfelelő egység-meghatározásaival.

A fentiek szerint eljárva nyert reakcióelegyet 37 °C

hőmérsékleten, 90 percen át inkubáljuk. A reakcióelegyet ezután fenollal és kloroformmal extraháljuk, a BamHI enzimmel emésztett pOW380 plazmid DNS-t nátrium-acetáttal és etanollal kicsapjuk, majd 9 µl vízben felfuszpendáljuk. 1 µl mintafelvívó puffert (25 térfogat% glicerint, 0,05 vegyes% brómfenolkék, 0,05% xilén-cianol) mérünk a DNS-oldathoz, majd a DNS-t 1%-os agaróz gélben addig elektroforetizáljuk, amíg a kívánt 3 kb méretű BamHI restrikciós fragmens világosan elkülönül a többi emésztési terméktől.

Az elektroforetizált DNS-t a gél híg (0,5 µg/ml) etidium-bromid-oldatban való festésével, majd a festett gél hosszúhullámú ultraibolya-fénnyel történő megvilágítással tesszük láthatóvá. A fragmensok helyzetének meghatározása után a 3 kb méretű fragmens előtt egy kis vágást ejtünk a gélen, és a résbe egy Schleicher and Schuell (Keene, NH 03431) DEAE szűrőpapír-szeletet helyezünk. A további elektroforezis során a DNS nem-kovalems módon a DEAE szűrőpapírhoz kötődik. Miután a kívánt fragmens a DEAE szűrőpapírhoz kötődött, a szűrőpapírt eltávolítjuk, és kis sókoncentrációjú pufferral (100 mmól/l nátrium-klorid, 0,1 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsav, 20 mmól/l Tris-sósav, pH=8) mossuk. Ezután a szűrőpapírt egy kisméretű csőben, nagy sókoncentrációjú pufferban (1 mól nátrium-klorid, 0,1 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsav, 20 mmól Tris-sósav, pH=8,0) 65 °C hőmérsékleten, 10 percen át inkubálva eltávolítjuk a DNS-t a DEAE szűrőpapírról. A 65 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után az inkubációs puffert összegyűjtjük, és a szűrőpapírt nagy sókoncentrációjú pufferral mossuk. A mosófolyadékot és az inkubációs puffert a kívánt DNS fragmens kicsapása előtt egyesítjük.

A nagy sókoncentrációjú puffer-DNS-oldat térfogatát úgy állítjuk be, hogy a nátrium-klorid koncentrációja 0,25 mól/l legyen, majd 3 térfogat hideg, abszolút etanol mérünk az oldathoz. Az elegyet összekeverjük, majd jégfürdőben 10–20 percen át inkubáljuk. Az oldatot ezután 15 000 fordulat/perc fordulatszámmal, 15 percen át centrifugáljuk. A maradék só eltávolítása érdekében végzett újabb kicsapás után a DNS csapadékot 70%-os etanollal mossuk, szárítjuk, majd 20 µl TE pufferban feloldjuk: az oldat a kívánt restrikciós fragmenst tartalmazza. A 3 kb méretű DNS fragmens mintegy 0,6 µg-ját mérjük a fentiek szerint eljárva.

B.) A BamHI enzimmel emésztett M13mp19 RF DNS, és az mOW380 fág előállítása

Az M13mp19 RF DNS beszerezhető a New England Biolabs (NEB)-től. Mintegy 2,5 µg-ját 100 µl BamHI pufferban, 1 µl (20 egység) BamHI restrikciós enzimmel, 37 °C hőmérsékleten, 90 percen át emésztjük. A reakcióelegyet fenol:kloroform eleggyel extraháljuk, és a vizes fázisban található DNS-t etanolos lecsapással betöményítjük. A DNS csapadékot 20 µl 0,1 × tömény TE pufferban szuszpendáljuk fel: az oldat a kívánt, BamHI enzimmel emésztett M13mp19 vektor-DNS 2 µg-ját tartalmazza. A fentiek szerint eljárva nyert vektor-DNS-t -20 °C hőmérsékleten tároljuk.

A pOW380 plazmid 3 kb méretű, BamHI restrikciós fragmensének 2 µl-ét, és a BamHI enzimmel emésztett

M13mp19 vektor-DNS 1 µl-ét 20 µl végtérfigatú, a DNS-fragmenseket, 2 µl 10 × tömény ligáz puffert (0,5 mól/l Tris-sósav, pH=7,5; 100 mmól/l magnézium-klorid), 2 µl 5 mmólos adenzin-trifoszfát-oldatot, 1 µl 6 µg/µl koncentrációjú szarvasmarha szérum albumin-oldatot, 12 µl desztillált vizet és 1 µl (1 Weiss-egység) T4 DNS ligáz enzimet (NEB) tartalmazó reakcióelegyben ligáljuk. A reakcióelegyet 18 órán át 15 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A ligált DNS alkotja a kívánt mOW380 fágot, más ligálási reakciótermékekkel együtt.

A kompetens *E. coli* K12 JM109 („Epicurean *Coli*™”) a Stratagene (3770 Tansy Street, San Diego, CA 92121)-től szerezzük be, és az mOW380 fágot tartalmazó ligálási reakcióeleggyel lényegében a gyártó előírásait követve transzformáljuk, azzal a különbséggel, hogy a DNS térfogata 20 µl, és sem a táptalajjal való hígítás, sem az expressziós várakozási idő nem szükséges. A transzformációt követően a sejtszuspenzió 1, 10, 20, 40 és 50 µl-es mintáit 13 × 100 mm-es, csőveként 0,25 ml, logaritmus növekedési fázisban levő *E. coli* K12 JM109 sejtszuspenziót tartalmazó, steril üvegcsővekbe osztjuk szét. E csővekhez 3 ml fedőagart (L-táptalaj, 0,8% agarral kiegészítve; megolvastva, majd 45 °C hőmérsékletre hűtve adagoljuk) mérünk. A sejt – fedőagar-keveréket 40 µg/ml 5-bróm-4-klór-3-indolil-β-D-galaktoziddal (X-gal) és 0,1 mól/l izopropil-tio-β-galaktoziddal (IPTG) kiegészített L-agar táptalaj-lemezekre rétegezzük, és a lemezeket 37 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át inkubáljuk. (Az M13 fággal végzett eljárások részletesebb leírását, illetve magyarázatát lásd az „M13-klonozás és didezoxi-szekvenálás” című felhasználói útmutatóban /Bethesda Research Laboratories (BRL), Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD 20877/). A transzformánsokat a β-galaktozidáz enzimaktivitás inszerciós inaktiválódása (színtelen plakk-fenotípus), valamint a replikatív alakban levő (RF) DNS restrikciós analízise alapján azonosíthatjuk. A szűrővizsgálatok céljából a színtelen plakkokat tartalmazó agar-darabot Pasteur pipetával kiemeljük a fedőagar-rétegből, és plakkonként 3 ml, korai logaritmus növekedési fázisban levő *E. coli* K12 JM109 sejtszuspenzióba mossuk. A tenyészeteket 6–18 órán át, 37 °C hőmérsékleten, levegőztetve inkubáljuk.

Az inkubálást követően külön 1,5 ml-es Eppendorf csővekben minden tenyészetet 1,5–1,5 ml-éből, kiülepítjük a sejteket. A felülúszókat új csővekbe töltjük, és 4 °C hőmérsékleten tároljuk: e felülúszók fág inokulumként szolgálnak. A replikatív alakban levő DNS-t a sejttöledékekből lényegében Birnboim és Doly alkali-kus plazmid-izolálási módszere [Nucl. Acid. Res. 7 (6), 1513–1523 (1979)] szerint eljárva különítjük el, a következő módosításokkal. A leírásban szereplő reagensek mennyiségét arányosan úgy növeljük meg, hogy az I, II és III oldatokból 1,5-szeres térfogatokat használjunk; a tisztított sejtízátumot pedig egyszer, azonos térfogatú kloroformmal extraháljuk. A DNS-t ezután 0,4 térfogat izopropanol hozzáadásával, szobahőmérsékleten, 20 percen át végzett inkubálással kicsapjuk. A

DNS-t centrifugálással összegyűjtjük, majd 0,3 mól/l nátrium-acetátot tartalmazó oldatból, etanollal kicsapjuk. Az RF DNS restrikciós mintázatának elemzését megkönnyíti egy aszimmetrikusan elhelyezkedő ScaI restrikciós felismerőhely: e felismerőhely megjelenése nemcsak a kívánt inszert jelenlétét jelzi, hanem lehetővé teszi az inszert irányultságának megállapítását is az M13 vektor többszörös klonozó helyéhez (MCS) képest. A fentiek szerint eljárva azonosítjuk az *E. coli* K12 JM109/mOW380 törzset: e törzs sejtjeit az mOW380 fág forrásaként használjuk a helyspecifikus mutagenézis során, amint azt az alábbiakban leírjuk.

C.) Az egyszálú mOW380 fág-DNS előállítás, továbbá az mOW381 fág előállítás helyspecifikus mutagenézissel

10 ml, korai logaritmus növekedési fázisban levő *E. coli* K12 JM109 tenyészet 200 µl fág-törzsoldattal (melyet a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva állítunk elő) beoltunk, majd 37 °C hőmérsékleten, levegőztetve, 18 órán át inkubáljuk. A tenyészetet centrifugáljuk, majd az így nyert felülúszót új csőbe töltjük, és újra centrifugáljuk. A felülúszót ismét egy friss csőbe öntjük. 1 ml, 25% polietilén-glikolt (molekulatömege 3500) és 3 mól/l koncentrációban nátrium-kloridot tartalmazó oldatot mérünk a felülúszóhoz, és 15 percen át, szobahőmérsékleten inkubáljuk az oldatot. Az így nyert elegyet 30 percen át, 10 000 fordulat/perc fordulatszámmal centrifugáljuk. A centrifugálás során nyert csapadék az egyszálú mOW380 fágot tartalmazza: a fágcsapadékot 400 µl TE pufferban szuszpendáljuk fel. Az oldatot előbb kloroformmal, majd TE pufferral telített fenollal extraháljuk. A fenolt és a vizes fázist 15 percen át együtt inkubáljuk. Az oldatot ezután kétszer TE pufferral telített fenol:kloroform (1:1, térfogati arány) eleggyel, majd kétszer csak kloroformmal extraháljuk. A DNS-t ezután 0,3 mól/l nátrium-acetátot tartalmazó oldatból kicsapjuk, centrifugálással összegyűjtjük, és az így nyert csapadékot 100 µl 0,1 × tömény TE pufferban szuszpendáljuk fel. A fentiek szerint eljárva előállított oldat 5 µg egyszálú mOW380 fág-DNS-t tartalmaz.

D.) Mutagenézis

A mutagenézis (és az ezt követő a kívánt fágok azonosítása érdekében végzett hibridizációk) során felhasznált egyszálú DNS-fragmenseket automata DNS-szintetizáló készülékkel állítjuk elő, az M13 univerzális primer (egy 15-mer) kivételével: ez utóbbi a BRL terméke. A mutagenézishez felhasznált DNS-fragmenseket a következőképpen jelöljük:

1) STNDE-A: egyszálú, 41 nukleotid hosszúságú, az mOW380 fágban található dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasszal három bázis kivételével homológ DNS; a nem homológ nukleotidok (aláhúzáva) egy NdeI restrikciós felismerőhelyet hoznak létre a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz 1-es helyzetben levő nukleotidjánál. Az STNDE-A DNS nukleotid-sorrendje a következő:

NdeI

5'-GTGGGCACCGTCGTGTCCATATGCTCTCACTGATCCTCTCG-3'.

- 2) STNDE-B: egyszálú, 17 nukleotid hosszúságú DNS; valójában az STNDE-A egy szubfragmense. Nukleotid-sorrendje a következő:

NdeI

5'-TGATCCATATGCTCTCAC-3'

Az STNDE-A DNS 100 pmóljának 5'-felőli végeit egy pmól/μl koncentrációban az egyszálú DNS-t, 10 μl 10 × tömény ligáz puffert, 1000 pmól adenosin-trifoszfátot (ATP), 10 μl, 0,1 mól/l koncentrációjú ditio-treitol-oldatot, 65 μl desztillált vizet és 1 μl (10 Richardson egység) T4 polinukleotid-kináz enzimet (Boehringer-Mannheim Biochemicals /BMB/, 7941 Castleway Drive, P. O. Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250) tartalmazó reakcióelegyben foszforizáljuk (kinázzal kezeljük). A reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten, 30 percen át inkubáljuk: ekkor újabb 1 μl enzimet adagolunk. A reakcióelegyet ezután további 30 percen át inkubáljuk 37 °C hőmérsékleten, majd 68 °C hőmérsékleten 5 percen át inkubálva leállítjuk a reakciót. Az M13 univerzális primer 40 pmóljának 5'-felőli végeit egy hasonló, 40 μl térfogatú reakcióelegyben, azonos mennyiségű enzim felhasználásával foszforizáljuk.

