

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 840104 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **840104**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **12.01.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **12.01.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **19.07.1984**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

18.01.1983 US 458792

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kovacevic, Steven, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Miller, James Robert, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Hsiung, Hansen Maxwell, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia Bacillus- ja muissa isäntäsoluissa.

Rekombinant-DNA-expressionsvektorer användbara i Bacillus- och andra värdceller.

Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektoreita, jotka ovat
käyttökelpoisia BACILLUS- ja muissa isäntäsoluissa

5 Keksinnön kohteena on yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektoreita, jotka käsittävät Bacillus subtiliksen ribosomin sitomiskohtaa koodaavan DNA-osasen liitettynä sekä B. subtiliksen veg-promoottoriin että myös geeniin, joka koodaa funktionaalisen polypeptidin. Keksinnön kohteena on myös edellä mainittujen vektoreiden transfor-

10 mantteja sekä menetelmä funktionaalisen polypeptidin tuottamiseksi, jossa polypeptidi tuotetaan Bacilluksessa ja erittyy kasvuväliaineeseen.

 Näillä keksinnöillä aikaansaadut ekspressoimisvektorit ovat käyttöä varten Bacilluksessa ja muissa

15 isäntäsoluissa. Tähän asti yhdistelmä-DNA-teknologian kehittäminen ja hyväksikäyttö Bacilluksessa on hidastunut ja tehty erityisen vaikeaksi, mikä johtuu sopivien kloonauksen- ja ekspressoimisvektoreiden yleisestä puutteesta. Tämä ekspressoimisvektoreiden harvalukuisuus selittyy

20 osaksi saatujen vieraiden transkriptio- ja translaatioaloitussignaalien tunnistamisen puutteesta Bacilluksessa. Niinmuodoin hyvin tunnettua trp-(Hallewell, R. A. ja S. Emtage, 1980, Gene 9:27), lac-(guarante, L. et al., 1980, Cell 20:543 ja Roberts, T. M. et al., 1979, Proc.

25 Nat. Acad. Sci USA 76:5596), lpp-(Lee, N. et al., 1981, J. of bacteriol. 146:861; Zwiebel, L. J. et al., 1981, J. of Bacteriol. 145:654 ja Natamura, K. ja M. Inouye, 1979, Cell 18:1109) ja bakteriofagi λ P_L-(Derom, C. et al., 1982, Gene 17:45; Remaut, E. et al., 1981,

30 Gene 15(1):81 ja Bernard, H. et al., 1979, Gene 5:59) transkriptiota ja translaatiota ohjaavat promoottorisysteemit eivät ole toiminnallisia Bacilluksessa. Siten, lukuunottamatta joitakin harvoja lääke-resistenttejä geenejä grampositiivisista organismeista kuten

35 Staphylococcus ja Streptococcus, joitakin

vieraita ja käytännöllisesti ei ollenkaan eukaryoottisia geenejä on ekspressoitu Bacilluksessa.

Bacilluksen äärimmäisen rajoitettu kyky tunnistaa vieraita transkriptio- ja translaatio-signaaleja tekee välttämättömäksi endogeenisten signaalien kehittämisen, jotka ohjaavat geenin ekspressoitumista. Useat aikaisemmat kloonausyritykset käsittävät B. licheniformis beta-laktamaasigeenin (esitetty julkaisussa European Patent Office Publication (of European Patent Application No. 81300858.8) No. 0036259) ja B. stearothermophilus ja B. amyloliquefaciens α -amylaasi-geenien (esitetty vastaavasti julkaisussa European Patent Office Publication (of European Patent Application No. 82300158.1) No. 0057976 ja Derwent Abstract'issa (belgialainen patenttihakemus no. BE 891-659) No. 37323 E/19) kloonauksen ja ekspressoimisen B. subtiliksessa. Lisäksi veg-promoottori ja translaatiosignaalit (endogeenisiä B. subtilikselle ja esittäneet Moran Jr., C. P. et al., 1982, Mol. Gen. Genet. 186:339) on myös eristetty ja ovat käyttökelpoisia lähtöaineena tämän keksinnön konstruoimistarkoituksia varten. Siten edellä mainitun veg-promoottorin ja translaatiosignaalin sisältävää sekvenssiä modifioitiin ja rakenneltiin olemaan käyttökelpoinen itse asiassa minkä tahansa polypeptidin ekspressoitumisen ohjaamiseen Bacilluksessa. Tämä edustaa merkitsevää etua tekniikan alalla ja auttaa täyttämään ekspressoimisvektoreiden tarpeen, jotka ovat käyttökelpoisia grampositiivisissä mikro-organismeissa.

