

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11)

(13)

195 533 B

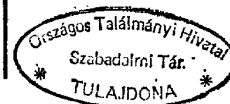
Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZÖ₄
C 12 N 15/00;
C 12 N 9/26

(21) (363/81) (22) A bejelentés napja: 81. 02. 13.
A bejelentés elsőbbsége:
(33) GB:
(32) 80. 02. 15. 80. 04. 10.
(31) (8005184) (8011842)

(83) CNN 4832:

NCIB 11 568	NCIB 11 574	NCIB 11 603
NCIB 11 569	NCIB 11 575	NCIB 11 604
NCIB 11 570	NCIB 11 586	NCIB 11 605
NCIB 11 571	NCIB 11 593	NCIB 11 606
NCIB 11 572	NCIB 11 601	NCIB 11 628
NCIB 11 573	NCIB 11 602	

(41) (42) Közzététel napja: 84. 02. 28.
(45) A leírás megjelent: 89. 03. 20.



Feltaláló(k): (72)

COLSON Charles Antoine, CORMELIS Pierre Emile, Dion-Valmont, DIGNEFFE Colette Simone, Rosieres, WALON Raoul G. P. Brüsszel, WALON Corine, Havre, BE

Szabadalmaz: (73)

CPC International Inc., Englewood Cliffs,
New Jersey, US

(54) ELJÁRÁS GÉNSEBÉSZETI ÚTON MÓDOSÍTOTT MIKROORGANIZMUSOK
ELŐÁLLÍTÁSÁRA, AMILÁZ ELŐÁLLÍTÁS CÉLJÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás amilázt meghatározó *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, illetve *Bacillus cereus* gént tartalmazó rekombináns DNS, illetve pullulanáz-termelést meghatározó *Klebsiella pneumoniae* gént tartalmazó rekombináns DNS, továbbá az ilyen DNS-t tartalmazó plazmidok, illetve mikroorganizmusok előállítására.

A találmány a génszéleszt területére vonatkozik, tárgya amiláz enzimet meghatározó gént tartalmazó rekombináns DNS (deoxi-ribonukleinsav) előállítás, és ennek felhasználása amilolitikus enzimek termelésére alkalmas mikroorganizmusok konstruálására.

Bár a „génszéleszt” kifejezést nagyszámú módszerek leírásakor használjuk, egy szervezet genetikai információjának mesterséges módosításakor, a jelen leírás és a szabadalmi igénypontok során kizárólag olyan módszerek kapcsán használjuk, amelyek során in vitro rekombináns DNS molekulákat állítunk elő egy donor mikroorganizmusból, vagy egy megfelelő vektorból; az utóbbiakat egy adott genetikai információ alapján választjuk ki, és a kiválasztott DNS molekulát bejuttatjuk egy megfelelő mikroorganizmusba (gazda mikroorganizmus), amelynek során az adott (idegen) genetikai információ részévé válik a gazdasejt információjának. A „genetikailag átalakított mikroorganizmus” kifejezést mind a leírás, mind a szabadalmi igénypontok során abban az értelemben használjuk, hogy a fenti technikákkal előállított mikroorganizmust definiáljuk.

Az „amiláz” és „amilolitikus” enzim kifejezések szinonimák, és olyan enzimekre utalnak, amelyek katalizálják a keményítő, például az α -amiláz, β -amiláz, izo-amiláz – mint például az α -1,6-glükózidáz, mint például a pullulanáz –, továbbá a glükóamiláz, stb. hidrolízisét.

Az utóbbi években természetesen rendkívül sok leírás található a genetikai széleszt vagy technológia terén (hogy csak két kitűnő összefoglalást említsünk a sok közül: DNA Cloning and the Analysis of Plasmid Structure and Function, Timmis, Cohen és Cabello, Prog. Molec. Subcell Biol., 6, 1978., 1–58. oldal; továbbá Lambdoid Phages that Simplify the Recovery of in vitro Recombinants, Murray, Brammar és Murray, Molec. gen. Genet., 150, 1977, 53–56. oldal). Az irodalomban több közlemény szól értékes tulajdonságokkal rendelkező, genetikailag megváltoztatott mikroorganizmusokról. Az SHO 52–76480 (1977. június 27-én közölt japán szabadalmi leírásban Maruo, Yoneda és Tamura) nagymennyiségű amiláz termelő mikroorganizmus törzseket közöl; ezeket in vivo technikákkal állítják elő mutagenézissel, transzdukcióval és transzformációval, amelyek során Bacillus mikroorganizmusban több genetikai információt változtatnak az amiláz termelés érdekében. A fenti technikák nem tartoznak a génszéleszt körébe, és csak egy vagy néhány, közel rokon (genetikai szempontból) mikroorganizmusra korlátozódnak. Ezek a törzsek ezenkívül genetikailag nem erősíthetők (például faggal vagy plazmiddal) nagymennyiségű enzim termelés elérésére. Egy nemrégiben megjelent közleményben Yoneda, Graham és Young (Cloning of a Foreign Gene Coding for Alpha-amylase in Bacillus subtilis, Biochemical and Biophysical Research Communications, 91, 1556–1564., 1979.) leírják egy α -amiláz meghatározó gén klónozását Bacillus subtilis mikroorganizmusba oly módon, hogy egy Bacillus amyloliquefaciens H mikroorganizmusból származó deoxi-ribonukleinsavat hasítanak, a hasított szakaszt összekötik a phi 3T temperált fág deoxi-ribonukleinsavával, majd ezt követően Bacillus subtilis amiláz termelő sejteket transzformálnak. A szerzők nem találnak bizonyítékot a gén amplifikálásra az amiláz enzim termelése során; márpedig a jelen leírás alapvető célja ez.

2

A találmány tárgya eljárás megfelelő tenyésztési körülmények között a donor mikroorganizmusnál lényegesen nagyobb mennyiségű amilolitikus enzimet termelő mikroorganizmus előállítására génszéleszt úton. A találmány szerinti eljárás egyik előnyös kivitelezési változata szerint olyan mikroorganizmust állítunk elő, amely által szintetizált amiláz egy vagy több, ipari enzimmatikus keményítő-hidrolízisre különösen előnyösen használható tulajdonsággal rendelkezik, például a keményítő enzimmatikus elfolyósítása és/vagy szaccharifikálása során adhezív, megfelelő molekulaméretű malto-dextrinek, keményítő szirupok előállítására, maltóz, dextróz, stb. előállítására; ilyen tulajdonság például a magas hőmérséklettel szembebi rezisztencia, rezisztencia a nehézfém-ionokkal szemben, stb.

A találmány szerinti eljárás értelmében úgy járunk el, hogy először deoxi-ribonukleinsavat különítünk el egy olyan baktériumból (a donor mikroorganizmus), amely legalább egy amilolitikus enzim termelésére képes, ezután megfelelő restrikciós enzimmel hasítjuk ezt a deoxi-ribonukleinsav molekulát, ugyancsak hasítjuk a vektorként szereplő, és a lambda-fágból származó deoxi-ribonukleinsavat, rekombináns deoxi-ribonukleinsav előállítására egyesítjük a fenti hasított molekulákat és összekötjük őket, amiután az amiláz meghatározó gént tartalmazó fragmenseket kapunk. A rekombináns deoxi-ribonukleinsavat ezután biológiailag aktívvá tesszük oly módon, hogy megfelelő gazdasejtbe juttatjuk (például E. coliba) in vitro módszerrel, vagy transzfekcióval.

A kapott telepeket ezután megvizsgáljuk az amiláz meghatározó gén jelenlétére, egy vagy több pozitív klónt kiválasztunk, és szaporítunk; ily módon új, genetikai technikákkal (génszéleszttel) megváltoztatott mikroorganizmust kapunk, amely képes megfelelő tenyésztési körülmények között olyan nagymennyiségű amiláz termelésére, amelyet a donor mikroorganizmus nem volt képes bioszintetizálni. Eljárhatunk oly módon is, hogy egy új fág deoxi-ribonukleinsavát különítjük el, a molekulát hasítjuk és egy második vektorba klónozzuk, ez lehet egy plazmid vagy egy másik fág is. Az új klónt megvizsgáljuk, és az amiláz meghatározó gén jelenlétére szelektáljuk. Egymás után következő szub-szub-klónozást is végezhetünk.

A találmány szerinti eljárás továbbá előnye az új, génszéleszteti módszerekkel megváltoztatott és amiláz túltermelő mikroorganizmusok előállítása területén az, hogy elsősorban egyetlen amilolitikus enzimet meghatározó gént juttat a sejtbe, azáltal nagymértékben csökkent a tisztítási lépések számát, amelyek használata szükséges a genetikai módszerekkel (génszéleszttel) nem megváltoztatott mikroorganizmusok esetén.

Ha egyszer a megfelelő rekombináns deoxi-ribonukleinsavat tartalmazó génszéleszteti úton megváltoztatott mikroorganizmus rendelkezésre áll, úgy azt oly módon tenyésztjük, hogy a rekombináns deoxi-ribonukleinsav kifejeződése erősödjön, és ezáltal a donor mikroorganizmusnál nagyobb mennyiségű amiláz kapunk.

Abban az esetben, ha a vektor egy lambda-fágból származik, úgy a gazda mikroorganizmus szükség szerűen E. coli, az enzimettermelés és az amplifikálás az alábbiak szerint történik. Ha a fág a sejtek lízisét okozza, úgy a gazda-mikroorganizmust, azaz az E. colit a sejtek sok-

szorozására tenyésztjük, megfelelő sűrűségig; ezt köve-

tően megfelelő mennyiségű bakteriofággal fertőzzük őket, és addig folytatjuk a tenyésztést, míg a sejtek fala feloldódik, és az amiláz a táptalajba kerül.

Abban az esetben, ha a vektor-gazdasejt rendszer megfelelő lambdalizogén *E. coli*, úgy a fertőzött gazda-mikroorganizmust megfelelő mennyiségű baktériumsejt előállítására 32 °C hőmérsékleten tenyésztjük, ezt követően 42 °C hőmérsékletre emeljük a tenyészle hőmérsékletét, és a litikus ciklus indukciójára bizonyos ideig ezen a hőmérsékleten tartjuk. Ezt követően 37 °C-ra csökkentjük a hőmérsékletet, az idegen dezoxi-ribonukleinsav amplifikálására, amely nagymennyiségű amiláz-termeléssel jár együtt. A körülményektől függően oldódik fel a sejtek fala, ebben az esetben az amiláz a tenyészlebe kerül.

Abban az esetben, ha a vektor több másolatot tartalmazó plazmid, például pBR 322 vagy pACYC 184 plazmid, úgy az idegen dezoxi-ribonukleinsav amplifikálódását per se (magában a sejtben) érjük el. Eljárhatunk oly módon, hogy a génebeszeti módszerekkel kapott mikroorganizmus – amely tartalmazza a plazmid-dezoxi-ribonukleinsavat – a sejtjeit megfelelő sűrűségig szaporítjuk, ezután kloramfenikolt adagolunk. Az antibiotikum gátolja a fehérje szintézisét, és ez megakadályozza a sejtek osztódását és az amiláz termelését; ugyanakkor lehetséges a sejtben belül lévő plazmid-dezoxi-ribonukleinsav osztódása (amplifikálódása). Ezt követően elkülönítjük a sejteket a tenyészetből, és a kloramfenikol eltávolítására mossuk. Az amiláz termelésére újratenyésztjük a sejteket, természetesen a kloramfenikol nélkül, amikor nagymennyiségű amilázt kapunk.