Az egyszálú mOW380 fág-DNS-t lényegében Adelman és munkatársai módszere [DNA 2 (3), 183–193. (1983)] szerint eljárva mutagenizáljuk, amint azt az alábbiakban leírjuk. Az összeolvasztási reakció (annealing) során 500 ng (15 μl, 0,1 × tömény TE pufferban oldott) egyszálú mOW380 fág-DNS-t adunk 8 μl 10 × tömény összeolvasztási puffer (100 mmól/l Tris-sósav, pH=7,5; 1 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsav; 500 mmól/l nátrium-klorid), 4 μk (4 pmól) kinázzal kezelt STNDE-A, 4 μl (4 pmól) kinázzal kezelt M13 univerzális szekvenáló primer és 50 μl víz elegyéhez, az oldatot 80 °C hőmérsékleten, 2 percen át, majd 55 °C hőmérsékleten 5 percen át, végül pedig szobahőmérsékleten 5 percen át inkubáljuk.

A kiegészítő szál szintézise során az összeolvasztott DNS-ek oldatához a következő elegy 120 μl-ét mérjük: 20 μl 10 × tömény Klenow-ligáz puffer (100 mmól/l Tris-sósav, pH=7,5; 1 mmól/l etilén-diamino-tetraecetsav; 500 mmól/l nátrium-klorid); 20 μl, 0,1 mól/l koncentrációjú ditio-treitol-oldat; 20 μl, a mind dezoxi-guanozin-trifoszfátra, mind a dezoxi-adenozin-trifoszfátra, mind timidin-trifoszfátra, mind dezoxi-citidin-trifoszfátra nézve 6,25 mmól/l koncentrációjú oldatból; 20 μl 5 mmól/l koncentrációjú adenosin-trifoszfát-oldat; 120 μl víz és 2,5 μl (12,5 egység) Klenow enzim (BMB). A kiegészítő szál szintézis-reakcióelegyét szobahőmérsékleten 1 órán át, majd 37 °C hőmérsékleten 4 órán át, végül pedig 14 °C hőmérsékleten 18 órán át inkubáljuk.

A kiegészítő szál szintézis-reakcióelegyét egyszer kloroformmal extraháljuk, a DNS-t etanollal és nátrium-acetáttal kicsapjuk, majd centrifugálással összegyűjtjük. A DNS-csapadékot 400 μl 1 × tömény S1 pufferban (0,3 mól/l nátrium-klorid; 3 mmól/l cink-acetát) szuszpendáljuk fel. A DNS-oldat felét -20 °C hőmérsékleten tároljuk; a maradékot pedig 5 db, 1,5 ml-es csőbe osztjuk szét. 4 csőhöz egy-egy μl, 200-szorosára hígított (0,03 egység/μl) S1 nukleáz en-

zimet (BMB) mérünk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten, sorrendben 5, 10, 15 illetve 20 percen át inkubáljuk. A reakciókat úgy állítjuk le, hogy előbb 5–10 μg, hordozóként szolgáló tRNS-t mérünk a reakcióelegyekhez, amjd TE pufferral telített fenol-kloroform eleggyel (1:1, térfogat-arány) extrahálunk. Az S1 nukleáz enzimmel nem kezelt mintát (a negatív kontrollt) szintén extraháljuk. A vizes fázisban levő DNS-t etanollal kicsapjuk, és centrifugálással összegyűjtjük. A DNS-csapadékot egyenként 20 μl vízben oldjuk fel.

A fentiek szerint eljárva nyert, S1 nukleáz enzimmel kezelt DNS-oldatok 10–10 μl-eivel E. coli K12 JM109 sejteket transzformálunk, lényegében a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva, azzal a különbséggel, hogy a táptalaj-lemezek nem tartalmaznak sem X-Gal-t, sem izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidot. A kívánt mutánsokat a nitrocellulóz szűrőpapírhoz kötött fág-DNS-ek és a radioaktív izotóppal jelölt STNDE-B oligonukleotid hibridizációja alapján azonosítjuk, amint azt az alábbiakban leírjuk.

A fág-plakkok megjelenése után a táptalaj-lemezeket 4 °C hőmérsékleten, 1 órán át inkubáljuk, hogy a fedőagar keményebb legyen. Nitrocellulóz szűrőpapírokat fektetünk az 50–200 fág-plakkot tartalmazó, mindkét táptalaj-lemezre, mind a negatív kontroll, mind a 10 percen át, mind pedig a 20 percen át S1 nukleázzal kezelt minták esetében. A szűrőpapírt 1 percen át hagyjuk a baktérium-pázsit felszínén, majd telített 3MMChR szűrőpapírokat (Whatman LabSales, Inc., P. O. Box 1359, Hillsboro, Oregon 97123–1359) felhasználásával 5 percen át 0,1 normál nátrium-hidroxid – 1,5 mól/l nátrium-klorid eleggyel, majd 5 percen át 0,5 mól/l Tris-sósav (pH=7,0) – 3 mól/l nátrium-klorid eleggyel kezeljük. A nitrocellulóz szűrőpapírokat levegőn megszáritjuk, majd vákuumban, 80 °C hőmérsékleten, 30 percen át hevítjük.

A nitrocellulóz szűrőpapírokat 5 percen át, szobahőmérsékleten, 6 × tömény SSC puffert (a 20 × tömény SSC puffer 3 mól/l nátrium-kloridot és 0,3 mól/l nátrium-citrátot tartalmaz); 10 × tömény Denhardt-oldatot (0,2 g polivinil-pirrolidon, 0,2 g szarvasmarha szérum albumin, 0,2 g fikoll 100 ml vízben feloldva); 0,1% nátrium-pirofoszfátot; 0,1% nátrium-dodecil-szulfátot és 10 μg/ml denaturált E. coli kromoszómás DNS-t tartalmazó oldatban előhibridizáljuk. Ezután a szűrőpapírokat 6 × tömény SSC puffert, 10 × tömény Denhardt-oldatot, 0,1% nátrium-pirofoszfátot és 1 pM/65 ml 32-es tömegszámú foszfor-izotóppal jelölt STNDE-B oligonukleotidot tartalmazó oldatban hibridizáljuk. A 32-es tömegszámú foszforizotóppal jelölt STNDE-B oligonukleotidot úgy állítjuk elő, hogy 100 pmól/l STNDE-B oligonukleotid 5'-felőli végeit lényegében az ebben a példában korábban leírtak szerint eljárva foszforizáljuk, azzal a különbséggel, hogy a nem radioaktív adenosin-trifoszfát helyett 70 pmól/l, gamma-helyzetben 32-es tömegszámú foszforizotóppal jelölt adenosin-trifoszfátot (New England Nuclear (NEW), 549 Albany Street, Boston, MA, 02118, Catalog No. NEG-002A) használunk. A hibridizálás után a szűrőpapírokat kétszer 5–5 percen át szobahőmérsékleten, fő-
60
lős mennyiségben levő 6-szor tömény SSC pufferral,

majd 52 °C hőmérsékleten, fölös mennyiségben levő 6 × tömény SSC pufferral, egyenként 20 percen át mossuk. A szűrőpapírokat levegőn megszáritjuk, majd 2 órán át, -70 °C hőmérsékleten, Quanta III^R érzékenységnövelő szűrő (DuPont, Instrument Products, Biomedical Division, Newtown, CN 06470) felhasználásával autoradiografáljuk. A kívánt mutánsokat, azaz az STNDE-B szekvenciával komplementer DNS-szakaszt hordozó fág-plakoknak megfelelő helyzetben a film a szűrőpapírhoz kötött fág-DNS-hez kötődő, radioaktív izotóppal jelzett oligomer hatására megfeketedik. A megfelelő mutáns, az mOW381 fág DNS-ében a várt mutáció létrejöttét a lényegében a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva előállított RF DNS restrikciós elemzésével bizonyítjuk.

E.) A pOW381 plazmid előállításának végső lépései

Habár az mOW381 fág RF DNS-ében a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasza a pOW382 E. coli expressziós plazmid előállítására használt NdeI-BamHI restrikciós fragmenszen található, mégis néha akadályokba ütközik az mOW381 fág RF DNS-ének előállítása a fragmens-izoláláshoz szükséges mennyiségben. A pOW382 E. coli expressziós plazmid előállításának megkönnyítése érdekében előállítjuk a pOW381 köztes plazmidot.

Lényegében a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva elkülönítjük az mOW381 fággal fertőzött E. coli K12 JM109 sejtekből a replikatív formában levő fág-DNS-t. Az mOW381 fág RF DNS-ének 10 µg-ját 1 × tömény BamHI pufferban, BamHI restrikciós endonukleáz enzimmel (10 egység) emésztjük. 37 °C hőmérsékleten, 90 percen át végzett inkubálás után a reakcióelegyet agaróz gélben elektroforetizáljuk, és a 3 kb méretű BamHI fragmenst lényegében a 2. példa A.) pontjában leírtak szerint eljárva elkülönítjük.

Lényegében a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva BamHI enzimmel emésztett pUC8 plazmid-DNS-t állítunk elő (a pUC8 DNS a BRL-től szerezhető be). Az mOW381 fág 3 kb méretű BamHI DNS-fragmensének 5 µl-ét (1 µg) és 1 µl (100 ng) BamHI enzimmel emésztett pUC8 plazmid-DNS-t lényegében a 2. példa B.) pontjában leírtak szerint eljárva ligálunk. A ligált DNS a kívánt pOW381 plazmidot tartalmazza, más ligálási termékekkel együtt. A pOW381 plazmid restrikciós térképe a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz első kodonjánál található, egy további NdeI hasítóhely kivételével azonos a pOW380 plazmid restrikciós térképével.

A kívánt pOW381 plazmidot tartalmazó ligációs reakcióeleggyel kompetens E. coli K12 RR1 Δ M15 (NRRL B-15440, a letét kelte: 1983. május 27.) sejteket transzformálunk. A transzformációs elegy alikvotjait ampicillint (100 µg/ml), X-gal-t (40 µg/ml) és izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidot (0,1 mól/l) tartalmazó L-agar táptalaj-lemezekre szélesztjük. A táptalaj-lemezeket 37 °C hőmérsékleten, 18 órán át inkubáljuk. Az ampicillin-rezisztens, a pUC8 plazmidot kódolt β-galaktozidáz

enzim α-fargmensének inszerciós inaktiválása következtében fehérszínű transzformáns telepeket plazmid-DNS-ük restrikciós elemzésével vizsgáljuk tovább a kívánt pOW381 transzformánsok azonosítása érdekében. A plazmid-DNS-t 3 ml-es tenyészetekből állítjuk elő, lényegében a fentiekben ismertetett, Birnboim és Doly módszerén alapuló, az M13 fággal fertőzött E. coli K12 JM109 sejtüledékekből történő RF DNS előállítására leírt módszer szerint eljárva. Egy transzformáns tenyészetéből a további plazmidkonstrukciók létrehozása érdekében előállítjuk a pOW381 plazmid-DNS-t, lényegében az 1. példában leírtak szerint eljárva.

3. példa

A pOW382 plazmid előállítása

A pOW382 plazmidot a pOW381 plazmid 2,4 kb méretű, a Streptomyces clavuligerus expandáz (dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz) enzimének kódoló DNS-szakaszát tartalmazó, NdeI-BamHI restrikciós fragmensének, és a pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű, NdeI-BamHI restrikciós fragmensének ligálásával állítjuk elő. A pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű NdeI-BamHI fragmense a lambdapL promotert, egy transzlációs aktiváló DNS-szakaszt, a cI857 represszort, egy plazmid replikációs origót és tetraciklin-rezisztenciát biztosító gént kódoló DNS-szakaszt hordoz. A pCZR336 plazmid az emberi növekedési hormon kódoló DNS-szakaszát is tartalmazza. A pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű NdeI-BamHI fragmensén található DNS-szakaszokat a jelen példa A.) pontjában leírtak szerint eljárva állítjuk elő. A pCZR336 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 2. kísérőábrán mutatjuk be.

A.) A pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű NdeI-BamHI restrikciós fragmensének előállítása

A pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű, NdeI-BamHI restrikciós fragmensének legnagyobb részét a pCZR336 plazmidból, egy 5,75 kb méretű XbaI-BamHI restrikciós fragmenszen különítjük el. A pCZR111 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 4. kísérőábrán mutatjuk be.

A pCZR111 plazmidot az E. coli K12 RV308/pCZR111 törzs sejteiből különíthetjük el; e törzs az NRRL-től, az NRRL B-18249 azonosítási szám alapján szerezhető be (a letét kelte: 1987. augusztus 11.). A pCZR111 plazmid rezisztenciát biztosít 10 µg/ml tetraciklinnel szemben, hiányzik belőle továbbá egy ClaI restrikciós felismerőhely.