Geenikloonaus ja tuotteiden ekspressointi Bacillus subtiliksessa ovat erittäin edullisia, koska organismi on ei-patogeeninen, ei tuota endotoksiineja ja pystyy erittämään geenituotteita kasvuväliaineeseen. Lisäksi B. subtilista on laajasti tutkittu ja se on alku-malli geneettisiä tutkimuksia varten gram-postiivisten mikr-organismien joukossa. Tämän keksinnön pienet ja

monipuoliset ekspressoimisvektorit ovat erinomaisen tärkeitä, koska ne sallivat näiden tärkeiden etujen kaupallisen hyväksikäytön.

5 Tämän keksinnön, kuten tässä selitetään ja vaaditaan, tarkoituksia varten määritellään seuraavat termit seuraavasti.

Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori - mikä tahan-
sa itsenäisesti replikoituva aine, joka käsittää, mutta rajoittumatta niihin, plasmideja, jotka käsittävät DNA-
10 molekyylin, johon yksi tai useampia DNA-lisäsegmenttejä voidaan lisätä tai on lisätty.

Transformointi - DNA:n tuominen vastaanottaja-
isäntäsoluun, joka muuttaa genotyyppin ja mistä siten on seurauksena muutos vastaanottajasolussa.

15 Transformantti - vastaanottajaisäntäsolu, jossa on tapahtunut transformointi.

Pilkontaosanen - kokonainen plasmidi tai kromoso-
maalinen DNA tai niiden lineaarinen osa, joka on kehi-
tetty yhden tai useampien restriktioentsyymien toimin-
20 nalla.

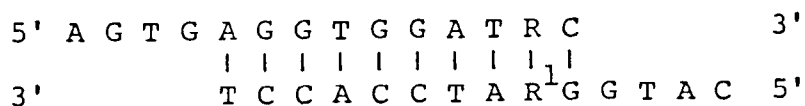
Funktionaalinen polypeptidi - talteenotettava bio-
aktiivinen kokonaan heterologinen polypeptidi tai prekursori, talteenotettava bioaktiivinen polypeptidi, joka
sisältää heterologisen polypeptidin ja homologisen poly-
25 peptidin kokonaisena tai sen osan; tai talteenotettava bioinaktiivinen yhdistynyt polypeptidi, joka sisältää heterologisen polypeptidin ja bioinaktiivisen homologi-
sen polypeptidin, joka voidaan spesifisesti lohkaista.

Yhdistynyt geenituote - talteenotettava hetero-
30 loginen polypeptidi, joka on yhdistynyt kokonaisen homolo-
logisen polypeptidin tai sen osan kanssa.

Insertionaalinen isomeeri - yksi kahdesta tai
useammasta yhdistelmä-DNA-molekyylistä, jotka ovat muo-
dostuneet, kun DNA-osan insertoidaan yhteen kahdesta
35 tai useammasta yhteensopivasta kohdasta vastaanottaja-
DNA:lla.

Erityisesti tämä keksintö antaa menetelmän yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektoreiden valmistamiseksi, joka käsittää

1) ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin



jossa

A on deoksiadenyyli,

G on deoksiguanyyli,

C on deoksisytosyyli,

T on tymidyyli,

R on G tai C, ja

R¹ on G tai C, liittämisen

2) Bacillus substiliksien vey-promoottoriin, ja

3) geeniin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, sillä ehdolla, että R ja R¹ eivät ole samanaikaisesti sama deoksiribonukleotidi ja edelleen sillä lisärajoituksella, että tämä vektori on valittavissa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi ohjaavat geenin transkriptiota ja ekspressoitumista isäntäsolussa, joka on transformoitu tällä vektorilla. Keksintö käsittää edelleen edellä mainittujen vektoreiden transformantteja sekä myös menetelmän funktionaalisen polypeptidin tuottamiseksi, jolloin polypeptidi tuotetaan Bacilluksessa ja erittyy viljelyväliaineeseen.

Ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi, johon veg-promoottori ja geeni on liitetty, voidaan syntetisoida tavanomaisesti modifioidulla fosfotriesterimenetelmällä käyttäen täysin suojattuja trideoksiribonukleotidi-rakenneryhmiä, pääasiallisesti Itakura'n et al., 1977, Science 198:1056 ja Crea'n et al., 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:5765, menetelmien mukaisesti. veg-promoottori voidaan joko syntetisoida suoraan

tai saada plasmidin pMS480 EcoRI-SfaNI-uutolla. Syntynyt n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-osanen sisältää veg-promootorin sekä myös lisä-deoksiribonukleotideja koodaavan rihman 5'-päässä (EcoRI:n komplementaarisen päätteen vieressä). Plasmidi pMS480 käsittää n. 4,8 kb ja voidaan eristää tavanomaisesti E. coli K12 JA221/pMS480:sta, kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa plasmidin pMS480 edullisena lähteenä ja varastosäilönä saantinumerolla NRRL B-15258.

Mukavuuden ja rakentelun helppouden kannalta veg-promoottori saatiin plasmidin pMS480 EcoRI-SfaNI-uutolla. Saatu osanen liitettiin sitten edellä kuvattuun ribosomin sitomiskohdan sisältävään DNA-sekvenssiin, sekvenssiin, jolla on suunniteltu olevan SfaNI- ja NcoI-komplementaariset päät. Tämä sekvenssi sallii siten polypeptidin suoran ekspressoimisen sen jälkeen kun siihen on samanaikaisesti liitetty sekä NcoI-pilkottu geeni että edellä mainittu n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-veg-promoottorin sisältävä osanen. Suora ekspressoituminen tapahtuu, koska NcoI-komplementaaristen päiden liittäminen palauttaa NcoI-pilkotun geenin ATG-translationalaisen aloituskolmikon. Synteettinen sekvenssi on sentähden hyödyllinen minkä tahansa geenin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, yleistä suoraa ekspressointia varten Bacillus subtilis-veg-promoottorin säätelyn alaisena.

Vaikka geenit, jotka luonnostaan sisältävät NcoI-kohdan translaation aloituskohdassa, ovat edullisia, voidaan käyttää myös geenejä, joista tällaiset kohdat puuttuvat. Jälkimmäisessä tapauksessa geeni voidaan pilkkoa restriktioentsyymillä ja sitten rekonstruoida synteettisesti (Itakura et al. 1977 ja Crea et al., 1978), niin että se sisältää halutun NcoI-komplementaarisen päät. Vaihtoehtoisesti, riippuen rakentelun mukavuudesta ja helppoudesta, modifioitu geeni voi olla kokonaan

synteettinen. Kummassakin tapauksessa modifioitu geeni voidaan liittää edellä mainitun ribosomin sitomiskohdan sisältävän sekvenssin NcoI-komplementaariseen päähän palauttaen siten ATG-metioniinia koodaava aloituskolmikko ja sallien siten halutun tuotteen suora ekspressoituminen. Tämän keksinnön Bacillus-promoottorin sisältävät ekspressoimisvektorit edustavat merkittävää teknistä edistystä. Ne ovat yleisesti käyttökelpoisia Bacilluksessa ja voidaan käyttää minkä tahansa polypeptidiä koodaavan geenin ekspressoitumiseen homologisen Bacillus-promoottorin säätelyn alaisena.