Mint minden génebeszeti munkánál, természetesen szükség van a sejtek jelzésére, amivel szelektálhatók, azaz kiválaszthatjuk az adott genetikai információt tartalmazó klónokat. A jelen leírás során ezt keményítőt tartalmazó táptalajon végezzük, ha α -amilázt, β -amilázt vagy glükó-amilázt kívánunk termelni. Ezután jóddal festjük a tenyészetet, az amiláz aktivitással rendelkező telepek a keményítőt tartalmazó táptalajon fehér udvarral vannak körülvéve. A következőkben megadunk egy előnyös festési módszert. Abban az esetben, ha pullulanáz aktivitást keresünk, úgy a klónokat pullulánt tartalmazó BBL Trypticase-táptalajon szélesztjük. A továbbiakban ezt a módszert részletesen ismertetjük.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti eljárást, ismertetjük az anyagokat és a módszereket. Több módszer jól ismert a területen jártas szakemberek körében; ennek ellenére egyeseket részletesen megadunk, az érthetőség kedvéért.

Donor mikroorganizmus

A donor mikroorganizmus olyan baktérium, amely legalább egy amiláz (közötte természetesen a kívánt amiláz) bioszintézisére képes, előnyösen olyan amilázt termel, amely a keményítő ipari hidrolízisére alkalmas, például rezisztens a magas hőmérsékletre és a fémion-mérgekre. A donor eukarióta amilázt termelő mikroorganizmus is lehet, például egy gomba vagy élesztő. A prokariótából származó dezoxi-ribonukleinsavval azonban viszonylag egyszerűbben kísérletezhetünk; így nem eukarióta forrásból származó molekulákat használ-

unk, leírásunk ily módon bakteriális donorra korlátozódik. Ahogy az a példából kiderül, sikeresen használtuk a *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* és *Klebsiella pneumoniae* törzseket génebeszeti módon megváltoztatott mikroorganizmusok előállítására. Ezek a mikroorganizmusok hőre rezisztens α -amilázt, β -amilázt és pullulanázt termelnek, sorrendben, nagy mennyiségben.

10 Ligációs és restrikciós enzimek

A munkánk során ligációs (kötő) enzimként T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligázt használunk, érthető módon azonban bármely más dezoxi-ribonukleinsav-kötő enzim használható. A restrikciós enzimeket a példákban adjuk meg. A restrikciós-enzimek kiválasztását természetesen jól ismert módszerekkel végezzük. A restrikciós enzimek kiválasztása úgy történik, hogy a donor mikroorganizmusból izolált dezoxi-ribonukleinsavat (donor dezoxi-ribonukleinsav) különböző restrikciós enzimekkel hasítjuk, és egyet (vagy többet) választunk ki azon az alapon, hogy a dezoxi-ribonukleinsav molekulát 2–15 kilobázis nagyságú fragmensekre hasítja.

25 Vektorok

Több oka van annak, hogy a donorból elkülönített dezoxi-ribonukleinsav klónozására különösen előnyösen használhatunk lambda-fág származékokat. Ezek az okok: 1) a lambda-fág delíciós mutánsai lehetővé teszik különböző nagyságú idegen dezoxi-ribonukleinsav fragmensek beépítését (természetesen a specifikus lambda-molekulától függően), és ezenkívül lehetséges az idegen dezoxi-ribonukleinsavat tartalmazó klónok egyszerű azonosítása. 2) Olyan lambda-fág származékok állnak rendelkezésre, amelyek különböző restrikciós enzimek használatát teszik lehetővé; ily módon növekszik a sikeres klónozás valószínűsége. 3) Megfelelő lambda-fág származékot használva könnyen elérhető az idegen gén amplifikálódása (sokszorozódása). 4) Ligációt követően a rekombináns klónok visszanyerése könnyen elvégezhető transzfeccióval vagy in vitro beépítéssel.

Más, jelenleg ismeretes vektor esetén nem jelentkező okok miatt a jelen leírás kivitelezésekor lambda-fág származékokat és *E. coli* gazdasejtet használunk a donorból extrahált dezoxi-ribonukleinsav első klónozására.

A plazmiddal szemben a fág használatának további előnyei a következők:

50 1) Az idegen dezoxi-ribonukleinsav szakaszt tartalmazó rekombinánsok százaléka nagyobb.

2) A baktérium lizál, ily módon a sejttartalom, azaz az amiláz is, a táptalajba kerül, amikor használható a jódfestéses kimutatás.

55 3) A jóddal szembeni rezisztencia a fág esetén nagyobb, mint bármely élő baktérium esetén.

A megfelelő plazmid kiválasztása vektorra szubklonázáskor szakember számára nem jelent nehézséget, az első kritérium természetesen az, hogy a használt restrikciós enzim számára egy, vagy korlátozott számú restrikciós helyet tartalmazzon.

Munkánk során pBR 322 és pACYC 184 plazmidokat használunk. Érintetlen állapotában a pBR 322 plazmid ampicillinnel és tetraciklinnel szembeni rezisztenciát

65

hordoz, és egyetlen restrikciós helyet tartalmaz a PstI. Eco RI. Hind III. Bam HI és Sal I enzimekre. A Pst I helyen való hasítás és beépítés megszünteti az ampicillinnel szembeni rezisztenciát, ugyanakkor a Bam HI és a Sal I helyekre való beépítéskor a tetraciklinnel szembeni rezisztencia szűnik meg. A Hind III helyre való beépítéskor esetenként megszünik a tetraciklinnel szembeni rezisztencia, amely azt bizonyítja, hogy a klónozott gén nem hordozza saját promoterét.

A pACYC 184 plazmid érintetlen állapotban tetraciklinnel és kloramfenikollal szembeni rezisztenciát hordoz, egyetlen restrikciós szakaszt tartalmaz az Eco RI. Hind III. Bam HI és Sal I enzimekre. Az ECO RI helyére való beépítéskor vagy hasításkor megszünik a kloramfenikollal szembeni rezisztencia, a másik három (Hind III. Bam HI és Sal I) helyre való beépítéskor hasonló eredményt érünk el, mint a pBR 322 plazmid esetén; ugyanis ez a régió mindkét plazmidban közös.

A *Bacillus subtilis*-be való szubklónozáskor vektorként pC 194 plazmidot használunk. Ez a plazmid egyetlen Hind III helyet tartalmaz, és kloramfenikollal szembeni rezisztenciát hordoz.

Gazda mikroorganizmus

Mivel a lambda-fág származékai csak *E. coli*-ban fejlődnek ki, gazdaséjtként a találmány szerinti eljárással előállított rekombináns fág dezoxi-ribonukleinsavhoz, ezt kell használnunk. Ha a rekombináns dezoxi-ribonukleinsav plazmidként létezik, úgy bármely olyan mikroorganizmus használható, amely képes elfogadni és replikálni a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat, például más mikroorganizmus vagy élesztő, például *Saccharomyces cerevisiae*.

Gyakorlati okok miatt *E. coli* törzseket (például HB 101) használunk legtöbb kísérletünkben, mivel ezek jól ismert törzsek genetikai szempontból, és érzékenyek fágok és plazmidok fertőzésére, következményként pedig enzim túltermelésre hajlamos sejteket kapunk.

Ahogy az a II A példában ismertetésre kerül, a rekombináns plazmid szubklónozható egy másik plazmidba, például a pC 194-be, amely replikálódik a *B. subtilis*-ben.

Az eljárás részletei

Az eljárást kétfázisú klónozási kísérlettel ismertetjük; az első fázisban fágot használunk, a másodikban pedig plazmidot.

A kiválasztott donor mikroorganizmus, a restrikciós és ligációs enzimek és a lambda-fág származék meglétét követően elkülönítjük, a dezoxi-ribonukleinsavakat, elvégezzük a restrikciós reakciót, keverjük a két molekulát, és az összekötött szakaszokat ligációs reakciónak vetjük alá, az összes módszert leírásra nem szoruló, ismert technikával végezzük.

Ezután a dezoxi-ribonukleinsavat biológiailag aktívá tesszük transzfeccióval vagy *in vitro* beiktatással *E. coli* sejtben. A lambda-dezoxi-ribonukleinsavval végzett kísérleteink során rendkívül jó eredményeket értünk el egyszerű bejuttatással (enkapszidáció) [lásd Hohn és Murray, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 3259–3263 (1977)]. Az idegen dezoxi-ribonukleinsavat megkapott klónokat megfelelő módszerekkel azonosítjuk. Ha például NM590

vagy NM607 lambda-vektort használunk, [előállítását lásd Murray N. és munkatársai, *Molec. Gen. Genet.* 150, 53–61 (1977)] úgy ezek a klónok, ha idegen dezoxi-ribonukleinsavat tartalmaznak, úgy világosan elkülönülő plakkokat produkálnak, az idegen dezoxi-ribonukleinsavat nem tartalmazók pedig zavarost. Ha például NM761 vagy NM781 lambda vektort használunk, [előállítását lásd Murray és munkatársai, *Molec. Gen. Genet.* 150, 53–61 (1977)] úgy az azonosítást oly módon végezzük, hogy laktóz indikátor táptalajban, például McConkey, EMB vagy X gal táptalajon tenyésztett *E. coli lac amber* recipiens sejtekre szélesztünk.

Sok (több ezer) idegen dezoxi-ribonukleinsavat befogadott klónt szélesztünk keményített tartalmazó táptalajon, és amilázt meghatározó gén jelenlétére szkrénálunk, az előzőekben említett jódos festéssel. Természetesen óvatosan kell eljárunk abból a szempontból, hogy ne használjunk túl nagy jódkoncentrációt, ugyanis ekkor a fágok elpusztulnak. Ez a jelenség áll fenn, ha a jódot oldatként adagoljuk. Előnyös festési technikánk során a lemezeket jódgőzök hatásának tettük ki rövid időn át. Ily módon jó eredményeket értünk el.

A következőkben ismertetjük a pullulánáz aktivitással rendelkező klónok kimutatásának előnyös módszerét; a módszer nem igényli a jódfestést. A fágokat BBL Trypticase plusz pullulán táptalajon szélesztjük, körülbelül 0,25% koncentrációban. A pozitív plakkok körül a pullulán hidrolizálódik maltotriózá a pullulánáz aktivitása révén, a maltotriózt a baktériumok felhasználják. Ily módon a maltotriózt felhasználó baktériumok jobban növekszenek a többinél, ezért a pullulánáz enzim termelő plakkok környékén zavaros gyűrű látszik a növekvő baktériumok miatt, és ez könnyen megfigyelhető. A módszert részletesen a IV. példában ismertetjük.