A pCZR111 plazmidot XbaI és BamHI enzimekkel emésztjük, és a nagy XbaI-BamHI fragmenst agaróz gélből tisztítjuk. A pCZR111 plazmid ezen XbaI-BamHI restrikciós fragmensét egy kétszálú, a foszfortriészter módszer szerint eljárva szintetizált XbaI-BamHI restrikciós fragmenssel ligáljuk, a pCZR336 plazmid 5,8 kb méretű, NdeI-BamHI restrikciós fragmensét nyerve (lásd a 2. ábrát). A kétszálú DNS-fargmens nukleotid-sorrendje a következő:

5'-CTAGAGGGTATTAATAATGTATATTGATTTTAAATAAGGAGGAATAATCA-3'
3'-TCCCATAATTATTACATATAACTAAAATTATTCCTCCTTATTAGTAT-5'

B.) A pOW381 plazmid 2,4 kb méretű, NdeI-BamHI fragszékének elkülönítése

A pOW381 plazmid-DNS mintegy 25 µg-ját (25 µl, 0,1 × tömény TE pufferban oldva) 4 µg 10 × tömény NdeI puffer (100 mmól/l Tris-sósav, pH=7,8; 70 mmól/l magnézium-klorid; 1,5 mól/l nátrium-klorid), 6 µl víz, 3 µl NdeI restrikciós endonukleáz enzim és 3 µl BamHI restrikciós endonukleáz enzim elegyéhez mérjük, és az oldatot összekeverjük. Az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten, 2 órán át inkubáljuk, majd agaróz gélben elektroforetizáljuk. A 2,4 kb méretű NdeI-BamHI fragmenst elkülönítjük az agaróz gélből, és előkészítjük a ligálásra.

C.) A pOW plazmid, illetve az E. coli K12

JM109/pOW382 törzs előállításának befejező lépései

A pCZR336 plazmid-DNS 5,8 kb méretű NdeI-BamHI restrikciós fragszékének mintegy 1 µl-ét (0,5 µg) és a pOW381 plazmid elkülönített 2,4 kb méretű, NdeI-BamHI restrikciós fragszékének 4 µl-ét (0,1 µg) lényegében a 2. példában leírtak szerint eljárva ligáljuk. A ligált DNS alkotja a kívánt pOW382 plazmidot. A pOW382 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 3. kísérőábrán mutatjuk be.

A ligációs reakcióeleggyel kompetens E. coli K12 JM109 sejteket (Stratagene) transzformálunk, lényegében a gyártó előírásait követve. A transzformációs elegyet tetraciklint (10 µg/ml) tartalmazó TY agar táptalajlemezre szélesztjük, és a táptalaj-lemezeket 25–30 °C hőmérsékleten inkubáljuk, meggátolva ezzel a lambdapL promoterről kiinduló transzkripciót. A kívánt transzformánsokat tetraciklin-rezisztens fenotípusok és plazmid-DNS-ük restrikciós elemzése alapján azonosítjuk.

4. példa

Az E. coli sejtek által termelt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitás mérése

A.) Az E. coli K12 JM109/pOW382 törzs sejtjeinek tenyésztése a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitás expressziója érdekében

Egy E. coli K12 JM109/pOW382 transzformáns törzs sejtjeit 30 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át, 500 ml, 10 µg/ml tetraciklinnel kiegészítve, L-jelű folyadék táptalajban, kör mentén mozgó rázógépen (250 fordulat/perc) inkubálva tenyésztjük. A sejteket 100-szorosukra hígítjuk úgy, hogy 10 ml, egy éjszakán át nőtt tenyészetet egy 2,8 l-es lombikban levő, 10 µg/ml tetraciklinnel kiegészített, 990 ml térfogatú, friss táptalajhoz mérünk, és az így nyert tenyészetet 30 °C hőmérsékleten, az előzőekkel azonos feltételek mellett, további 1 órán át inkubáljuk. Ezután az inkubátor hőmérsékletét 42 °C-ra növeljük, és a tenyésztést további 6 és fél órán át folytatjuk. A pOW382 plazmidon található dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő lambdapL promotor ci857 hőmérséklet-érzékeny represszora 42 °C hőmérsékleten inaktíválódik, így 42 °C hőmérsékleten a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz megjelenik a DNS-befogadó gazdasejtekben. Az indukciót követően a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, és az E. coli sejtek által

termelt dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim előnyös forrásként használjuk.

B.) Az expandáz (dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz) enzimaktivitás jelenlétének bizonyítása a 42 °C hőmérsékleten tenyésztett E. coli K12 JM109/pOW382 sejtekben

A 42 °C hőmérsékleten, 6 órán át végzett indukálás után 250 ml E. coli tenyészetet centrifugálással összegyűjtünk, és a sejttöledéket 30 ml, 1 mól/l kálium-kloriddal kiegészített A-jelű oldattal (15 mmól/l Tris-sósav, pH=7,5; 10% etanol; 10% glicerin; 10 mmól/l ditio-treitol) mossuk. A sejteket ezután egyszer, 30 ml, kálium-kloridot nem tartalmazó A-jelű oldattal mossuk, majd 7 ml, 10 mmól/l aszkorbinsavval kiegészített A-jelű oldatban szuszpendáljuk fel. A sejteket 4 °C, vagy még alacsonyabb hőmérsékleten, háromszor 30 másodpercen át ultrahanggal feltárjuk, a készüléket a legnagyobb teljesítményre állítva. Az ultrahangos feltárás közben, több részletben fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) adagolunk, míg végkoncentrációja eléri a 2 mM-t. Dezoxi-ribonukleáz és magnézium-szulfátot mérünk ezután a szuszpenzióhoz, sorrendben 1 µg/ml, illetve 2 mmól végkoncentrációban. Az ultrahanggal kezelt szuszpenziót 40 000 g-n, 30 percen át centrifugáljuk. A felülúszó alkotja a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim nyerstermékét.

A dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitást egy nagynyomású folyadék-kromatográfián alapuló eljárással mérjük. Az expandáz katalizálta reakciót 30 °C hőmérsékleten, 15 percen át végezzük; a reakcióelegy 0,28 mmól/l penicillin-N-t, 0,60 mmól/l α-ketoglutársavat, 0,06 mmól/l vas(II)-szulfátot, 0,05 mmól/l adenozintrifoszfátot és 0,0003–0,003 egység enzimet tartalmaz 1 ml, 50 mmólos Tris-sósav, pH=7,5 oldatban feloldva.

Az enzimreakciót 1 ml etanol hozzáadásával állítjuk le. A csapadékot 4.000 g-n, 5 percen át végzett centrifugálással különítjük el. Az enzimreakció reakciótermékeit tartalmazó felülúszót nagynyomású folyadék-kromatográfiával, az alábbiak szerint vizsgáljuk. Az expandáz-aktivitást úgy határozzuk meg, hogy mérjük a dezacetoxi-cefalosporin-C keletkezését penicillin-N-ből.

A felülúszóból vett 20–100 µl-es mintákban nagynyomású folyadék-kromatográfiával, külső standard felhasználásával mérjük a dezacetoxi-cefalosporin-C mennyiségét. A mérési eljárás reprodukálható: az expandáz katalizálta reakcióelegyet két párhuzamosban vizsgálva a szórás 2%. A vizsgálat eredményeit az alábbiakban foglaljuk össze.

Különböző eredetű enzim-készítmények expandáz és hidroxiláz enzimaktivitása

Az enzim forrása	Specifikus aktivitás egység/(mg fehérje)	
	Expandáz	Hidroxiláz
S. clavuligerus nyerskivonat	0,004	0,00023
Rekombináns E. coli nyerskivonat	0,009	0
granulált készítmény	0,052 ^a	0

^a = Az expandáz enzim kinyerését nem optimalizáltuk.

5. példa

A pPS65 plazmid előállítás

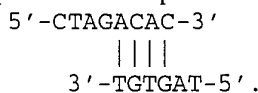
A példában a találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz expressziója szempontjából megfelelően elhelyezkedő, *Penicillium* eredetű IPNS gén promotert hordozó, találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS-vektor, a pPS65 plazmid előállítására szolgáló eljárást ismertetjük. A *Penicillium* IPNS génjének promotere a 0281391 számú, 1988. szeptember 7-én közölt európai szabadalom (melyre az alábbiakban hivatkozunk) 1–13. példái ismertetett pPS60 expressziós plazmid-vektorból különíthetjük el. A pPS60 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 8. kísérőábrán mutatjuk be.

A.) A pPS63 és a pPS64 plazmidok előállítása

A pPS60 plazmid-DNS-t NdeI és BamHI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztjük, és az így nyert két NdeI-BamHI restrikciós fragmens közül a nagyobb agaróz gélből elkülönítjük, és előkészítjük ligálásra. Hasonló módon, a pOW382 plazmid-DNS-t (lásd a fenti 3. példát) NdeI és BamHI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztjük, és az így nyert két NdeI-BamHI restrikciós fragmens közül a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló kisebb ragmenst agaróz gélből elkülönítjük, és előkészítjük ligálásra.

A pPS60 plazmid elkülönített NdeI-BamHI restrikciós fragmensét és a pOW382 plazmid dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló NdeI-BamHI restrikciós fragmensét ezután ligáljuk, előállítva így a pPS63 plazmidot. A pPS63 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 9. kísérőábrán mutatjuk be. Habár a pPS63 plazmidban a *Penicillium* IPNS génjének promotere a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló DNS-szakasz expressziója szempontjából megfelelően helyezkedik el, a promotor 3' és a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz 5'-vége közötti távolság nem optimális.

Az előnyösebb távolság kialakítása érdekében a pPS63 plazmid-DNS-t XbaI és NdeI restrikciós endonukleáz enzimekkel emésztjük, és az így nyert NdeI-XbaI enzimekkel emésztett pPS63 DNS-t az alábbiakban bemutatott felépítésű kapcsoló DNS-sel ligáljuk. A kapcsoló DNS felépítése a következő:



A ligált DNS-ben olyan plazmidok találhatók, melyekben a pPS63 plazmidban a *Penicillium* promotor 3' és a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz 5'-vége között található kis XbaI-XbaI és XbaI-NdeI restrikciós fragmenseket a fenti kapcsoló DNS-szakasz helyettesíti. Egy ilyen plazmidot restrikciós elemzéssel és DNS-szekvenálással azonosítunk: ezt a plazmidot pPS64-gyel jelöljük. A DNS nukleotid-sorrendjének vizsgálatával kimutatjuk, hogy több, mint egy kapcsoló DNS épül be a plazmidba, így a plazmid-DNS-t a nem-kívánt kapcsoló DNS-ek eltávolítása érdekében XbaI enzimmal emésztjük, majd ligáljuk. A pPS64 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 10. kísérőábrán mutatjuk be.

B.) A pPS65 plazmid előállítása az *amdS* génnek a pPS64 plazmidba történő beépítésével

A pPS64 plazmidot a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitás *Penicillium* DNS-befogadó gazdaszervezetekben történő kifejezésére használhatjuk. A pPS64 plazmid azonban nem hordoz szelekciós marker gént, ám – amint azt az alábbiakban bemutatjuk – könnyen módosíthatjuk egy ilyen marker beépítésével. Az *Aspergillus nidulans* *amdS* génje a találmány szerinti *Penicillium* DNS-vektorok előnyös szelekciós markere: ez a gén az alábbiakban ismertetett pPS51 plazmidból különíthető el.

B.) (i) A pPS51 plazmid előállítása

15 15 µg pMLC12 plazmid-DNS-t (11. ábra; NRRL B-18097, a letét kelte: 1986. augusztus 8.) 5 µl 10 × tömény EcoRI puffer és 40 µl víz elegyében feloldunk. 5 µl (50 egység) EcoRI restrikciós endonukleáz enzimet mérünk a DNS-oldathoz, és az így nyert reakcióelegyet a részleges emésztés elérése érdekében 37 °C hőmérsékleten, 3 percen át inkubáljuk. A reakciót pufferolt fenollal végzett extrakcióval állítjuk le, majd a vizes fázist kloroformmal extraháljuk. A pMLC12 plazmid két EcoRI hasítóhelyet hordoz. A részleges emésztéssel elérni kívánt egyszerű EcoRI hasításnak a lacZα fragmensben, és nem a CAT génben kell bekövetkeznie. A fenti EcoRI hasítás egy keveréket eredményez: a keverékben hasítatlan; a nem-kívánt helyzetben egyszerűen hasított; a kívánt helyzetben egyszerűen hasított, és mindkét helyen hasított pMLC12 plazmid-DNS molekulák találhatók (a kétszeres hasítás az eredeti, 2,7 kb méretű molekulánál kisebb fragmenseket eredményez). Az EcoRI enzimmal emésztett pMLC12 plazmid-DNS-t kicsapjuk, centrifugálással összegyűjtjük, 50 µl TE pufferban feloldjuk, majd 0,8%-os preparatív agaróz géltre visszük. A teljes hosszúságú (azaz 2,7 kb méretű) lineáris molekulákat elkülönítjük.