Tätä keksintöä kuvaavia ekspressoimisvektoreita rakennettiin liittämällä plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-osan, pre-proinsuliini-plasmidin p0W601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osan ja edellä mainittu ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi. Syntynyt plasmidi, joka on nimitetty p0W10:ksi, on funktionaalinen E. coli:ssa ja sisältää funktionaalista polypeptidiä koodaavan geenin translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoottorin kanssa. Plasmidi p0W10 on erityisen käyttökelpoinen kuvaavien ekspressoimisvektoreiden rakente-
lussa, jotka ovat funktionaalisia Bacilluksessa. Plasmidi p0W601, jota käytetään lähtöaineena plasmidin p0W10 rakentamista varten, käsittää n. 4,4 kb ja voidaan tavanomaisesti eristää E. coli K12 JA221/p0W601:stä, kannasta, joka on talletettu ja muodostaa osan pysyvästä varastoviljelykokoelmasta laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa edullisena plasmidin lähteenä ja varastosäilönä saantimerkillä NRRL B-15259.

Kuvaavia vektoreita, jotka ovat funktionaalisia Bacilluksessa, rakennetaan liittämällä EcoRI-uitettu plasmidi p0W10 EcoRI-uitettuun plasmidiin pHI-18 tai pBsl. Plasmidi pHI-18 käsittää n. 3,9 kb ja sisältää klooriamfenikoli-resistenssigeenin sekä myös replikaation

aloituskohdan, joka on funktionaalinen Bacilluksessa. Plasmidi pHI-18 rakennetaan plasmidin pHI-16 n. 0,7 kg:n HpaII-deleetiolla. Jälkimmäinen plasmidi on tunnetun kimeerisen plasmidin pBD12 in vivo-deleetio (esittänyt Gryczan et al., 1980, J. Bacteriology 141(1):246), joka voidaan tavanomaisesti eristää *Bacillus subtilis* M112/pHI-16:sta, rakennetusta kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on yleisön saatavissa plasmidin edullisena lähteena ja varastosäilönä saantinumeroilla NRRL B-12597. Edellä mainitusta liittämistä plasmidiin pHI-18 on seurauksena kuvaavat n. 8,4 kb:n plasmidit p0W525 ja p0W 526. Kummankin plasmidin p0W525 ja p0W526 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

EcoRI-uutetun plasmidin p0W10 liittännästä EcoRI-uutettuun plasmidiin pBS1 on seurauksena kuvaavat n. 12,8 kb:n plasmidit p0W527 ja p0W528. Plasmidi pBS1 rakennetaan liittämällä plasmidin pHI-18 n. 4,6 kg:n BamHI-osanen plasmidin pEL105 n. 4,4 kb:n BamHI-osaseen. Plasmidi pEL105 rakennetaan liittämällä plasmidin pLR2 (rakennettu liittämällä HindIII-uutettu plasmidi pIJ6 (esittäneet Thompson et al., 1980, Nature 286:525) ja Hind III-uutettu plasmidi pBR322) n. 1,6 kb:n BamHI-osanen plasmidin pEL103 n. 2,8 kb:n BamHI-osaseen. Jälkimmäinen plasmidi voidaan eristää tavanomaisesti *Streptomyces granulatoruber* No. A39912.13/pEL103:sta, kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta on saatavissa plasmidin edullisena lähteenä ja varastosäilönä saantinumeroilla NRRL 12549. Kummankin plasmidin p0W527 ja p0W528 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

Plasmidit p0W525, p0W526, p0W527 ja p0W528 ovat
 funktionaalisia Bacilluksessa, käsittävät funktionaali-
 sen pre-proinsuliinia koodaavan geenin translationaali-
 sessa lukusuunnassa veg-promoottorin ja ribosomin sito-
 5 miskonhdan sisältävän synteettisen DNA-sekvenssin kanssa
 ja ovat siten esimerkki tästä keksinnöstä. Muita kuva-
 via vektoreita rakennettiin 1) uuttamalla plasmidia
 p0W10 NcoI:llä ja plasmidia pMC1403 BamHI-restriktioent-
 syymillä; 2) täyttämällä syntyneet komplementaariset
 10 päät DNA-polymeraasin Klenow-fragmentilla; 3) uuttamalla
 täytettyjä osasia EcoRI-restriktioentsyymillä ja 4)
 liittämällä syntyneet kaksi osasta vastaavista EcoRI-
 ja tylpistä päistään. Plasmidi pMC1403, jota käytetään
 lähtöaineena näitä rakenteluja varten, käsittää n. 9,9
 15 kiloemästä ja sisältää osan lacZ-geenistä. Plasmidi voi-
 daan tavanomaisesti eristää E. coli K12 BE904/pMC1403:sta,
 kannasta, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää
 varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern
 Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois. Kanta
 20 on yleisön saatavissa plasmidin edullisena lähteenä ja
 varastosäilönä saantinumeroilla NRRL B-15213. Edellä mai-
 nittu liitântä palauttaa sekä NcoI-että BamHI-pilkonta-
 kohdat ja siitä on siten seurauksena plasmidi, joka on
 nimetty plasmidiksi p0W303, joka sisältää osan lacZ-
 25 geenistä translationaalisessa lukusuunnassa veg-promoot-
 torin ja ribosomin sitomiskonhdan sisältävän synteettisen
 DNA-sekvenssin kanssa.