Ezután egy vagy több pozitív klónt kiválasztunk, és szaporítunk. Ez természetesen tartalmazza a végső genetikai módszerekkel kapott mikroorganizmust, és felhasználható az előzőekben megadottak szerint megfelelő tenyésztéssel nagymennyiségű amiláz termelésére. Eljárhatunk oly módon is, hogy a klónt dezoxi-ribonukleinsav forrásként használjuk egy második klónozási kísérlet során plazmidba vagy másba, előnyösen fágba való beépítésre. Az alábbiakban ismertetjük egy plazmidba való szubklónozás módszerét.

Ismert módszerekkel a klónok dezoxi-ribonukleinsavat elkülönítjük és restrikciós enzimekkel hasítjuk, ily módon hasítjuk a plazmidot is, a fragmenteket keverjük, és a rekombináns szakaszokat ligációs reakcióval összekapcsoljuk. Ha a pBR 322 plazmidot használjuk, úgy az amilázt meghatározó gént tartalmazó, felvett dezoxi-ribonukleinsavat magába foglaló klónok identifikációját oly módon végezzük, hogy a dezoxi-ribonukleinsavat *E. coli* gazdaséjtekbe transzformálva biológiailag aktívvá tesszük; a tenyésztést ampicillint vagy tetraciklint tartalmazó táptalajban végezzük a használt restrikciós enzintől függően. A táptalaj keményítőt vagy pullulánt is tartalmaz, és az amilázt meghatározó gént tartalmazó klónok identifikációját az előzőekben megadott módszerek egyikével végezzük. A pozitív klónokat ezután tenyésztjük, és a plazmid dezoxi-ribonukleinsavat az előzőekben ismertetett kloramfenikoles módszerekkel sokszoroztjuk.

A mellékelt ábrákon (1a, ábra) megadjuk a vad típusú

lambda bakteriofág, és az összes használt vektor géntérképét, az új rekombináns plazmidokat a következő példák szerint. Részletesebben, az 1. ábra mutatja az NM 590 lambdafág (b), az NM 781 lambdafág (c) géntérképét (Murray, Brammar és Murray, Molec. gen. Genet., 150, 53–61., 1977). A 2. ábrán a pBR 322 plazmid géntérképét mutatjuk be (Bolivar, Rodriguez, Greene, Betlach, Heyneker, Boyer, Gene, 2, 95–113, 1977) és a pAYC 184 plazmid genetikai térképét (Chang, Cohen, J. Bact., 134, 1141–1156, 1978). A 3. ábrán láthatjuk az új pCP 1 plazmid térképét, és a 4. ábrán az új pCP 2 plazmid géntérképét. Az 5. ábra a II A. példában bemutatottakat szemlélteti, látható a pC 194, pCP 2.3, és a végső új plazmid, a pCH 1.

A 6. és 7. ábrán sorrendben bemutatjuk a pCP 3 és pCP 4 plazmidokat. Az új rekombináns plazmidokat bemutató összes genetikai térképen a donor dezoxi-ribonukleinsavat vastag vonallal jelöltük.

A példákban szemléltetjük a találmány szerinti eljárást. A példákat csak szemléltető jelleggel adjuk meg, és a találmány oltalmi körét nem szűkítik. A %-kat súly %-ban adjuk meg, kivéve, ha másként nem jelöljük. Az összes példát az NIH (National Institute of Health) (USA) szabályai szerint végeztük.

Az α -amiláz gén klónozása

A kísérletek során az alábbi anyagokat használjuk: Hind III restrikciós endonukleáz (Boehringer Ingelheim):

T4 dezoxi-ribonukleinsav-ligáz (Boehringer Ingelheim, NSZK).

NM 590 lambda-fág. A fág dezoxi-ribonukleinsavát nagymértékben tisztított fág részecskékből izoláljuk fenolos extrakcióval, lásd Murray és munkatársai, Molec. Gen. Genet. 150, 53–61 (1977).

pBR 322 plazmid (Boehringer Ingelheim). A plazmid dezoxi-ribonukleinsavát lizozimmal lizált *E. coli* sejtekből izoláljuk cézium-klorid-etidium-bromid sűrűségi gradienssel.

Gazda mikroorganizmus: *E. coli* HB 101.

A donor mikroorganizmus a *Bacillus megaterium*, a mikroorganizmus az alábbi mikrobiológiai jellemzőkkel rendelkezik:

- 1) Morfológia: pálca (0,5–0,7 μ × 2,0–5,0 μ méretű), mozgó, gram-pozitív festésű, a spórák terminális vagy szubterminális állásúak.
- 2) A sejtek Nutrient folyékony táptalajon jól növekszenek.
- 3) Nutrient-agar: jól növekszik; a telepek a közepükön sűrűek, a telep szélein diffúzak.
- 4) Tej: a peptonizáció pH-változás nélkül következik be.
- 5) Zselatin: nem folyósítja el.
- 6) A nitrátok redukciója: negatív.
- 7) Kataláz-reakció: negatív.
- 8) Oxidáz-reakció: negatív.
- 9) Citokróm-oxidáz-reakció: negatív.
- 10) Indol-termelés: negatív.
- 11) Kén-hidrogén termelés: negatív.
- 12) Szénhidrát-hasznosítás és spektrum: felhasználja az arabinózt, xilózt, galaktózt, glükózt, levulózt, maltózt, raffinózt, szaccharózt, keményítőt, és

ezekből savat termel. Nem hasznosítja a ramnózt, mannózt, melibiózt, inulint és szalicint.

- 13) Poliolok hasznosítása: hasznosítja a szorbitot és a mannitot, ugyanakkor az adenitot, dulcitol és inozitot nem.
- 14) Dekarboxiláz-reakció lizinnel vizsgálva: negatív.
- 15) Ureolízis: gyenge.
- 16) Nehézfém-ionokkal szembeni rezisztencia: 500 rész/millió rész Cr^{+++} jelenlétében növekszik.
- 17) Nátrium-kloridot tartalmazó táptalaj: 3,5% nátrium-klorid koncentráció mellett növekszik.
- 18) A növekedés szempontjából optimális hőmérséklet: 30–37 °C.
Növekedés még bekövetkezik: 40–50 °C.
Még növekszik: 5–20 °C.
- 19) Oxigén-igény: aerob.

A mikroorganizmust mikrobiológiai tulajdonságai alapján a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8. kiadása alapján (Buchanan és Gibbons szerkesztése: Williams és Wilkins Company, Baltimore, Md.) *Bacillus megaterium*-nak határoztuk meg. A mikroorganizmust a National Collection of Industrial Bacteria (NCIB) törzsgyűjteményébe letétbe helyeztük (Torry Research Station, PO Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Skócia). A letétbe helyezés 1980. február 12-én történt, törzsünk a törzsgyűjteményben az NCIB 11568 sorszámmal kapta.

Az alábbiakban ismertetjük az eljárást.

30

A) In vitro rekombináció a lambda és a *B. megaterium* dezoxi-ribonukleinsava között

- 35 7 μ g *B. megaterium* dezoxi-ribonukleinsavát hasítunk 10 egység Hind III enzimmel 37 °C hőmérsékleten, egy órán át, 25 μ l trisz-pufferrel (7,5 pH) készült reakcióelegyben. Ugyanakkor, ugyanezzel az enzimmel 2 μ g NM 590 lambda dezoxi-ribonukleinsavát hasítunk.
- 40 A reakciót úgy állítjuk le, hogy a reakcióelegyet 10 percen át 75 °C hőmérsékleten tartjuk.

A hasítás hatékonyságának megállapítására két vizsgálatot végzünk:

- 1) A két reakcióelegy egy-egy mintáját agaróz gélen 20 órán át 20 V feszültségkülönbséggel elektroforézisnek vetjük alá. A gél etidium-bromiddal festjük, és megfigyeljük a csíkok helyzetét: a lambda dezoxi-ribonukleinsavból származó két csík a lambda DNS-en egyetlenegy Hind III hasítás eredménye, a bakteriális dezoxi-ribonukleinsavból származó nagyszámú, majdnem átfedő csíkok pedig nagyszámú hasításra utalnak.

- 2) A fág dezoxi-ribonukleinsavának transzfekeciós mérése azt jelzi, hogy a hasítás több mint 99%-os hatékonyságú; ily módon a fág dezoxi-ribonukleinsavának biológiai aktivitása majdnem teljesen megszűnik.

A hasított dezoxi-ribonukleinsavakat keverjük, és öt órán át 10 °C hőmérsékleten 0,15 egység T4 dezoxi-rendeződs és kovalens kötések kialakítására az egyes DNS fragmensek között.

- 60 Az inkubáció végén a dezoxi-ribonukleinsavát in vitro olyan készítménnyel keverjük, amely két komplementer módon defektív fág lizátumot tartalmaz (Dam-lambda és Eam-lambda), ezeket a fágokat nem szuppresszív törzsekből nyerjük, Hohn, B. és munkatársai, Proc. Nat.

Ac. Sci. 74, 3259–3263 (1977) módszerével. Ebben a keverékben bármely olyan dezoxi-ribonukleinsav molekula, amely a lambda-dezoxi-ribonukleinsav cos extremitásait tartalmazza, és megfelelő nagyságú, beépül a fág-fehérjébe, ily módon in vitro olyan biológiailag aktív fágészecskékhez jutunk, amelyek képesek fertőzni az *E. coli* sejteket, és infekciós központokat (plakk) produkálnak.

Az eljárás hatékonyságát két kontrollal vizsgáljuk. Ezek a következők:

- 1) A keverék egy mintáját *E. coli* sejtekre szélesztjük, a bevitt lambda-dezoxi-ribonukleinsav μg -jára számítva 3×10^5 plakkot kapunk. Ez körülbelül 100-szor több, mint amit a hasított készítménnyel kapunk, ez a ligázos kezelés jó hatékonyságát jelzi.
- 2) A kapott plakkokat vizuálisan vizsgáljuk. A plakkok 70 %-a nem homályos, hanem tiszta; ez a B. megaterium dezoxi-ribonukleinsav fragmenteinek jelenlétére utal, azaz új szakasz lépett be, aminek következményeként inaktiválódik a lambda C1 géne, amely a plakkok zavarosságáért tehető felelőssé.

Bizonyított tehát, hogy a készítmény olyan NM 590 lambda-fág dezoxi-ribonukleinsavat tartalmaz, amely magában foglalja a Hind III által hasított összes. B. megaterium dezoxi-ribonukleinsav fragmenteket.

B) A lambda-fág B. megaterium amiláz gént hordozó származékainak izolálása

Az enkapszidációs elegy megmaradt részével nagyszámú, keményítőt tartalmazó, *E. coli*val fertőzött lemezeket oltunk, lemezenként 10^3 élő részecskét használva. Növesztjük a fertőzött *E. coli*-t, létrejönnek a plakkok, majd ezt követően a keményítőt lebontó plakkok jelenlétét vizsgáljuk. Ezt oly módon végezzük, hogy a lemezeket jódgőzők hatásának tesszük ki rövid időn át. Azt várjuk, hogy a fenti fágok által létrehozott plakkok körül átlátszó zóna van, amely abból adódik, hogy a lízist szenvedett sejtekből származó amiláz kidiffundál és hat. Egy ilyen plakkot találtunk, az itt jelenlévő fágokat izoláljuk, és tenyésztjük (hosszabb jódgezelés elpusztíthatja a fágokat). A plakkból származó utódok amilázt termelnek, a fágot lambda NM 590 Amy 1-nek neveztük el. A lambda NM590 Amy 1 fágot 1980. február 12-én NCIB 11569 sorszámmal letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.