Az EcoRI enzimmal részlegesen emésztett pMLC12 DNS-t 5 µl 10 × tömény SalI puffer és 40 µl víz elegyében feloldjuk. 5 µl (50 egység) SalI restrikciós endonukleáz enzimet mérünk az EcoRI enzimmal linearizált pMLC12 plazmid-DNS-hez, és az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten, 2 órán át inkubáljuk. A pMLC12 plazmid egyetlen SalI hasítási helye 24 bázispárnnyira található a pMLC12 plazmid lacZα fragmensében levő EcoRI hasítási helytől. Az EcoRI enzimmal részlegesen emésztett pMLC12 plazmid-DNS SalI enzimmal végzett teljes emésztése eredményeként tehát 4 DNS fragmens keletkezik; a kívánt 2,7 kb méretű molekula, egy 24 bp méretű, egy 0,6 kb méretű és egy 1,9 kb méretű DNS-molekula. A DNS-molekulákat 0,8%-os agaróz gélben méret szerint frakcionáljuk. A közel teljes hosszúságú, 2,7 kb méretű lineáris molekulát elkülönítjük.

55 Az *Aspergillus nidulans* acetamidáz génjét a p3SR2 plazmid 5,0 kb méretű EcoRI-SalI restrikciós fragmensén különíthetjük el. 10 µg p3SR2 plazmid-DNS-t (12. ábra; NRRL B-18182, a letét kelte: 1987. február 26.) 5 µl 10 × tömény EcoRI puffer és 40 µl víz elegyében feloldunk 5 µl (50 egység) EcoRI restrikciós endonukleáz enzimet

mérünk a DNS-oldathoz, és az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten, 2 órán át inkubáljuk. A reakciót pufferelt fenollal végzett extrakcióval állítjuk meg, majd a vizet fázist kloroformmal extraháljuk. Az EcoRI enzimmel emésztett p3SR2 plazmid-DNS-t kicsapjuk, centrifugálással összegyűjtjük, majd 5 µl 10 × tömény SalI puffer és 40 µl víz elegyében felszuszpendáljuk. 5 µl (50 egység) SalI restrikciós endonukleáz enzimet mérünk a DNS-oldathoz, és az így nyert reakcióelegyet 37 °C hőmérsékleten, 2 órán át inkubáljuk. A fenti emésztésekkel nyert két DNS-fragmenst 0,8%-os preparatív agaróz gélben méret szerint frakcionáljuk. A 4,3 kb méretű fragmens a pBR322 DNS-nek felel meg, míg az 5 kb méretű másik fragmens az *Aspergillus nidulans* acetamidáz (*amdS*) génjét hordozza. Az 5 kb méretű EcoRI-SalI fragmenst elkülönítjük. Az így nyert 3 µg, 5,0 kb méretű EcoRI-SalI DNS-fragmenst 5 µl vízben oldjuk fel.

Az EcoRI és SalI enzimekkel emésztett pMLC12 plazmid-DNS 1 µl-ét és a p3SR2 plazmid 5,0 kb méretű EcoRI-SalI restrikciós fragmensének 4 µl-ét 2 µl 10 × tömény ligáz puffer, 2 µl T4 DNS ligáz és 11 µl víz elegyéhez mérjük. Az így nyert ligálási reakcióelegyet 15 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át inkubáljuk. A ligált DNS más, hasonló ligálási termékek mellett a kívánt pPS51 plazmidot tartalmazza.

A fenti ligációs eleggyel *E. coli* K12 C600 (ATCC 33525) sejteket transzformálunk. A transzformációs elegy alikvotjait 25 µg/ml kloramfenikollal kiegészített L-jelű agar táptalaj-lemezekre szélesztjük. A táptalaj-lemezeket 37 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át inkubáljuk. Az inszert nélküli plazmidokat hordozó telepeket, mint például az *E. coli* K12 C600/pMLC12 transzformánsokat, és az inszertet tartalmazó plazmidot hordozó telepeket, mint az *E. coli* K12 C600/pPS51 transzformánsokat lényegében Echardt módszere szerint eljárva különböztetjük meg egymástól. Azonosítunk egy inszertet tartalmazó plazmidot hordozó telepet. Az ebből a telepől elkülönített plazmid-DNS-t restrikciós analízissel jellemezve vizsgáljuk az 5,0 kb méretű, az *Aspergillus nidulans* *amdS* génjét hordozó EcoRI-SalI restrikciós fragmens jelenlétét: a plazmid szerkezete megegyezik a kívánt pPS51 plazmid várt szerkezetével. A pPS51 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 13. kísérőábrán mutatjuk be.

5' -CGAGCCAACATCCTGACTATAAGCTAACACAG-3'
 |||||
 3' -TCGGTTGTAGGACTGATATTCGATTGTGTCAT-5'.

A pPS67 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 6. kísérőábrán mutatjuk be.

A pPS67 plazmidot egyszerűen módosíthatjuk úgy, hogy *Penicillium* és *Aspergillus* DNS-befogadó gazdaszervezetekben használható szelekciós marker géneket hordozzon. A pPS67 plazmidot EcoRI restrikciós endonukleáz enzimmel emésztjük, majd a pPS51 plazmid 5,65 kb méretű, *amdS* gént hordozó EcoRI restrikciós fragmensével ligálva előállítjuk a pPS71 és a pPS72 plazmidokat. A pPS71 és a pPS72 plazmidok egyaránt az *amdS* gént hordozzák, és mindössze az 5,65 kb méretű, *amdS* gént tartalmazó EcoRI restrikciós frag-

B.) (ii) A pPS65 és a pPS66 plazmidok előállításának befejező lépései

Az *amdS* gént a pPS51 plazmidból egy 5,65 kb méretű EcoRI restrikciós fragmenssel különítjük el. Ezt az 5,65 kb méretű DNS-fragmenst a pPS64 plazmid nagy EcoRI restrikciós fragmensével ligáljuk, a kívánt pPS65 plazmidot állítva elő. A pPS65 plazmid restrikciós és funkcionális térképét az 5. kísérőábrán mutatjuk be.

Mint ahogy a pPS51 plazmid *amdS* gént tartalmazó, 5,65 kb EcoRI restrikciós fragmenssel mindkét irányultsággal ligálódhat a pPS64 plazmid nagy EcoRI restrikciós fragmensével, így a fentebb leírt ligálás során a találmány szerinti pPS66 plazmid is létrejön. A pPS66 és a pPS65 plazmid mindössze az *amdS* gént tartalmazó, 5,65 kb méretű EcoRI restrikciós fragmens irányultságában különbözik.

A *Penicillium* sejtekbe történő plazmid-DNS bejutatására szolgáló eljárást a 8. példában ismertetjük. Bár a pPS63, a pPS64, a pPS65 és a pPS66 plazmidok egyaránt alkalmasak a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitás expressziójára *Penicillium* sejtekben, csak a pPS65 és a pPS66 plazmidok hordozzák az *amdS* szelektálható marker gént.

6. példa

A pPS67, a pPS71 és a pPS72 plazmidok előállítása

Az e területen járatos szakemberek jól tudják, hogy a *Penicillium* IPNS génje promoterének felhasználása pusztán szemlélteti a találmány szerinti eljárást; bármely promoter használható a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz kódoló szakasz expressziójára. A pPS67 plazmid azt példázza, hogy az *Aspergillus nidulans* *amdS* génjének promoterét is felhasználhatjuk a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén expressziójára *Penicillium*, *Aspergillus* vagy bármely más, olyan mikroorganizmus sejtjeiben, ahol a promoter működőképes.

A pPS67 plazmidot úgy állítjuk elő, hogy az NdeI enzimmel emésztett pOW382 plazmidot, a pPS51 plazmid 745 bp méretű, az *amdS* promotert hordozó restrikciós fragmensét és a következő nukleotid-sorrendű kapcsoló DNS-t ligáljuk:

mens irányultságában különböznek. A pPS71 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 14. kísérőábrán mutatjuk be.

A *Penicillium* sejteknek a találmány szerinti DNS vektorokkal történő transzformálására szolgáló eljárást a 8. példában ismertetjük.

7. példa

A pPS69 plazmid előállítása

A rekombináns fehérjék expresszióját úgy optimalizálhatjuk, hogy a rekombináns fehérjék kódoló DNS-szakaszt olyan szabályozó DNS-szakaszok szabályozá-

sa alá helyezzük, melyek ugyanabból a fajtából származnak, mint amelyben a rekombináns fehérjét termeltetni kívánjuk. Az ilyen szabályozó szakaszok közé tartoznak a gén 5'-vég felőli nem-kódoló szakaszában található promoterek, illetve a gén 3'-vég felőli nem-kódoló szakaszában elhelyezkedő terminátorok. A *Penicillium* sejtekben előnyösen felhasználható dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS vektorban, a pPS65 plazmidban a *Streptomyces clavuligerus* eredetű dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz gén kódoló szakasza csak a *Penicillium* IPNS génjének 5'-vég felőli nem-kódoló szakaszában található szabályozó DNS-szakaszok szabályozása alatt áll. A pPS69 plazmid a mind 5', mind pedig a 3' vég felőli szabályozó DNS-szakaszokat tartalmazó, *Penicillium* sejtekben használható, találmány szerinti dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS-vektorok példája.

A.) A pPS68 köztes plazmid előállítása

A pLC2 plazmidot használjuk a *Penicillium* IPNS génje 3'-vég felőli szabályozó DNS-szakaszának forrásul. Az *E. coli* K12 JM109/pLC2 törzs liofilezett tenyészetét az American Type Culture Collection, Rockville, Maryland törzsgyűjteményéből, az ATCC 53334 azonosítási szám alapján szerezzük be (a letét kelte: 1985. november 20.). A pLC2 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 15. kísérőábrán mutatjuk be.

A pLC2 plazmid-DNS-t PstI restrikciós endonukleáz enzimmel emésztjük, az 1,1 kb méretű, a terminált hordozó restrikciós DNS-fragmenst elkülönítjük, az egyszerű, túlnyomó 3'-végek eltávolítása érdekében mungo babból származó nukleáz enzimmel kezeljük, majd előkészítjük a ligálásra. A pPS64 plazmidot ezután KpnI restrikciós endonukleáz enzimmel emésztjük, mungo babból származó nukleáz enzimmel kezeljük, és előkészítjük a ligálásra.

A KpnI enzimmel emésztett, nukleázzal kezelt pPS64 plazmid-DNS-t ezután a pLC2 plazmid 1,1 kb méretű, a 3'-vég felőli szabályozó DNS-szakaszokat hordozó, nukleázzal kezelt PstI restrikciós fragmensével ligáljuk. A ligálással a pPS68 plazmidot állítjuk elő. Míthogy az 1,1 kb méretű DNS-fragmens két különböző irányultsággal ligálódhat a pPS64 plazmid-DNS-sel, és csak az egyik irányultságú beépülés eredményezi a kívánt pPS68 plazmidot, restrikciós analízissel azonosítjuk a kívánt plazmidot. A pPS68 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 16. kísérőábrán mutatjuk be.

A pPS68 plazmid *Penicillium* DNS-befogadó gázdasejtekben alkalmas a dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziójára, ám nem tartalmaz szelektálható markert. Szelekciós markert azonban egyszerűen beépíthetünk a plazmidba. Így például, a pPS68 plazmid-DNS-t EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztjük, majd a pPS51 plazmid 5,65 kb méretű, az amdS gént hordozó EcoRI restrikciós fragmensével ligáljuk. A ligálással a pPS69 és a pPS70 plazmidokat állítjuk elő; e két plazmid mindössze az 5,65 kb méretű, az amdS gént hordozó EcoRI restrikciós fragmens irá-

nyultságában különbözik. A pPS69 plazmid restrikciós és funkcionális térképét a 7. kísérőábrán mutatjuk be. A *Penicillium* sejteknek a találmány szerinti DNS-vektorokkal történő transzformálására szolgáló eljárást a 8. példában ismertetjük.

8. példa

A *Penicillium* sejtek genetikai transzformációja

A.) A *Penicillium chrysogenum* törzsek

A transzformációhoz a *Penicillium* törzset az American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852 törzsgyűjteményéből, az ATCC 9480 azonosítási szám alapján szerezzük be. Más *Penicillium chrysogenum* törzsek, vagy bármely más, a penicillin-G vagy a penicillin-V nagyobb mennyiségben való termelése céljából az ATCC 9480 törzsből mutációval, szelekcióval vagy egyéb, genetikai törzsfeljesztési eljárással előállított ipari törzs előállítható és egyaránt használható transzformánsok előállítására a találmány szerinti DNS-vektorok és plazmidok felhasználásával.