C) Az amiláz kén újraklórozása a pBR 322 plazmidba

A kísérleteket abból a célból végezzük, hogy amilázt túltermelő törzset kapjunk, és hogy amilázt tartalmazó nagymennyiségű dezoxi-ribonukleinsavat izolálhassunk.

A lambda NM 590 Amy 1 dezoxi-ribonukleinsavának $1 \mu\text{g}$ -ját és $0.3 \mu\text{g}$ pBR 322 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat Eco RI-vel hasítunk, az elegyeket keverjük, és ligázal inkubáljuk az A) részben megadottak szerint. A készítményt ismert módszereket használva a HB 101 törzs transzformálására használjuk fel. A szelekciót az ampicillin (ap) rezisztencia alapján végezzük, a plazmid jelenlétét ugyanis ez jellemzi. A plazmid közönséges körülmények között tetraciklinnel szembeni rezisztenciát is

biztosít (Tc). Az idegen dezoxi-ribonukleinsav bevezetése ebbe a plazmidba azonban hasítja a tet gént, ily módon a tetraciklinre érzékeny transzformált klónok klónozott dezoxi-ribonukleinsavat hordozó plazmidot tartalmaznak. Esetünkben a klónok 16%-a új plazmidot tartalmaz, ez az *E. coli* sejtekben amiláz aktivitást biztosít. (A jelenlegi nemzetközi nomenklatura szerint az új plazmidot pCP-nek neveztük el, a jelen példában kapott plazmidot pedig pCP 1-nek).

- 10 A fentiek azt jelzik, hogy egy gén újraklónozása hasonló enzimmel (esetünkben a Hind III enzimmel) igen hatékony folyamat (16% $1/10^5$ helyett).

A plazmidot tartalmazó mikroorganizmust *E. coli* CL 7001 (pCP 1) jellel jelöljük, és 1980. február 12-én NCIB 11570 sorszámmal letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.

D) Az enzimtermelés erősítése

- 20 A pCP 1 plazmidot tartalmazó sejtek enzimtermelését az alábbi két módon fokozzuk:

1) Telített tenyészetek

- 25 A sejteket 37°C hőmérsékleten, 5 liter térfogatú Erlenmeyer-lombikban inkubáljuk egy éjszakán át, a lombik egy liter táptalajt tartalmaz (LB; élesztőklonotripton).

2) Kloramfenikolos erősítés

- 30 Egy liter térfogatú táptalajt (LB) öntünk 5 liter térfogatú Erlenmeyer-lombikba, a tenyészetet 37°C hőmérsékleten inkubáljuk körkörös kitérésű rázógépen mindaddig, míg a tenyészet sűrűsége 0,8 lesz (650 nm hullámhosszúságon mérve). Ekkor $150 \mu\text{g/ml}$ kloramfenikolt adagolunk. Ez az antibiotikum meggátolja a kromoszomális dezoxi-ribonukleinsav további replikációját, azonban megengedi az amiláz gént meghatározó pCP 1 plazmidét. A plazmid sokszorozódását (3000 másolat) követően a kloramfenikolt eltávolítjuk, amikor lehetségessé válik a protein-szintézis. Úgy járunk el, hogy az amplifikálás után elkülönítjük a sejteket a táptalajból – például centrifugálással –, a kloramfenikol eltávolítására mossuk, és az amiláz-termelésre tenyésztjük.

45 E) Enzim kinyerés

- 50 Az igen tiszta α -amiláz elkülönítésére az úgynevezett ozmotikus sokk módszert használjuk. A módszert Neu és Heppel írja le [J. Biol. Chem. 240, 3685–3692. (1965)]. A módszer az alábbi:

- 55 A sejteket egy éjszakán át tenyésztjük, a tenyésztést követően 25 % szaccharózt tartalmazó oldatban szuszpendáljuk őket, a szaccharózos oldat térfogata a tenyésztési térfogatának fele. 10 percen át 24°C hőmérsékleten rázzuk a szuszpenziót, amikor a sejtek plazmolízise bekezdődik. Ezután 1 mmól végkoncentrációban EDTA-t adagolunk (a sejtfal permeabilitásának növelésére), és további 10 percen át rázzuk a szuszpenziót, 24°C hőmérsékleten. Ezután centrifugáljuk, és a sejteket gyorsan 0°C hőmérsékletű vízben szuszpendáljuk, és ezen a hőmérsékleten rázzuk 10 percen át. Ismét centrifugáljuk a szuszpenziót, amiután az enzim 96 %-a elkülöníthető a felülúszóból.

- 65 Összehasonlítás miatt a donor mikroorganizmust

(*Bacillus megaterium*) is tenyésztjük, és meghatározzuk enzim-aktivitását. A tenyészet enzim-aktivitását a DNS-módszerrel határozzuk meg, egy enzimegység az az enzimmennyiség, amely 1 mg redukáló cukrot (referens vegyület a maltóz) termel, percenként 10 perces inkubációs időt használunk. A szubsztrát nagymértékben tisztított amiláz.

A donor mikroorganizmus 10 liter tenyészetben 66,0 egység enzimet termel. Az *E. coli* CL 7001 (pCP 1) törzs telített tenyészetben literenként 116,6 egység enzimet termel, ugyanakkor tenyésztést (amplifikálást) követően 5 órás inkubáció kloramfenikol jelenlétében, majd 15 órás inkubáció kloramfenikol nélkül literenként 84,5 egység enzimet eredményez. A fenti adatok azt jelzik, hogy a telített tenyésztés módszere megfelelő nagymennyiségű enzim termelésére.

Az *E. coli* CL 7001 (pCP 1) törzs által termelt enzimet α -amiláznak találtuk, az enzim az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik. Mind az amilózt, mind az amilopektint glükózzá, maltózzá és maltotriózzá, elsősorban maltózzá bontja, hasítja mind a ciklodextrint és a maltotriózt, mégpedig glükózzá és maltózzá. A pullulánt panózzá és/vagy izo-panózzá hasítja, hasonlóan a közel múltban leírt enzimhez [Shimizu, Kanno, Tamura és Suekane, Purification and Some Properties of a Novel Alpha-Amylase Produced by a Strain of *Thermoactinomyces vulgaris*, Agric. Biol. Chem., 42, (9), 1681–1688. oldal, (1978)].

Az itt *Bacillus megaterium*-nak nevezett mikroorganizmust először *Bacillus circulans*-nak gondoltuk.

2. példa

A hőtüdő α -amiláz gén klónozása

A donor mikroorganizmus eredeti törzse a *Bacillus* nemnek, komposztból izoláltuk, és *Bacillus coagulans*-nak határoztuk meg. Hőálló α -amilázt termel, és az alábbi mikrobiológiai tulajdonságokkal rendelkezik:

- 1) Morfológia: Pálca (0,6 - 1 μ × 2,5 - 5,0 μ). mozgó, gram-pozitív festődésű, és gram-negatív festődésű. A spórák centrális vagy terminális állásúak, nem deformálódnak.
- 2) Táp-levesen: jól növekszik.
- 3) Táp-agar-ferdén: jó növekedés, szálas, szétszóródó, krémfehér színű.
- 4) Szerves savak hasznosítása: citrát: pozitív, malonát: negatív.
- 5) Zselatin: elfolyósítja.
- 6) Az acetil-metil-karbinol (acetoin) termelés: pozitív.
- 7) Orto-nitro-fenil-galaktozid hidrolízise: pozitív.
- 8) Nitrátok redukciója: pozitív, gáz keletkezhet.
- 9) Kataláz-reakció: pozitív.
- 10) Indol-termelés: negatív.
- 11) Dekarboxiláz-reakció lizinen: negatív, ornitinen: negatív, argininen: negatív.
- 12) Kén-hidrogén termelés: negatív.
- 13) A szénhidrát hasznosítási spektrum: hasznosítja az arabinózt, galaktózt, glükózt, levulózt, man-

nózt, maltózt, szaccharózt, keményítőt, trehalózt és ezekből savat termel.

- 14) A pullulánt minimál táptalajon hasznosítja.
 - 15) A poliolok hasznosítása: hasznosítja a glicerint, a szorbitot, a mannitot, inozitot. Nem hasznosítja az adonitot és a dulcitot.
 - 16) Ureolízis: negatív.
 - 17) Lecitin-hasznosítás: negatív.
 - 18) Optimális növekedési hőmérséklet: 50 °C.
Növekedés még bekövetkezik: 55–60 °C.
Növekedés még van: 15–25 °C.
 - 19) Oxigén-igény: aerob és anaerob.
- A törzset 1980. február 12-én NCIB 11571 sorszámon letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.
- 15) A törzsből származó dezoxi-ribonukleinsavat izoláljuk, és az alábbi restrikciós enzimekkel hasítjuk: Eco RI; Hind III; Pst I; Sal I; Bam HI és Bgl II. Különböző molekulásúlyú, nagyszámú fragmenst csak a Bgl II enzimmel kapunk. Ugyanakkor az Eco RI enzimmel is lehetséges fragmensek előállítása, ha a nátrium-klorid koncentrációt 50 mmól-ra csökkentjük. Úgy határoztunk, hogy az Eco RI enzim használatát fragmensek előállítására, és ezeket klónozzuk, az Eco RI lambda dezoxi-ribonukleinsav vektorba (lambda NM 781).
 - 25) A) A *B. coagulans* és az NM 781 lambda-fág dezoxi-ribonukleinsavának restrikciója

- 30) 1,25 μ g NM 781 lambda dezoxi-ribonukleinsavat hasítunk 1 egység Eco RI enzimmel. 25 μ l az alábbi pufferrel készült reakcióelegyen:
10 mmól trisz-hidrogén-klorid (pH 7,5), 10 mmól 2-merkaptó-etanol, 10 mmól magnézium-szulfát, és
- 35) 10 mmól nátrium-klorid.
2 μ g *B. coagulans* dezoxi-ribonukleinsavat hasítunk hasonló enzimmel, és hasonló pufferrel készült reakcióelegyen, azzal a különbséggel, hogy a nátrium-klorid koncentrációt 50 mmól-ra csökkentjük. Az inkubációt 2 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük, és a reakciót oly módon állítjuk le, hogy az elegyet 10 percen át 75 °C hőmérsékleten tartjuk. A restrikció teljességét 1% agarózt tartalmazó gélen elektroforézissel bizonyítjuk.

45 B) A rekombináns fágok ligációja és kinyerése

A hasított dezoxi-ribonukleinsavakat összekeverjük, és 2 egység T_4 dezoxi-ribonukleinsav ligázzal kapcsoljuk őket olyan reakcióelegyen, amely 60 mmól trisz-hidrogén-kloridot (pH 8), 10 mmól magnézium-szulfátot, 10 mmól 2-merkaptó-etanol és 0,1 mmól ATP-t tartalmaz. A reakciót 10–15 órán át 10 °C hőmérsékleten végezzük. A ligációs reakciót követően 0,2 μ g dezoxi-ribonukleinsav alikvotot keverünk ATP-vel, ennek végkoncentrációja 10^{-2} mól. Az alikvotokat in vitro enkapszidációnak vetjük alá, és felhasználjuk a terméket az *E. coli* HB 101 törzs fertőzésére. Egy μ g lambda dezoxi-ribonukleinsavra számítva $1,6 \times 10^4$ plakk-képző egységet kapunk. A fágok között egyesek amiláz-aktivitással rendelkeznek (az amiláz aktivitás petri-csészén való meghatározását, a kinyerést és a fágok tisztítását az 1. példában megadottak szerint végezzük).

Igen nagy mennyiségű amilázt termelő fágot kapunk (400-ból 1-et).

Egyet kiválasztunk, és lambda NM 781 α Amy 1 jellel jelöljük. Ezt 1980. február 12-én NCIB 11572 sorszámmal letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.

C) A lambda NM 781 α Amy 1-ből származó amiláz gén újraklonozása a pBR 322 plazmidba

1 μ g lambda NM 781 α Amy 1 dezoxi-ribonukleinsavat és hasonló mennyiségű pBR 322 plazmid dezoxi-ribonukleinsavat hasítunk Eco RI enzimmel, hasonló reakciókörülmények között. A ligációs reakciót és a transzformációt az 1. példában megadottak szerint végezzük. A rekombináns plazmidot tartalmazó E. coli HB 101 kolóniákat amiláz-aktivitásuk alapján határozzuk meg. Egy ilyen telepet kiválasztunk, és E. coli CL 7002 (pCP 2) jellel jelöljük. Ezt a törzset 1980. február 12-én NCIB 11573 sorszámon letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.

D) A géntermék amplifikálása

A lambda NM 781 α Amy 1 amilázt meghatározó génjét és az amiláz-termelést az alábbiak szerint erősítjük. Az E. coli HB 101 gazdabaktériumot LB táptalajban tenyésztjük 2 mmól magnézium-klorid jelenlétében, 37 °C hőmérsékleten. A tenyésztést addig folytatjuk, míg a tenyészet optikai sűrűsége 0,3 (650 nm hullámhosszon mérve) lesz. Ezután hozzáadjuk a tenyészethez a lambda NM 781 α Amy 1-et, a fágok mennyiségét úgy számítjuk, hogy baktériumsejtként 1–2 részecske jusson. Ezután 37 °C hőmérsékleten, erőteljes keverés közben folytatjuk a tenyésztést, mindaddig, míg a tenyészet optikai sűrűsége csökkenni nem kezd. Amikor 0,5 alá esik, összegyűjtjük a sejteket és jégen tartjuk. Centrifugáljuk a szuszpenziót, és a felülúszó amiláz-aktivitását meghatározzuk.

Az E. coli C1 7002 (pCP 2) törzs erősítését és enzimtermelését mind a telített tenyésztés módszerével, mind a kloramfenikolos erősítéssel elvégezzük az 1. példában megadottak szerint eljárva.

Az amiláz aktivitását DNS-módszerrel végezzük mind a fág-lizátumban, mind pedig a rekombináns plazmidot hordozó E. coli tenyészetben. Az 1. táblázatban megadjuk az eredeti B. coagulans törzsszel kapott amiláz-aktivitásokat, megadjuk az extracelluláris és a sejthez kötött aktivitást is. A rekombináns faggal (lambda NM 781 α Amy 1) kapott aktivitásokat és a rekombináns plazmidot hordozó E. coli CL 7002 (pCP 2) törzsszel kapott aktivitásokat ugyancsak megadjuk. Az enzimtermelésben háromszoros növekedés következett be a rekombináns faggal, és még ennél is nagyobb a plazmid esetén (körülbelül 300-szoros).

A lambda NM 781 α Amy 1 fág esetén az összes enzim felszabadul a sejtek lizisekor, ily módon a táptalajban van jelen. A plazmidot hordozó törzs esetén az enzim 96%-a sejthez kötött.

E) Újraklonozás az E. coli sejteket lizogenizáló lambda-fág származékba

Lambda lizogén E. coli vektor-gazdasejt rendszer előállításának szemléltetésére az alábbi kísérletet mutatjuk be.

8

A kísérlet során az alábbi lambda fágot használjuk: T4 lig. CI 857 Wam Fam Sam (lambda NM 989). A fágot és előállítását a J. Mol. Biol. Vol. 132, 1979-ben írják le: Molecular Cloning of the DNA Ligase Gene from Bacteriophage T4. I. Characterization of the Recombinants, Wilson és Murray, 471–491. oldal; továbbá II. Amplification and Separation of the Gene Product, Murray, Bruce és Murray, 493–505.

Ez a fág tartalmazza a T4 bakteriofág dezoxi-ribonukleinsav ligáz génjét, és lizogenizálja az E. coli-t. Ezenkívül tartalmaz egy termoszenzitív immungént és két amber mutációt az E és S génben, sorrendben. Az S génben bekövetkező mutáció úgy változtatja meg a baktériumot, hogy ezzel a faggal fertőzve nem következnek be a lízis. A szubklonozás célja az, hogy a dezoxi-ribonukleinsav-ligáz gént az amilázt meghatározó génnel helyettesítsük.

A fágból és a plazmidból (pCP 2) származó dezoxi-ribonukleinsavat az Eco RI enzimmel hasítjuk, és a fragmenteket összekötjük. A ligációs reakcióból származó fág-dezoxi-ribonukleinsavat ezután in vitro fehérje-burokba zárjuk (enkapszidáció), és a kapott plakkokat E. coli Sup E Sup F törzssre való szélesztés után figyeljük meg. Az amilázt-aktivitást mutató plakkokból izoláljuk a fágot, a fágokat tisztítjuk, az előzőekben megadott módszerrel. Ezt a fágot használjuk a továbbiakban az E. coli C 600 (CL 1205) törzs lizogenizálására, ezt ismert módszerekkel végezzük.

A lizogén kolóniákat keményítőt tartalmazó lemezen vizsgáljuk, jódfestést követően. Ezt a törzset E. coli C1 7003 (lambda α Amy 1) jellel jelöljük, és az NCIB törzsgyűjteményébe letétbe helyeztük 1980. március 6-án, ahol a törzs az NCIB 11586 sorszámmal kapta.

A gén termékének amplifikálását az alábbiak szerint végezzük.

A lizogén törzset 32 °C hőmérsékleten növesztjük LB táptalajban mindaddig, míg 650 nm hullámhosszon mért optikai sűrűsége 0,8 lesz. Ezután centrifugáljuk, és a sejteket friss LB táptalajban szuszpendáljuk, a táptalajt 45 °C-ra előmelegítjük. Ezután 15 percen át 45 °C hőmérsékleten inkubáljuk a tenyészetet, a litikus ciklus indukálására (mivel az immungén terméke termoszenzitív).

Ezután erőteljes rázás közben, 37 °C hőmérsékleten folytatjuk a tenyésztést, 3 órán át. Az amiláz-aktivitást mind a felülúszóban, mind a sejtekben megmérjük. A kapott értékeket az 1. táblázatban adjuk meg.

A fentiekben szemléltettük a plazmidból új lambda fágba való szub-szub-klonozás módszerét. Nyilvánvaló, hogy a lambda NM 781 α Amy 1-ből származó dezoxi-ribonukleinsav ugyanilyen könnyen szubklonozható a lambda T4 lig. CI 857 Wam Fam Sam fágba.

Eljárhatunk oly módon is, hogy a donor dezoxi-ribonukleinsavat direkt az utóbbi fágba juttatjuk, ezenkívül a szemléltetett módszer bármilyen variációja is elképzelhető.

F) A lambda NM 781 α Amy 1, E. coli CL 7002 (pCP 2) és az E. coli 7003 (lambda α Amy 1) által termelt amiláz kinyerése és jellemzése

Az enzim kinyerése az 1. példában megadottak szerint eljárva ozmotikus sokkot használunk. Ezenfelül,

65

mivel a példában ismertetett enzim termotabilis, tovább tisztítjuk oly módon, hogy 10 mmól kalciumiont adagolunk oldatához, 80 °C hőmérsékletre melegítjük fel, és ezen a hőmérsékleten tartjuk 10 percen át. A fenti eljárással az *E. coli* összes fehérjeje kicsapódik, és így módon lehetővé válik az α -amiláz igen tiszta alakban, gyakorlatilag más enzim nélküli elkülönítése.

Meghatároztuk az α -amiláz specificitását: aktív amilózzal és keményítővel, a hidrolízis termékei: glükóz, maltóz, és maltotrióz; ezenfelül nyomnyi mennyiségű, nagyobb molekulású vegyületek. Az enzim ciklodextrinnel szemben nem aktív. Tanulmányoztuk az enzim hőrezisztenciáját és úgy találtuk, hogy az igen magas, 0,5 % amilózzal meghatározva az aktivitást, az optimális hőmérsékletet 80 °C és 90 °C között találtuk. 8 % oldható keményítővel szemben az optimum 100 °C körül található.

Lehetséges, hogy a leírásban *Bacillus coagulans*-nak nevezett mikroorganizmus ténylegesen *Bacillus licheniformis*.

2A. példa

A pCP 2 plazmid szubklonozása a pC 194 plazmidba, és az új plazmid kifejezése *Bacillus subtilis* mikroorganizmusban

A példában szemléltetjük azt a módszert, amivel a találmány szerinti eljárással előállított rekombináns dezoxi-ribonukleinsav kifejezhető az *E. coli*-tól különböző gazdabaktériumban, nevezetesen egy *Bacillus subtilis* törzsben.

A 2. példában megadottak szerint előállított pCP 2 plazmid 3,4 Kb nagyságú fragmenst tartalmaz, amely a *B. coagulans* donorból származik. A plazmidot ampicillin és tetraciklin rezisztencia jellemez, és ezenkívül két restriktációs szakaszt tartalmaz mind az Eco RI és a Hind III enzimekkel szemben. A pCP 2 plazmidot négy fragmensre hasítjuk az Eco RI és a Hind III enzimekkel, ligázal kezeljük a fragmenseket, a termékkel pedig az

előző példákban megadottak szerint HB 101 sejteket transzformálunk.

Az új plazmidokat pCP 2,3-nak (izolálás: LB-táptalaj + 30 g/ml ampicillin) nevezzük, ezek 2,7 Kb nagyságú fragmenst tartalmaznak a *B. coagulans* dezoxi-ribonukleinsavából. Ez a fragmens az α -amilázt meghatározó gént tartalmazza. A pCP 2,3 plazmid az Eco RI és a Hind III enzimekkel szemben egyetlen támadható helyet tartalmaz, ezenkívül hordozza az ampicillin és tetraciklin szembeni rezisztenciát meghatározó géneket is.