B.) Azonos biológiai jellemzőkkel jellemezhető inkulumok előállítása a sejtek tenyésztése céljából

Ahhoz, hogy a *Penicillium chrysogenum* sejteket hatékonyan transzformálhassuk, a sejtek sejtfalát eltávolítva stabil protoplasztokat kell előállítanunk. Az ilyen protoplasztok előállításához előnyös azonos biológiai jellemzőkkel jellemezhető inkulumokból kiindulunk. A sejtenyészetek előállítása másképpen ugyanis nem reprodukálható, és igen sok időt vesztegetünk el a nem megfelelő vagy nem elegendő mennyiségű *P. chrysogenum* sejtekből kísérve meg a protoplaszt-képzést.

Egy akár liofilizált, akár folyékony nitrogénben tárolt, majd szobahőmérsékleten felmelegített vegetatív sejteket (10^9 telepképző egység 1,0 ml tároló oldatban [a tároló oldat összetétele: 5% laktóz, 10% glicerin, 0,1% Tween 80] tartalmazó ampulla tartalmát 1,0 ml steril só-oldatban hígítjuk. E szuszpenzió 0,1 ml-eivel 20 db, sporulációs táptalajból készült ferde agart oltunk (a sporulációs táptalaj: laktóz 15 g/l; kukoricafehérje 2,5 g/l; pepton 5,0 g/l; nátrium-klorid 4,0 g/l; magnézium-szulfát 7 g/l; víz 0,5 g/l; kálium-dihidrogén-foszfát 0,6 g/l; vas-klorid 6 g/l; víz 0,005 g/l; réz-szulfát 5 g/l; az elegy pH-ját 7,0-ra állítjuk; agar 30,0 g/l; 20 percen át, 8,16 atmoszféra nyomáson autoklávban sterilizzuk).

Minden ferde agar (15 cm 2,5 cm) 25 ml szilárd táptalajt tartalmaz. A ferde agar felszínén egyenletesen szétkenjük az oltóanyagot, majd a tenyészetet 25 °C hőmérsékleten addig inkubáljuk, amíg a micéliumok alkotta folytonos mikroorganizmus-pázsit megjelenik, és spórázni kezd (a legtöbb törzs esetében ez az időtartam egy hét). Az egy ferde agaron nőtt tenyészetet 10 ml steril, folyékony tenyésztő táptalajban felfuszpendáljuk, majd a szuszpenzióval 106 ml folyékony tenyésztő táptalajt oltunk. A felfuszpendált sejtekkel oltott tenyészetet 25 °C hőmérsékleten, 18 órán át, 285 fordulat/perc fordulatszámmal, 2,54 cm kiterésű, kör mentén mozgó rázógépen inkubáljuk.

A folyékony tenyésztő táptalajt az alábbiak szerint el-
járva készítjük: 100 ml A-jelű oldatot (36 g/l szacharóz;
7,5 g/l L-aszparagin; 15 g/l kálium-dihidrogén-foszfát;
21 g/l dikálium-hidrogén-foszfát; 0,75 g/l nátrium-szul-
fát; 0,18 g/l magnézium-szulfát 7 víz; 0,06 g/l kalcium-
klorid; 1 ml/l só-oldat; az elegy pH-ját nem állítjuk) töl-
tünk egy 500 ml térfogatú lombikba; a lombikot a keres-
kedelmi forgalomban kapható záródugóval lezárjuk,
majd 121 °C hőmérsékleten, 20 percen át autoklávban
sterilezzük. A folyékony tenyésztő táptalaj elkészítésekor
2 ml B-jelű oldatot (108 g/l glükóz), és 4 ml C-jelű olda-
tot (25 g/l szacharóz; 12,5 ml kukoricalekvár/4 vegyes%
nitrogén; 5,5 g/l ammónium-acetát; 5 g/l kalcium-kar-
bonát; az oldat pH-ját kálium-hidroxiddal 6,5-re állítjuk,
majd 121 °C hőmérsékleten 20 percen át autoklávban
sterilezzük) adagolunk az A-jelű oldathoz.

C.) *Penicillium* protoplasztok előállítása

Egy 24 órás tenyésztéből szűrővel (Whatman No.
1 szűrőpapírt helyezve egy Buchner tölcserbe, vákuu-
mot alkalmazva) összegyűjtjük a sejteket, majd puffer-
ban (0,01 mól/l Tris-/hidroximetil-/amino-metán-hid-
roklorid; 0,01 mól/l magnézium-szulfát; 0,01 mól diti-
otreitol; 1,0 mól/l kálium-klorid; az oldat pH-ját sósav-
val 7,0-ra állítjuk) felszuszpendáljuk azokat. A puffer
mennyiségét úgy választjuk meg, hogy 1 g sejt/50 ml
puffer sejt-végkoncentrációt érjünk el. A sejtuszpenzi-
ót 250 ml-es lombikban, 29–30 °C hőmérsékleten,
10 percen át, 140 fordulat/perc fordulatszámmal,
2,54 cm kitérésű, kör mentén mozgó rázógépen, víz-
fürdőben inkubáljuk. A ditiotreitolal kezelt sejteket
centrifugálással összegyűjtjük, majd 50 ml enzim-ol-
datban (10 mg/ml Novozym, Novo Industri A/B Bags-
vaerd, Dánia; 0,01 mól/l Tris-/hidroximetil-/amino-
metán-hidroklorid; 0,01 mól/l magnézium-szulfát;
0,01 mól/l ditiotreitol; 1,00 mól/l kálium-klorid; az ol-
dat pH-ját sósavval 5,8-ra állítjuk), 250 ml-es lombik-
ban felszuszpendáljuk. E sejtuszpenziót 29–30 °C
hőmérsékleten, 15 percen át, 140 fordulat/perc ford-
ulatszámmal, 2,54 cm kitérésű, kör mentén mozgó rázó-
gépen, vízfürdőben inkubáljuk. Az enzimmel kezelt
sejteket 1240 g-n 6 percen át centrifugáljuk, és az így
nyert üledéket pufferban (0,01 mól/l Tris-/hidroxime-
til-/amino-metán-hidroklorid; 0,01 mól/l magnézium-
szulfát; 1,00 mól/l kálium-klorid; az oldat pH-ját só-
savval 7,0-ra állítjuk) felszuszpendáljuk. A szuszpenzi-
ót előbb 950 g-n 6 percen át centrifugáljuk. Az így
nyert üledéket ugyanezen pufferban szuszpendáljuk
fel, és a szuszpenziót 700 g-n, 6 percen át centrifugál-
juk. Az így nyert üledéket ugyanezen puffer 5 ml-ében
szuszpendáljuk fel. E szuszpenzió elsősorban nagy
protoplasztokat és ozmótikusan érzékeny, bizonyos
mennyiségű sejtállal még rendelkező sejteket tartal-
maz. A fenti eljárással eltávolított kisméretű protop-
lasztokkal összehasonlítva a sejtállal regenerálására ké-
pes protoplasztok, valamint az életképes, ozmótikusan
stabil sejtek aránya magasabb a fenti szuszpenzió nagy
protoplasztjainak, és ozmótikusan érzékeny sejtjeinek
esetében. A sejtuszpenziót pufferral 2×10^8 sejt/ml
sejtkoncentráció-érték eléréséig hígítjuk.

D.) Eljárás *Penicillium* protoplasztok transzformá- lására

Minden transzformáció plazmid-DNS esetében az
ozmótikusan érzékeny *Penicillium chrysogenum* sejt-
szuszpenzió 0,1 ml-éhez (mintegy 2×10^7 sejthez)
10 µl, 50 mmól/l koncentrációjú kalcium-klorid-olda-
tot, 25 µg, 5–15 µl TE pufferban oldott plazmid-DNS-t
és 0,9 ml, frissen elkészített polietilén-glikol 4000 (ba-
ker, 40 vegyes%, ozmótikusan stabilizált pufferban fel-
oldva) oldatot mérünk. Az elegyet vortexszel elkever-
jük, 10 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk,
700 g-n 2 percen át centrifugáljuk, majd vortexszel is-
mét elkeverjük. Az elegy két, 0,5 ml térfogatú alikvot-
ját ozmótikusan stabilizált acetamid agar táptalajra
(1,7 g/l aminosav- és ammónium-szulfát-mentes élesz-
tő nitrogén bázis; 125 g/l szacharóz; 0,738 g/l aceta-
mid; 1,27 g/l kalcium-klorid; és 22 g/l Noble agar)
szélesztjük. A transzformációs elegyben jelenlevő vala-
mennyi életképes sejt számának meghatározása érde-
kében a transzformációs elegy alikvotjait olyan tápta-
lajra szélesztjük, amelyben az acetamidot azonos molá-
ris mennyiségű ammónium-szulfáttal helyettesítjük. 7–
10 nappal a transzformáció után az acetamidot tartal-
mazó agar táptalajon a továbbtenyésztésre alkalmas
méretű transzformánsok telepek jelennek meg. Az abortív
transzformánsokat könnyen megkülönböztethetjük a
stabil transzformánsoktól, minthogy az abortív transz-
formánsok acetamidot tartalmazó friss táptalajon to-
vábbtenyésztve nem növekednek. Az acetamidáz gént
tartalmazó plazmiddal transzformált sejtek a transzfor-
mációt követő 4–5. napra képeznek jól látható telepe-
ket.

E.) A *Penicillium* transzformánsok vizsgálata

Az amdS gént hordozó, találmány szerinti DNS-
vektorokkal transzformált *Penicillium* transzformánsok
a nem-transzformált DNS-befogadó *P. Chrysogenum*
törzs (így például az ATCC 9480) sejt kivonataiban ki-
nem mutatható acetamidáz enzimet (az amdS gén ter-
mekét) expresszálnak. Ez az enzim lehetővé teszi,
hogy a transzformáns törzsek az acetamid hidrolízisé-
ből származó ammóniát felhasználva növekedjenek, ha
más nitrogénforrás nincs jelen a táptalajban. A talá-
lmány szerinti *Penicillium* transzformánsok dezacetoxi-
cefalosporin-C szintetáz enzimet is expresszálnak.

A stabil transzformánsok nagy molekulásúlyú
DNS-ükben hordozzák a transzformáló DNS-t. A
DNS-próbák, így például a dezacetoxi-cefalosporin-C
szintetáz kódoló DNS-szakasza, vagy az acetamidáz
gént tartalmazó, *Aspergillus* sejtekből származó DNS-
fragmensek a transzformánsok nagy molekulásúlyú
DNS-éhez hibridizálnak, még a transzformánsok nem-
szelektív táptalajon (ahol a nitrogénforrás ammónia)
történt többszöri tenyésztése után is. A transzformán-
sok transzformáns fenotípusukat (a dezacetoxi-cefalos-
porin-C szintetáz-termelést és, ha az amdS gént hordo-
zó DNS-vektort használtunk, az acetamidon, mint
egyetlen nitrogénforráson való növekedés képességét)
úgyis megőrzi a nem-szelektív táptalajon vég-
zett tenyésztések után is.

Az acetamidáz gént hordozó dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz expressziós DNS-vektorok különösen előnyösen használhatók gének beépítésére *Penicillium chrysogenum* sejtek genomjába, minthogy nem szükséges speciális, például auxotróf DNS-befogadó gazdatorzseket létrehozunk, hiszen a vad típusú *P. chrysogenum* sejtek nem képesek az acetamidon, mint kizárólagos nitrogénforráson növekedni. Az auxotróf marker tulajdonságoknak a transzformáló plazmidon található génnel történő komplementálásán alapuló transzformációs rendszerek nem rendelkeznek ezzel az előnnyel. A nagy mennyiségű penicillin termelésére szelektált *P. chrysogenum* törzsek auxotróf markerrel is rendelkező származék-törzseinek előállítása során leggyakrabban pleiotróp mutációk kapcsolódnak az auxotróf tulajdonsághoz. Ezek a mutációk rendszerint kisebb mennyiségű penicillin termelését eredményezik [MacDonald és munkatársai, *J. Gen. Microbiol.*, 33, 365–374. (1963)]

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzim magasfokú kifejezésére rekombináns DNS-befogadó gazdasejtekben,
azzal jellemezve, hogy
 - a) a nevezett DNS-befogadó gazdasejtben működőképes promotert, és
 - b) a *Streptomyces clavuligerus* dezacetoxi-cefalosporin-C szintetáz enzimaktivitását kódoló, a fent em-

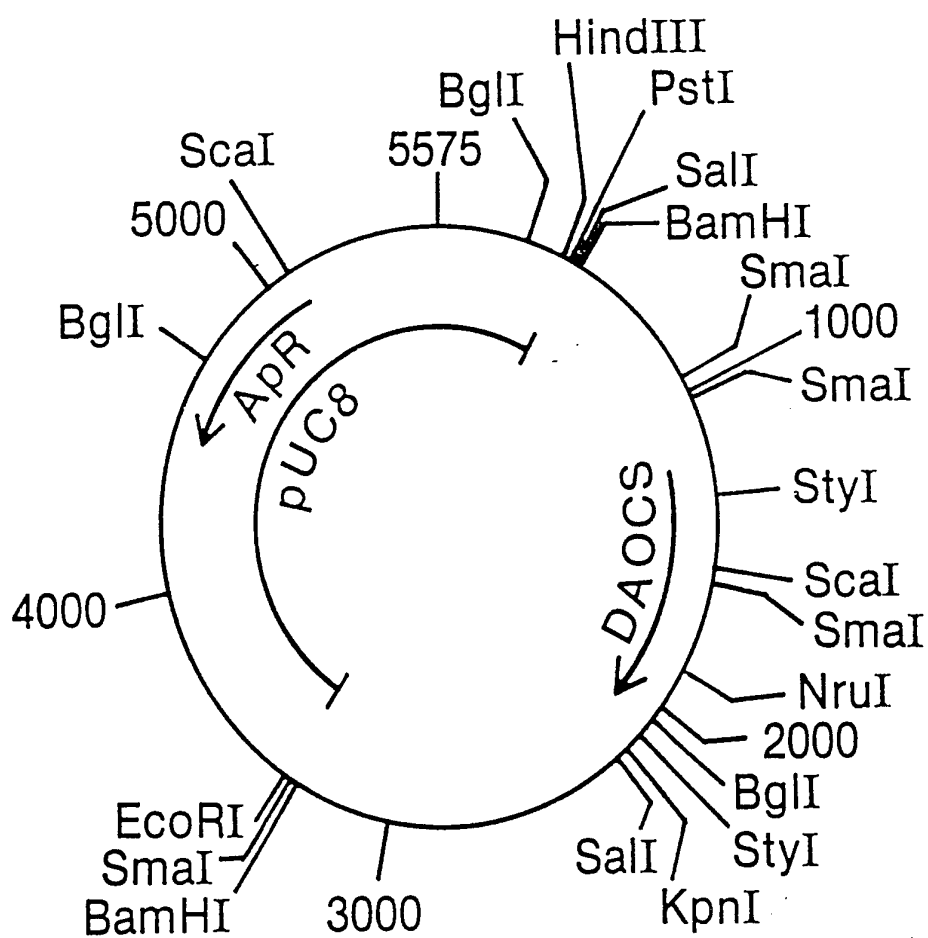
lített promoter szabályozta expresszió szempontjából megfelelően elhelyezkedő DNS-szakaszt tartalmazó, rekombináns expressziós DNS-vektort hordozó gazdasejtet

- 5 a génexpresszió szempontjából megfelelő körülmények között tenyésztünk, és kívánt esetben a keletkezett terméket elválasztjuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként *E. coli* törzset vagy valamely *Cephalosporium*, *Streptomyces*, *Aspergillus* vagy *Penicillium* törzset használunk.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként *E. coli*-t alkalmazunk.
- 15 4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként a *Streptomyces* genusba sorolható valamely törzset alkalmazunk.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként a *Penicillium* nemzetségbe sorolható valamely törzset alkalmazunk.
- 20 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként az *Aspergillus* nemzetségbe sorolható valamely törzset alkalmazunk.
- 25 7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-befogadó gazdasejtként a *Cephalosporium* nemzetségbe sorolható valamely törzset alkalmazunk.
- 30

A pOW380 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.1

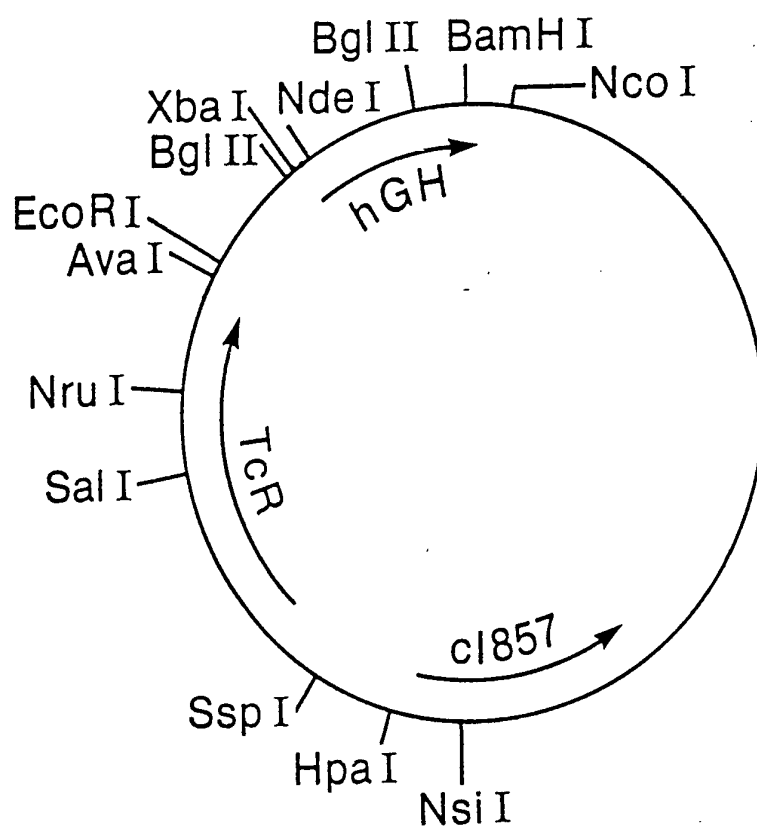
(~5.6 kb)



A pCZR336 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.2

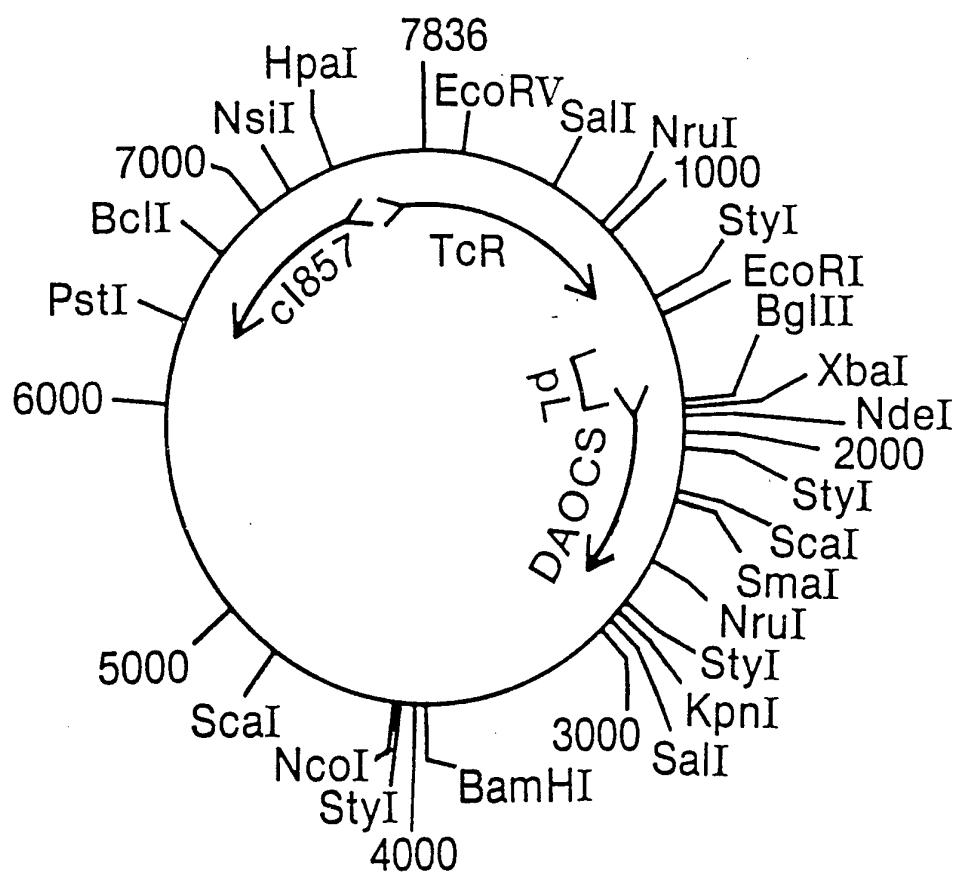
(6400 bp)



A pOW382 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.3

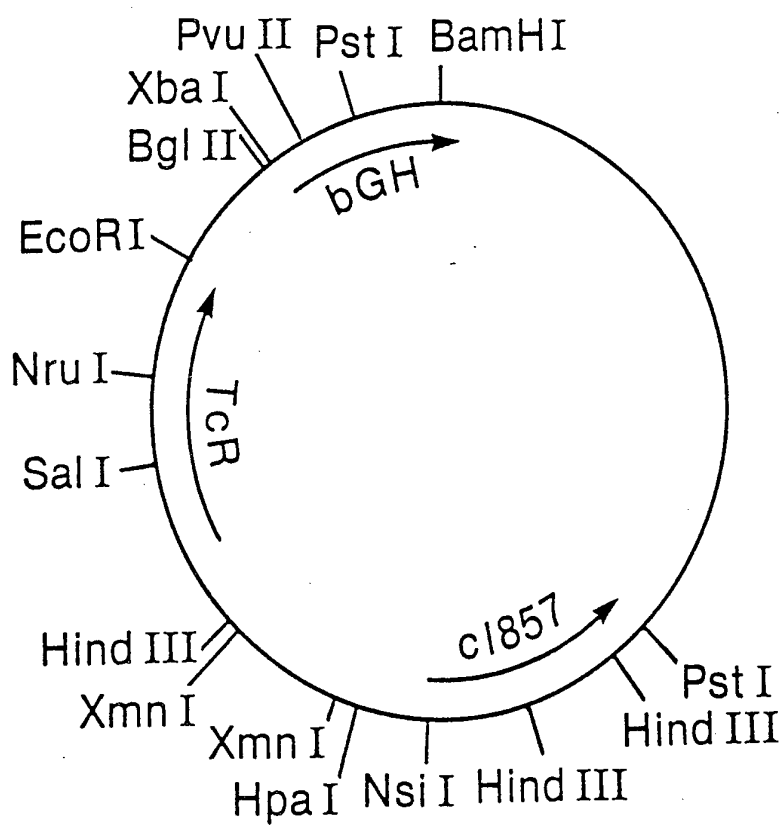
(~7.8 kb)



A pCZR111 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

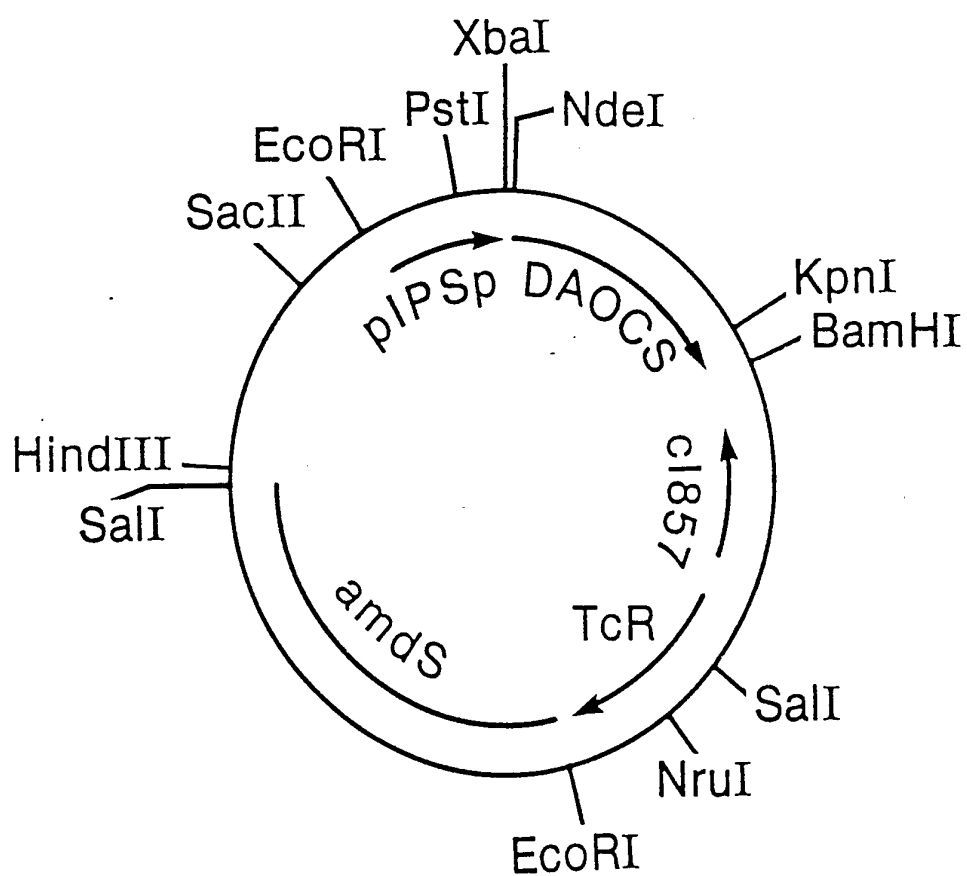
FIG.4

(6395 bp)