A következő lépésben olyan pC 194 plazmidot szelektálunk [előállítását lásd Ehrlich S. D. Proc. Nat. Ac. Sci. 74, 1680–82 (1977)] amely replikálódik a *Bacillus subtilis* sejtben. A pC 194 plazmid kloramfenikollal szembeni rezisztenciát határoz meg, és egyetlen, Hind III enzimmal támadható hellyel rendelkezik.

A pCP 2,3 és a pC 194 plazmidokat Hind III enzimmal nyitjuk, keverjük a fragmenseket, és új plazmid előállítására ligázal kezeljük. Az új molekula pCH 1 jellel szerepel a leírásban, tartalmaz α -amilázt meghatározó gént, és mind kloramfenikollal, mind ampicillinnel szembeni rezisztenciát meghatároz. A kloramfenikollal szembeni rezisztencia *E. coli*-ban alacsonyabb mértékű.

Ahogy az előzőekben is végeztük, a készítménnyel *E. coli* HB 101 sejteket transzformálunk.

Ezután egy mutáns *B. subtilis* törzset (QB 1133) protoplaszt-képzésre kezelünk (a törzset Steinmetz doktortól kaptuk, Institut de Recherche en Biologie Moléculaire, Université Paris Cedex 05). A törzs nem rendelkezik α -amiláz-aktivitással, a protoplasztok képzését Chang és Cohen módszere szerint végezzük [Molec. Gen. Genet., 168, 111–115. (1979)]. A protoplasztokat polietilén-glikollal szabályozott transzformációs eljárással (Chang és Cohen, ugyanott) pCH 1 plazmiddal transzformáljuk.

A protoplasztokat gazdag táptalajban 1,5 órán át inkubáljuk a plazmid sejtbe való bejutásának elősegítésére, illetve a kloramfenikollal szembeni rezisztencia kifejeződésére.

Ezután kloramfenikolt tartalmazó, regenerációs táptalajon szélesztjük a protoplasztokat, a táptalaj ml-

I. Táblázat

Az amiláz-aktivitás az eredeti *B. coagulans* törzsben és a rekombináns, 2. példa szerint előállított klónokban, egység/literben*

	Felülúzó	Periplazmatikus tér	Sejtek	Összes	Az enzimtermelés növekedése
<i>B. coagulans</i>	42	—	—	42	1
lambda NM 781 α Amy 1	144	—	—	144	3,43*
<i>E. coli</i> CL 7002 (pCP 2) amplifikáció	230	—	5,700**	5,930	141,2*
<i>E. coli</i> CL 7002 (pCP 2) egy éjszakán át tenyésztve	276,2	12,960	232	13,467	320,6*
<i>E. coli</i> CL 7003 (lambda α Amy 1)	23	—	1,162**	1,185	26,1*

* = 1 egységnyi az az enzimmennyiség, amely 1 mg/ml maltóz ekvivalenst termel percenként, 50 °C hőmérsékleten, szubsztrátként 0,5 % amilózt használva.

** = Nem használtuk az ozmotikus sokk módszerét, lízis azonban történt; így módon a megadott érték a periplazmatikus térben és a sejtekben lévő amiláz-aktivitás összegét jelenti.

enként 20 µg antibiotikumot tartalmaz. 2 napon át inkubáljuk a tenyészeteket 37 °C hőmérsékleten, amiután transzformálódott sejtekből származó telepek jelennek meg. Ezek a telepek α-amiláz-aktivitással rendelkeznek, ahogy azt a jódgözzel való festési módszerrel bizonyítjuk. Az egyik klónt B. subtilis CL 8001 (pCH 1) jellel jelöljük, és 1981. január 13-án letétbe helyezzük NCIB 11629 sorszámmal. Ugyancsak letétbe helyezzük az eredeti QB 1133 törzset, a letétbe helyezés dátuma: 1981. január 13., a törzsgyűjteményben kapott sorszámmal: NCIB 11628.

A B. subtilis CL 8001 (pCH 1) csak kloramfenikol jelenlétében stabil. A törzset α-amiláz előállítására használjuk oly módon, hogy 20 µg/ml kloramfenikolt tartalmazó táptalajban tenyésztjük. Az α-amiláz könnyen elkülöníthető a táptalajból.

Egy éjszakán át kloramfenikol jelenlétében tenyésztett fermentálékban az alábbi mennyiségű α-amilázt mérjük.

Felüliszó	Sejtek	Teljes
egység/liter	egység/liter	egység/liter
136	14	150.

3. példa

A β-amilázt meghatározó gén klónozása

Donor mikroorganizmusként Bacillus cereus sejteket használunk, ezeket az 1 466 009 számú brit szabadalmi leírásból ismerjük (Agency of Industrial Science & Technology, Japán). A törzset a Fermentation Research Institute of Chiba-shi intézetben helyezték letétbe (Japán, 1973. december 20., sorszáma: FERM-P 2391). A törzs az American Type Culture Collection törzsgyűjteményében szintén megtalálható ATCC 31102 sorszámmal (1974. december 26.). A törzs az irodalom szerint β-amilázt és α-1,6-glükózidázt is termel.

A) A β-amiláz gén klónozása a lambda NM 781 fágban

A 2. példában megadottakat ismételjük meg a restrikciós kísérlet, a ligáció és a rekombináns fágok elkülönítése kapcsán. A 2 µg mennyiségű B. cereus dezoxi-ribonukleinsavat normál reakciókörülmények között hasítjuk az Eco RI restrikciós enzimmel. Az 1,25 µg lambda NM 781 fág vektor dezoxi-ribonukleinsavat szintén az Eco RI enzimmel kezeljük. A ligációs reakciót és fehérjeburokba való zárását az előzőekben megadottak szerint végezzük.

Több amiláz-aktivitással rendelkező rekombináns fagot találtunk (1–500). Ezek közül egyet lambda NM 781 β Amy 1 jellel jelölünk, és 1980. február 12-én NCIB 11574 sorszámmal letétbe helyezzük az NCIB törzsgyűjteménybe.

B) A lambda NM 781 β Amy 1 β-amiláz gén klónozása a pBR 322 plazmidba

Az enzintermelés növelésére az első β-amiláz klónt használjuk β-amilázt meghatározó forrásként, és szubklónozzuk a többpéldányú pBR 322 plazmidba.

2 µg lambda NM 781 β Amy 1 dezoxi-ribonukleinsavat és 1 µg pBR dezoxi-ribonukleinsavat hasítunk az Eco RI enzimmel, keverjük a fragmenseket és T4-ligázzal kezeljük. A ligációs reakciót és a transzformációt az előzőekben megadottak szerint végezzük.

A 200 ampicillin-rezisztens telep közül egy keményítő-hasító aktivitással rendelkezett. Ezt izoláltuk, és E. coli CL 7004 (pCP 3) jellel jelöljük; a törzset 1980. szeptember 15-én NCIB 11602 sorszámmal letétbe helyezzük.

c) A β-amiláz gén klónozása E. coli sejteket lizogénizáló lambda-fágba

Vektorként a 2. példában leírt hőérzékeny lambda T4 lig CI 857 Wam Eam Sam (lambda NM 989) dezoxi-ribonukleinsavat használjuk. 1 µg pCP 3 dezoxi-ribonukleinsavat és 0,5 µg fág dezoxi-ribonukleinsavat Eco RI-al hasítunk, a fragmenseket összekötjük, és a kapott dezoxi-ribonukleinsav darabokat in vitro fehérjeburokba zárjuk. Izoláljuk az amiláz-aktivitást meghatározó fág-részecskéket, és az előzőekben megadott módon lizogén telepeket állítunk elő velük. Izoláljuk az E. coli C 600 erre a rekombináns fagra lizogén törzset, E. coli CL 7005 (lambda β Amy 1) jellel jelöljük. A törzset 1980. szeptember 15-én NCIB 11603 sorszámmal letétbe helyezzük.

D) Az amilázt meghatározó gén termékének amplifikálása

Az összes klónban és szubklónban az amiláz-aktivitást DNS-módszerrel határoztuk meg. A β-amiláz aktivitást vékonyréteg-kromatográfiával mérjük oly módon, hogy az amilózt emésztve, maltóznak megfelelő, egyetlen foltot kapunk.

A β-amiláz gén különböző klónokban való amplifikálását az előzőekben megadottak szerint végezzük. A II. táblázatban ismertetjük az eredeti törzs és három klón enzim-aktivitását. Az aktivitást vagy a fág-lizátumból, vagy a 2. példában megadottak szerint végzett ozmotikus sokk után mértük.

4. példa

A pullulanáz gén klónozása

Donor mikroorganizmusként a Klebsiella pneumoniae törzset használjuk [Bender írja le, Biochem. Z., 334, 79–95 (1961)]. A törzset az ATCC törzsgyűjteménybe helyeztük letétbe 1963. június 6-án, 15050 sorszámmal. A törzs szerepel Staley 1 273 789 számú brit szabadalmi leírásában is.

2,25 µg donor dezoxi-ribonukleinsavat különítünk el, és ismert reakciókörülmények között Eco RI enzimmel hasítjuk. Hasonló enzimmel hasítunk 1,25 µg lambda NM 781 dezoxi-ribonukleinsavat, a reakciót a fentihez hasonló körülmények között végezzük. Az inkubációt 3 órán át 37 °C hőmérsékleten végezzük, ezután oly módon állítjuk le a reakciót, hogy az elegyet 10 percen át 75 °C hőmérsékleten tartjuk. A restrikciós enzimek hatását a 2. példában megadottak szerint ellenőrizzük.

A hasított dezoxi-ribonukleinsavakat ligációs reakció-

II. Táblázat

Az extracelluláris és a sejthez kötött β -amiláz aktivitás *B. cereus*-ban és a rekombinációs klónokban

	Extracelluláris aktivitás, egység/liter	%	(1) Sejthez kötött aktivitás, egység/liter	%	Összaktivitás, egység/liter
<i>B. cereus</i> (2) ATCC 31102	1420		nem határoztuk meg		1420
lambda NM 781 beta Amy 1	80				80
<i>E. coli</i> CL 7004 (pCP 3) (3)	59	77,2	17,4	22,8	76,4
<i>E. coli</i> CL 7005 (lambda beta Amy 1) (4)	19	44,2	24	55,8	43

(1) = Sejthez kötött aktivitás: lizozinnal kezeltük a sejteket, amely azok líziséhez vezetett.

(2) = 30 °C hőmérsékleten egy éjszakán át tenyésztünk az alábbi táptalajon: élesztő kivonat: 1%; bactotryptone: 1%; nátrium-klorid: 0,5%.

(3) = 37 °C hőmérsékleten tenyésztünk a fentihez hasonló összetételű táptalajon.

(4) = A tenyésztet 32 °C-on, 45 °C-on, majd 37 °C-on végezzük, az aktivitást a felülúszóban és a sejtekben határozzuk meg a lízist követően, ahogy azt az *E. coli* lambda α Amy 1 kapcsán ismertettük a 2. példában.

nak vetjük alá, izoláljuk a terméket, és *E. coli* HB 101 sejteket transzformálunk. Minden esetben a 2. példában megadottak szerint járunk el. 1 μ g lambda dezoxi-ribonukleinsavra számítva 2×10^5 plakk-képző egységet kapunk.

Két napon át 37 °C hőmérsékleten BBL Trypticase plusz 0,25% pullulán táptalajon inkubálva egyes plakkok pullulánáz-aktivitást mutatnak, azaz ezek a túlnövekvő baktériumokra jellemző, homályos gyűrűvel vannak körülvéve. A pullulánáz termelő fágok aránya 1:2500.

Egy ilyen kiválasztottunk, és lambda NM 781 Pul 1 jellel jelöljük; 1980. április 9-én NCIB 11593 sorszámmal *E. coli* HB 101-be építve letétbe helyeztük az NCIB törzsgyűjteményébe.

A pullulánáz-aktivitást dinitro-szalicilsav-módszerrel [Angl. Biochem. 45, 510 (1972)] határoztuk meg, a

25 pullulán hidrolízist követően a fág lizátumokban malto-triózt mutatunk ki vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel.

30 A lambda NM 781 Pul 1 nagyméretű dezoxi-ribonukleinsav-fragmenst tartalmaz, amely a *Klebsiella pneumoniae*-ből származik, nagysága 13,5 Kb. Ezt a fragmenst Eco RI enzimmel újra hasítjuk két részre; ekkor 6,1 Kb és 7,4 Kb nagyságú fragmenseket kapunk. A 6,1 Kb nagyságú szubfragmenst újraklónozzuk lambda NM 781-be, majd bizonyítjuk a pullulánáz meghatározó gén jelenlétét. Ezt az új rekombináns fagot lambda NM 781 Pul 2-nek neveztük el, és 1980. szeptember 15-én NCIB 11604 sorszámmal *E. coli* HB 101-be építve letétbe helyeztük.

35 A 6,1 Kb nagyságú fragmenst a pACYC 184 többpéldányú plazmidba [előállítását lásd Chang, Cohen:

III. Táblázat

A *Klebsiella* pullulánáz kifejeződése *E. coli* klónokban. Az aktivitást 1 liter tenyészetre számítva maltóz ekvivalens egységekben adjuk meg

	Felülúszó	Membrán	Összes	Az enzim- termelés fokozódása
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + maltóz	24	3,5	27,5	1
/ NM 781 Pul 1	0,76	2,6	3,86	0,14
/ NM 781 Pul 1 + maltóz	2,2	9,84	12,04	0,44
/ NM 781 Pul 2	9,6	23,8	32,9	1,19
/ NM 781 Pul 2 + maltóz	8,6	26,7	35,3	1,28
* <i>E. coli</i> CL 7006 (pCP 4)	nem mértük	3,4	3,4	0,123
* <i>E. coli</i> CL 7006 (pCP 4) + maltóz	nem mértük	114	114	4,14
** <i>E. coli</i> CL 7007 (lambda Pul 2) + maltóz	47	93,5	140,5	5,13

* = Egy éjszakán át tenyésztjük.

** = A tenyésztést 32 °C-on, 45 °C-on, ezt követően 37 °C hőmérsékleten végeztük, az aktivitást a felülúszóban, és a sejtekben is megmértük, lízist követően, ahogy azt a 2. példában megadjuk az *E. coli* lambda α Amy 1 kapcsán.

J. Bacteriol. 134, 1141–56 (1978)] szubklónozzuk. (Ez a plazmid a pBR 322 származéka, tartalmazza a Tc^R gént, és a Cm^R gént; egyetlen Eco RI hellyel együtt.) Az új klónt E. coli CL 7006 (pCP 4) névvel jelöljük, és 1980. szeptember 15-én NCIB 11605 sorzámmal letétbe helyeztük.

Előállítunk egy harmadik szubklónt is, oly módon, hogy a 6,1 Kb nagyságú fragmenst a lambda NM 989 fágba [előállítását lásd Murray és munkatársai: Molec. Gen. Genet. 150, 53–61 (1977)] juttatjuk, ahogy a 2. példában megadtuk. A klónt E. coli CL 7007 (lambda Pul 2) jellel jelöljük. A törzset 1980. szeptember 15-én helyeztük letétbe NCIB 11606 számon.

Az összes klónban vizsgáljuk a pullulanáz kifejeződésének mértékét és az amplifikációt. Az eredményeket a III. táblázatban adjuk meg.

Ahogy az a táblázat adataiból kiderül, a pullulanáz-aktivitást maltózzal indukáljuk, az LB táptalajhoz 0,04 % maltózt adagolunk. A pullulanáz kinyerésére a membrán frakciót Tryton X 100-zal kezeljük; ez azt jelenti, hogy az aktivitás a membránon lokalizálódik.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus megaterium gént tartalmazó rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy B. megaterium DNS-t és valamely lambda fág DNS-t valamely restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely DNS ligáz segítségével ligáljuk, majd defektív lambda fág lizátumokkal egyesítjük, a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coliból amiláz aktivitású telepeket izolálunk, és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó B. megaterium gént tartalmazó rekombináns DNS-t kapunk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

2. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus megaterium gént tartalmazó plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy B. megaterium gént tartalmazó, 1. igénypont szerint előállított rekombináns DNS-t és antibiotikum-rezisztenciával rendelkező plazmidot valamely restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely DNS ligázzal ligáljuk, a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coli telepekből az antibiotikum-rezisztenciát mutató telepeket szelektáljuk, és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó B. megaterium gént tartalmazó plazmidot kapunk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

3. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus coagulans gént tartalmazó rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy B. coagulans DNS-t és valamely lambda fág DNS-t valamely restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely DNS ligáz segítségével ligáljuk, majd a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coliból amiláz aktivitású telepeket izolálunk,

és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó E. coagulans gént tartalmazó rekombináns DNS-t kapunk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

4. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus coagulans gént tartalmazó plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy B. coagulans gént tartalmazó, valamely 3. igénypont szerint előállított rekombináns DNS-t és valamely plazmidot restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket DNS ligázzal ligáljuk, a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coli telepekből az amiláz-aktivitást mutató telepeket szelektáljuk, és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó B. coagulans gént tartalmazó plazmidot kapunk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

5. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus coagulans gént tartalmazó B. subtilis törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy E. coliba beépített és a 4. igénypont szerint előállított B. coagulans gént tartalmazó plazmidot restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított terméket valamely DNS ligáz segítségével B. subtilisban replikálódó, hasonló módon hasított plazmid-fragmensekkel ligáljuk, a kapott anyaggal B. subtilist fertőzünk, a fertőzött B. subtilis telepekből az amiláz-aktivitást mutató telepeket szelektáljuk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

6. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus cereus gént tartalmazó rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy B. cereus DNS-t és valamely lambda fág DNS-t valamely restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely ligáz segítségével ligáljuk, majd a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coliból amiláz aktivitású telepeket izolálunk, és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó B. cereus gént tartalmazó rekombináns DNS-t kapunk.

(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

7. Eljárás amilázt meghatározó Bacillus cereus gént tartalmazó plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy B. cereus gént tartalmazó, 6. igénypont szerint előállított rekombináns DNS-t és valamely plazmidot restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely DNS ligázzal ligáljuk, a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coli telepekből az amiláz-aktivitást mutató telepeket szelektáljuk, és így E. coliba beépítve amilázt meghatározó B. cereus gént tartalmazó plazmidot kapunk.

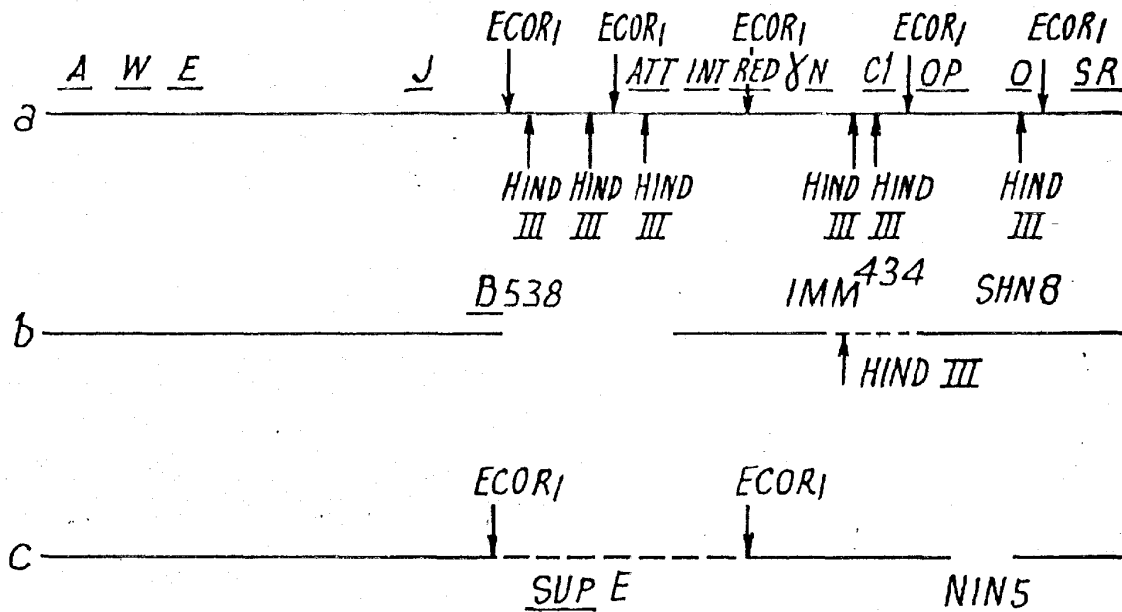
(Elsőbbsége: 1980. 02. 15.)

8. Eljárás pullulanáz-termelést meghatározó Klebsiella pneumoniae gént tartalmazó rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy K. pneumoniae DNS-t és valamely lambda fág DNS-t restrikciós endonukleázzal hasítunk, a hasított termékeket valamely DNS-ligáz segítségével ligáljuk, majd a kapott anyaggal E. colit fertőzünk, a fertőzött E. coliból pullulanáz aktivitású telepeket izolálunk, és így E. coliba beépített pullulanáz meghatározó K. pneumoniae gént tartalmazó rekombináns DNS-t kapunk.