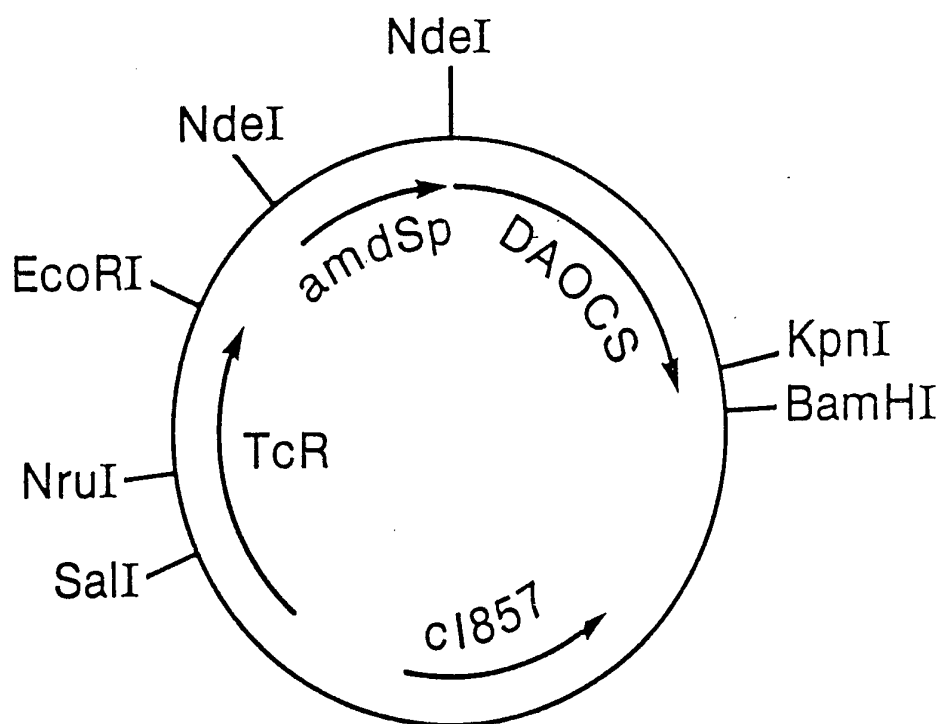
A pPS65 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.5



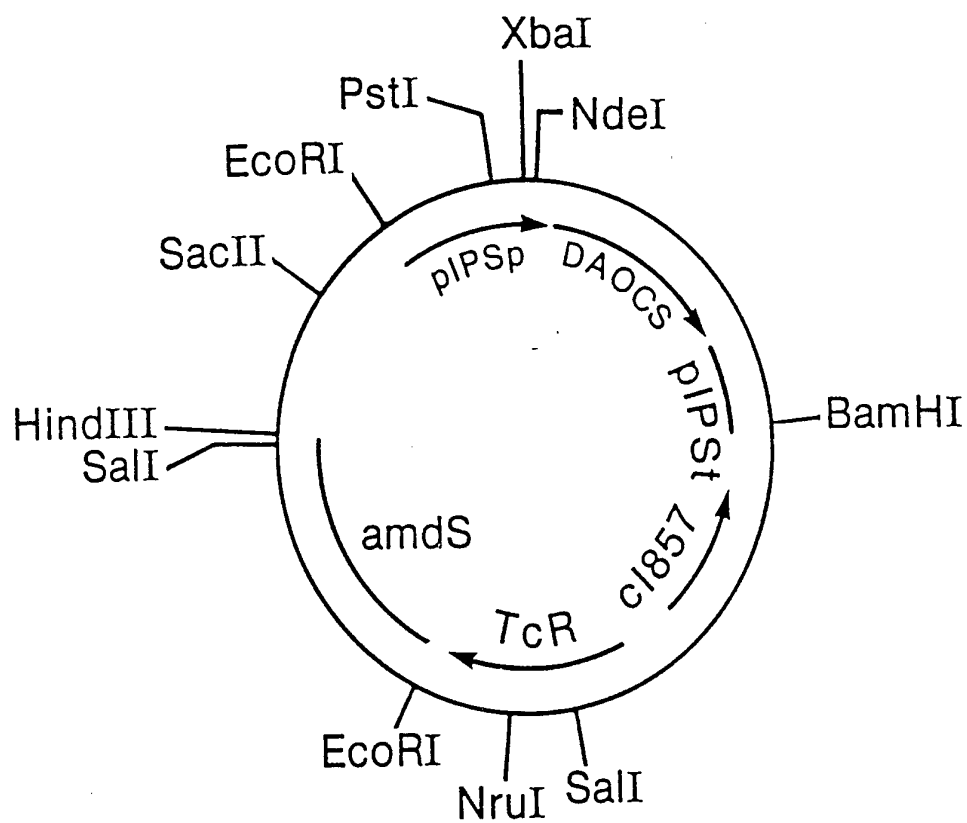
A pPS67 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.6



A pPS69 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

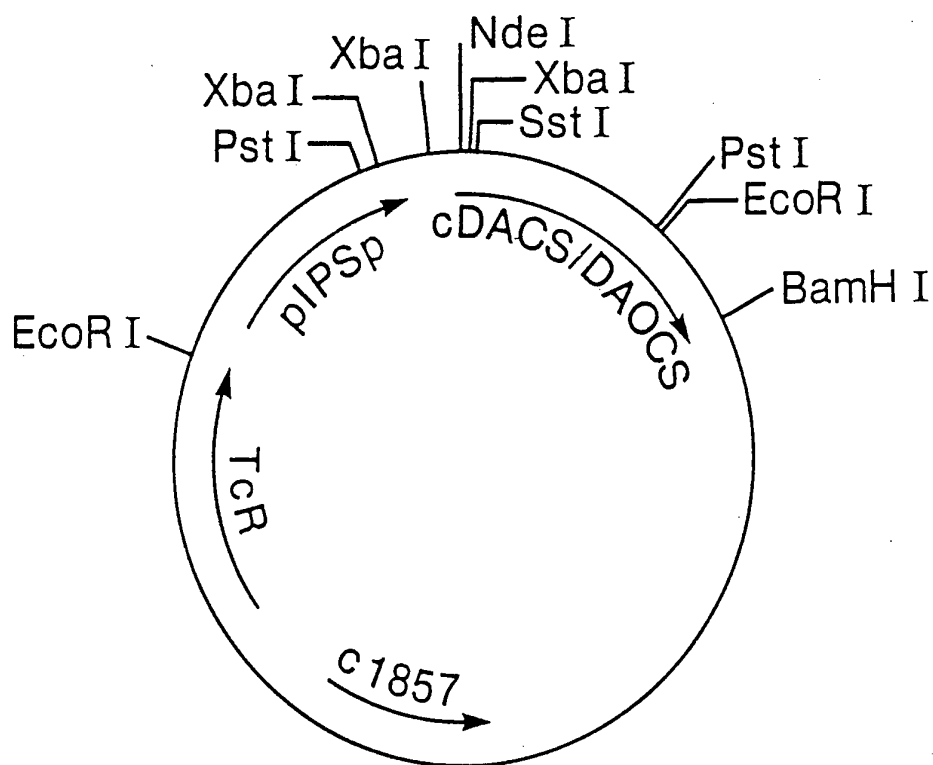
FIG.7



A pPS60 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

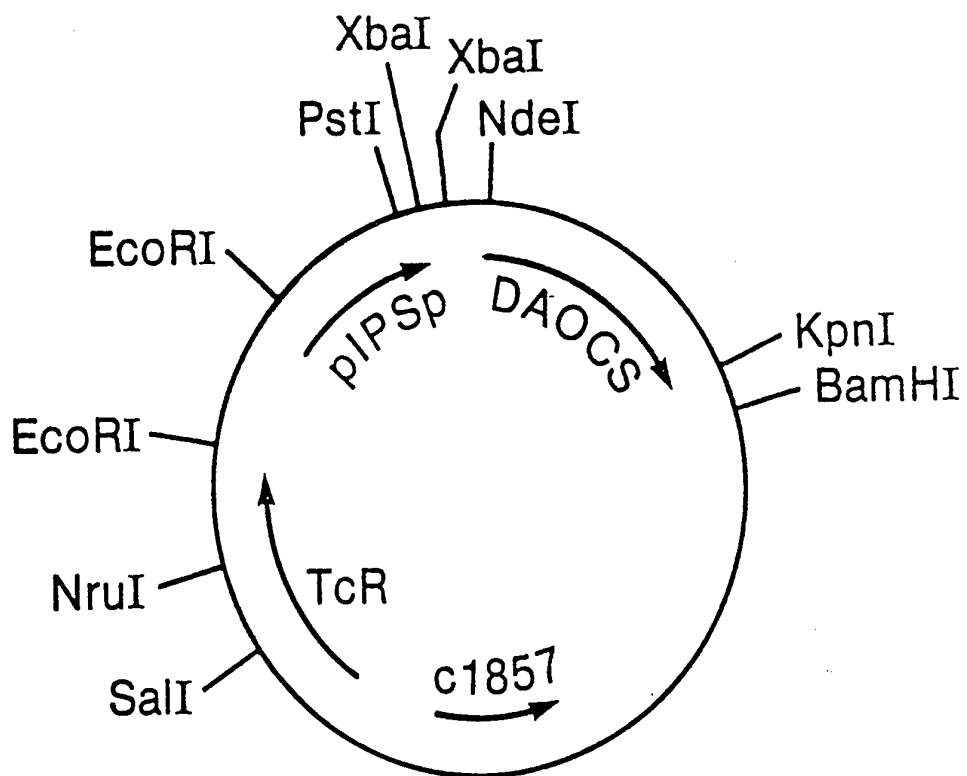
FIG.8

(7342 bp)



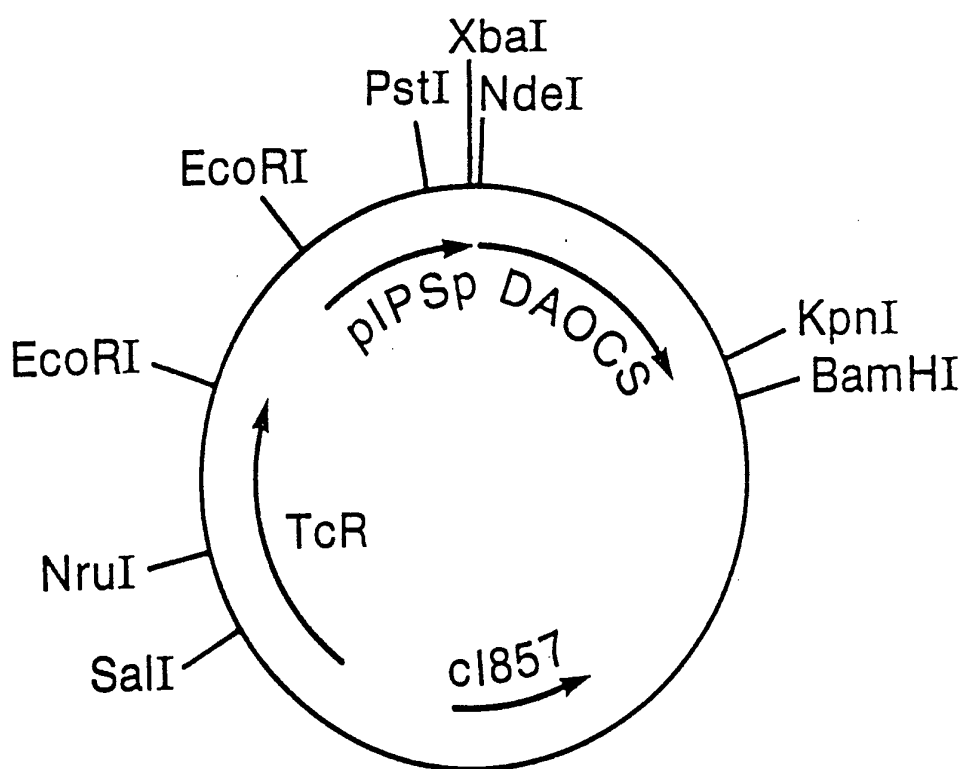
A pPS63 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.9



A pPS64 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

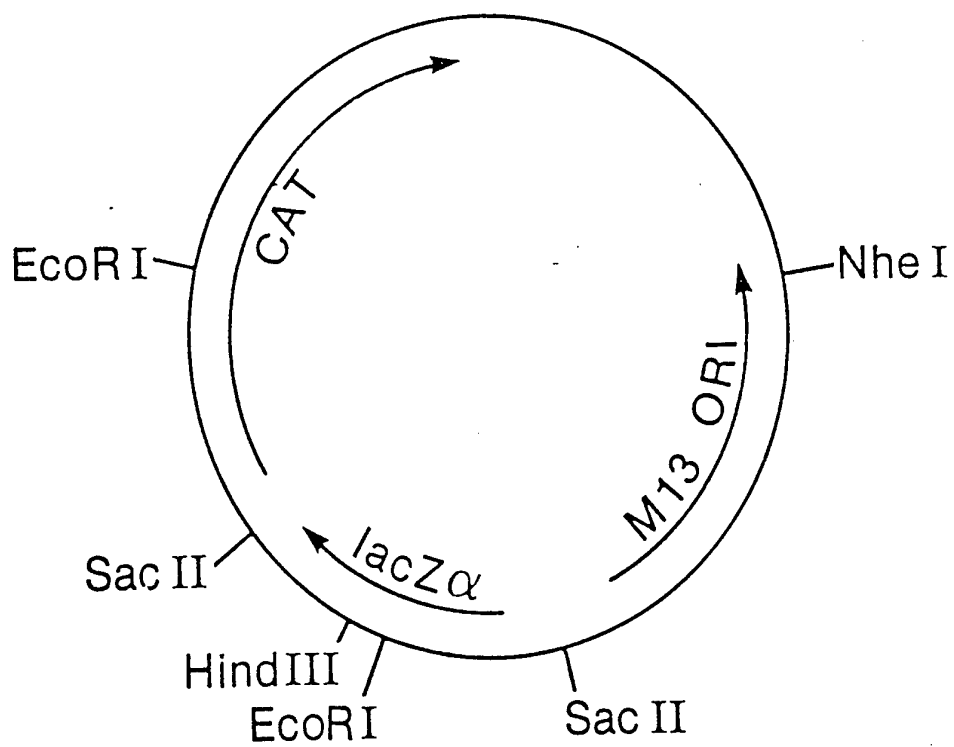
FIG.10



A pMLC 12 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

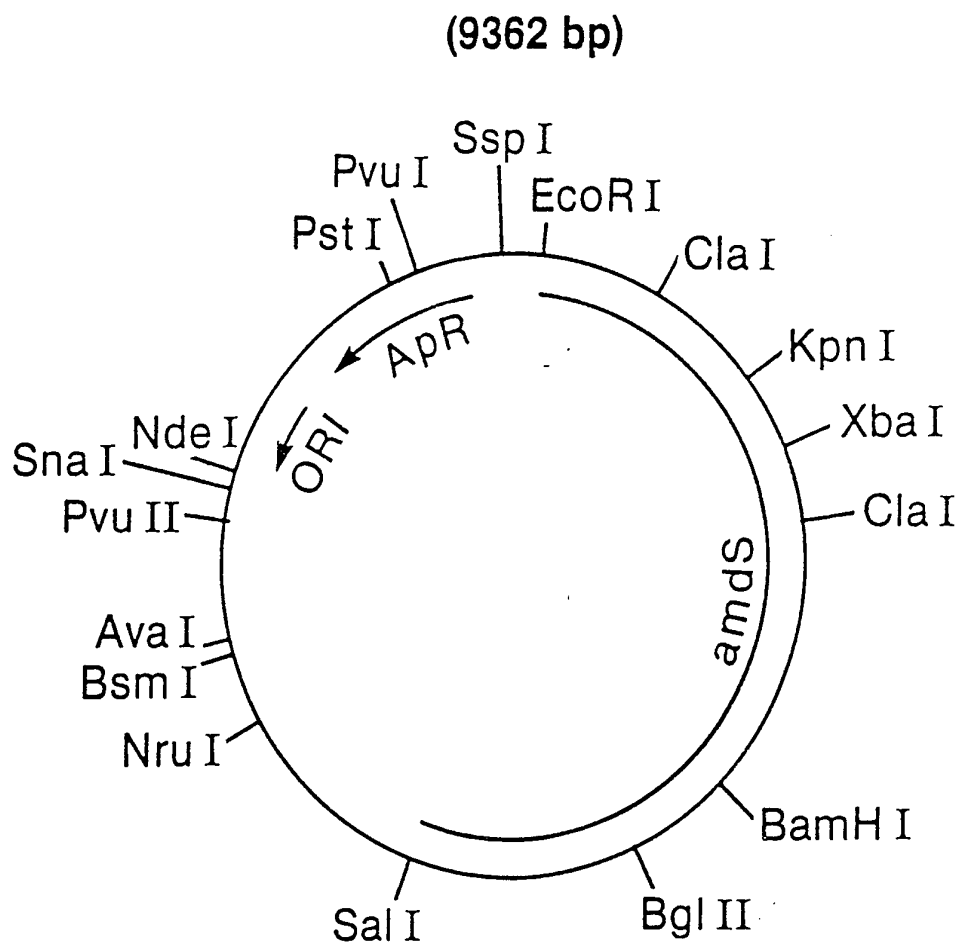
FIG.II

(2671 bp)



A p3SR2 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

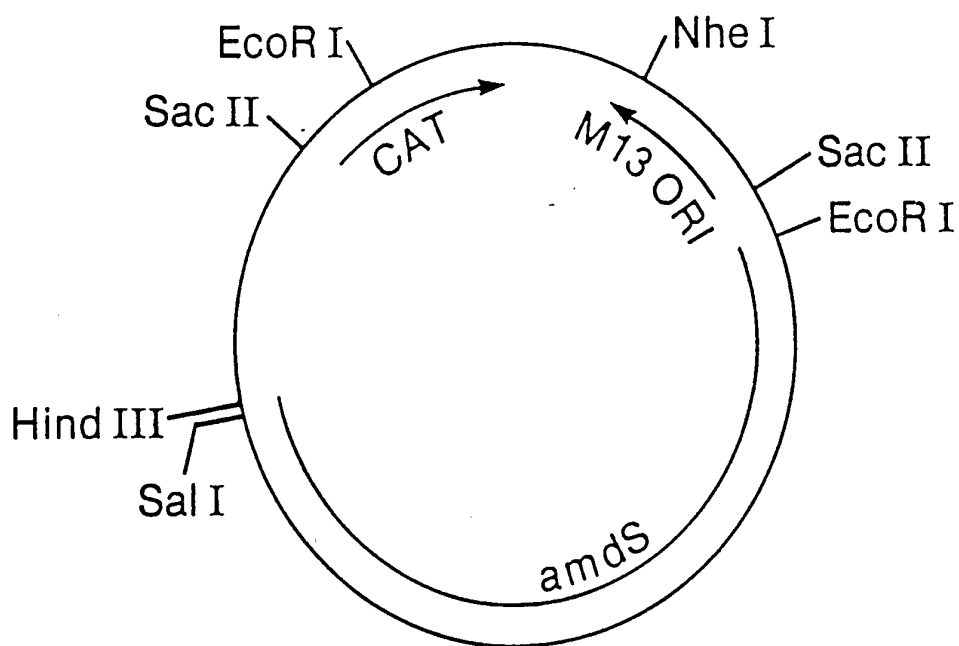
FIG.12



A pPS51 plazmid restriktációs és funkcionális térképe

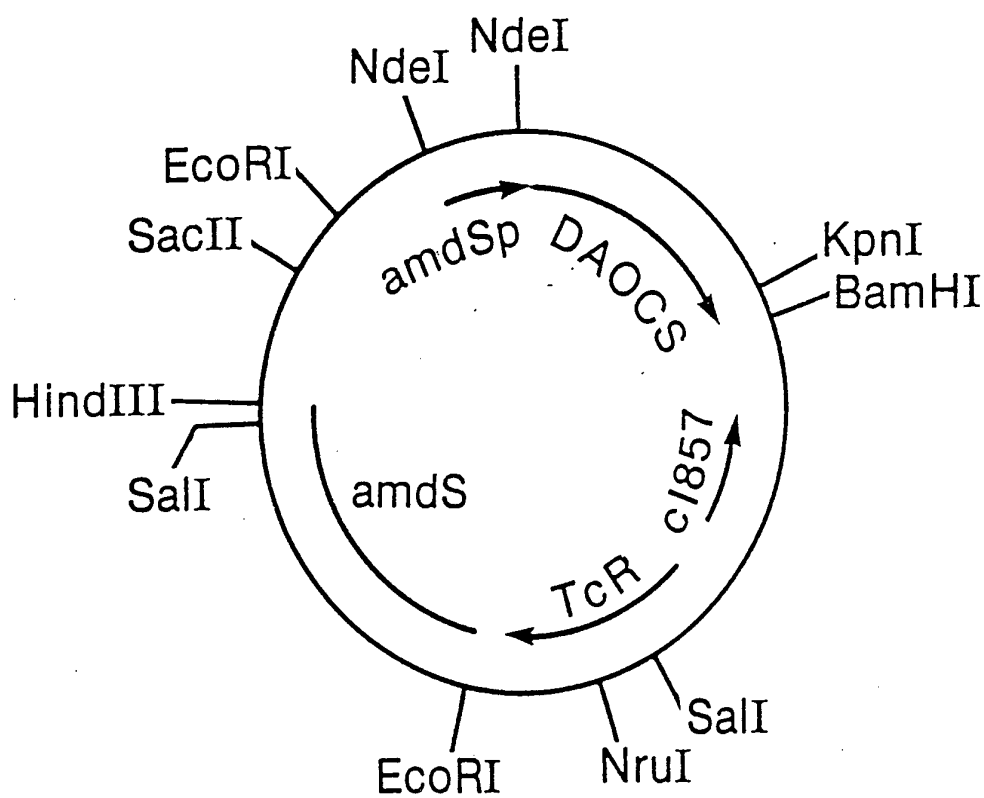
FIG.13

(7661 bp)



A pPS71 plazmis restrikciós és funkcionális térképe

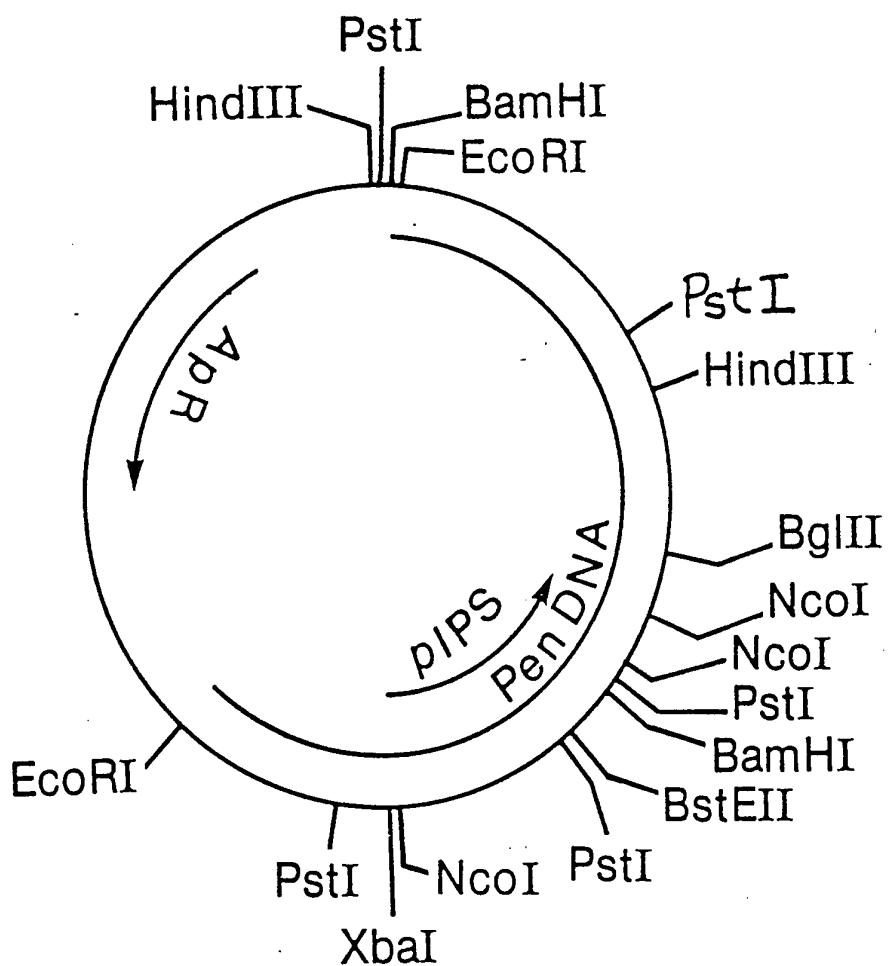
FIG.14



A pLC2 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.15

(7,050 bp)



A pPS68 plazmid restrikciós és funkcionális térképe

FIG.16