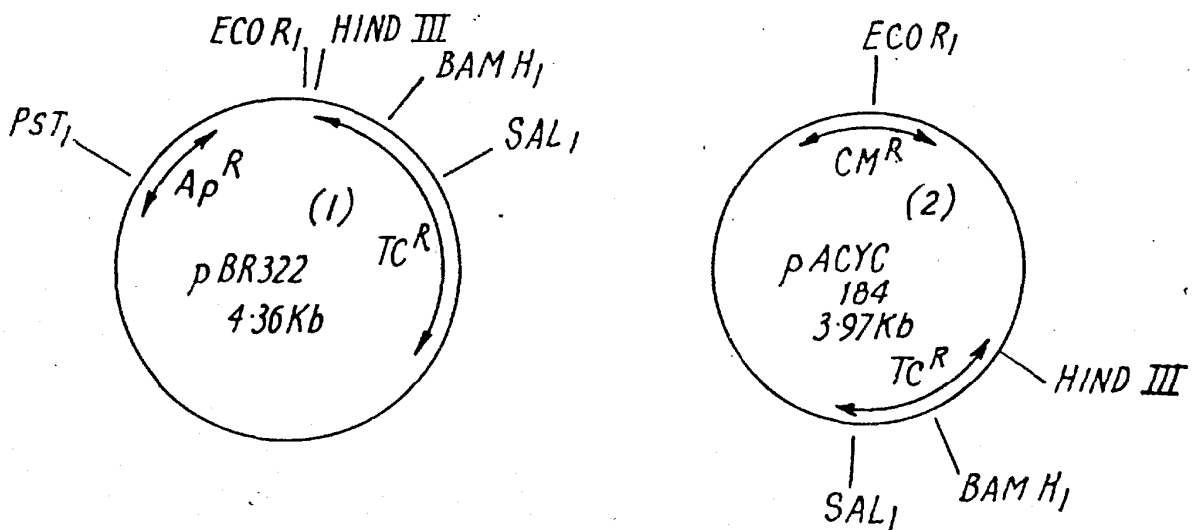
(Elsőbbsége: 1980. 04. 10.)

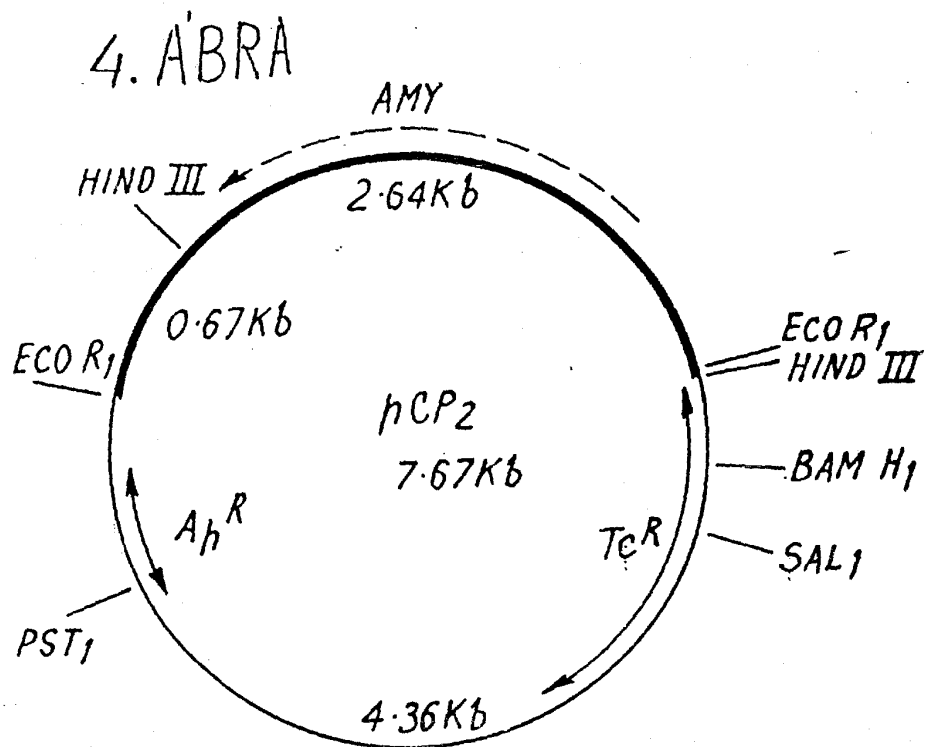
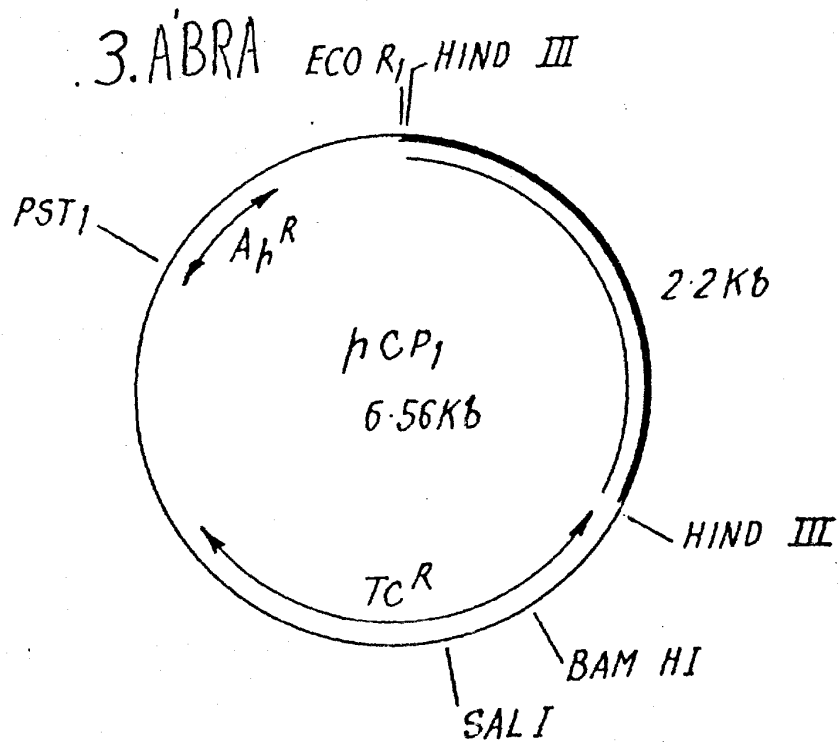
NSZO₄: C 12 N 15/00;
C 12 N 9/26

1.A'BRA



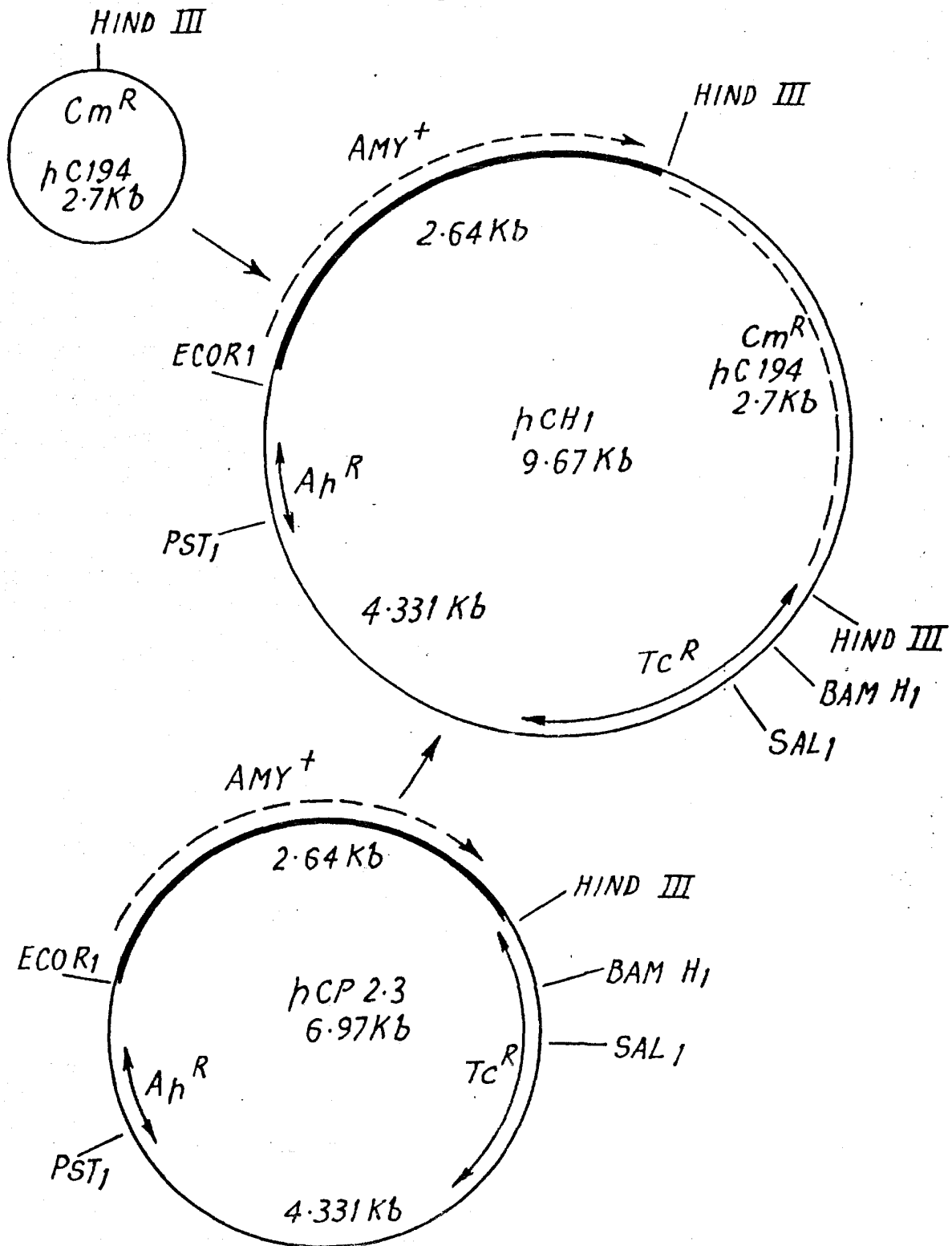
2.A'BRA



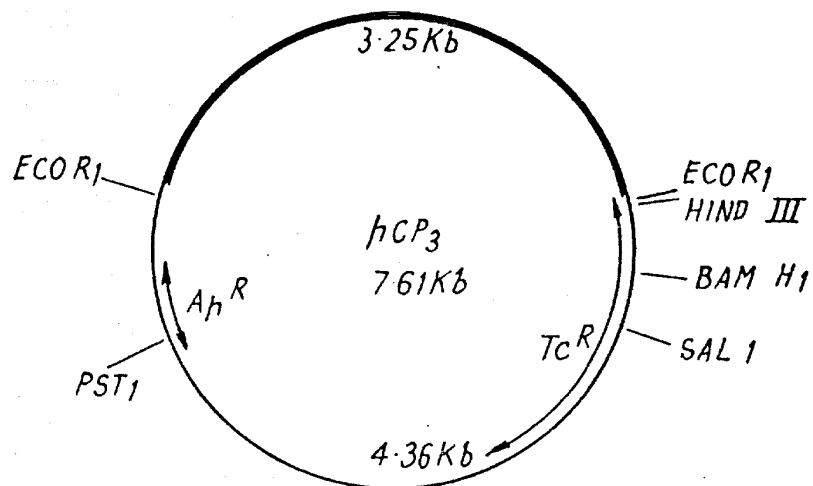
NSZO₄: C 12 N 15/00:
C 12 N 9/26

NSZO₄: C 12 N 15/00;
C 12 N 9/26

5. A'BRA



6. ÁBRA



7. ÁBRA