Plasmidia p0W303 uutettiin EcoRI-restriktioent-
 syymillä ja liitettiin EcoRI-uutettuun plasmidin pHI-18
 30 antamaan kuvaavat plasmidit p0W523 ja p0W524. Samanlai-
 sesta rakentelusta, joka käsittää EcoRI-uutetun plasmidin
 pHI-18 korvaamisen EcoRI-uutetulla plasmidilla pBS1, on
 seurauksena kuvaavat plasmidit p0W529 ja p0W530. Plasmidi-
 dit p0W523, p0W524, p0W529 ja p0W530 ovat toiminnallisia
 35 Bacilluksessa, käsittävät funktionaalisen polypeptidiä
 koodaavan geenin translationaalisessa lukusuunnassa veg-

promoottorin ja edellä mainitun DNA-sekvenssin kanssa ja valaisevat siten tätä keksintöä edelleen. Edellä mainittujen vektoreiden isäntäsoluille antamaa β -galaktosidaasi-aktiivisuutta voidaan käyttää valikoitavana merkitsijänä tehden vektorit yleisesti käyttökelpoisiksi molekyylidikloonausta varten. Plasmidien p0W523, p0W524, p0W529 ja p0W530 pilkontakohtien kartat on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

Tämä keksintö antaa myös menetelmän funktionaalisen polypeptidin tuottamiseksi Bacilluksessa, jolloin tämä polypeptidi erittyy viljelyväliaineeseen. Erittyminen tapahtuu, kun tämän keksinnön polypeptidiä koodaava geeni koodaa myös signaali-peptidiä. Signaali-peptidit ovat aminohappojen lyhyitä johtoalueita, jotka usein käsittävät vasta syntetisoituja polypeptidejä ja joiden uskotaan toimivan polypeptidien kuljetuksessa solumembraanien poikki. Signaali-peptidit lohkeavat tyypillisesti vastasyntetisoiduista polypeptideistä kuljetuksen aikana. Edellä mainittu menetelmä erityistä varten, jota ei millään tavalla rajoita alla oleva kuljetusmekanismi, käsittää Bacillus-isäntäsolun transformoinnin yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorilla, joka käsittää

1) ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin

```

25      5' A G T G A G G T G G A T R C          3'
          | | | | | | | | | |
      3'          T C C A C C T A R1 G G T A C 5'

```

jossa

A on deoksiadenyyli,
 30 G on deoksiguanyyli,
 C on deoksisytosyyli,
 T on tymidyyli,
 R on G tai C, ja
 R¹ on G tai C,

2) *Bacillus subtilis*in veg-promoottorin ja

3) geenin, joka koodaa signaali-peptidin sisältävää funktionaalista polypeptidiä,

ja transformoidun *Bacillus*-isäntäsolun viljelyn kasvuolosuhteissa, sillä rajoituksella, että R ja R¹ eivät samanaikaisesti ole sama deoksiribonukleotidi ja edelleen sillä rajoituksella, että tämä vektori on valikoitavissa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi ohjaavat tämän geenin transkriptiota ja ekspressoitumista transformoidussa *Bacillus*-solussa.

Plasmidit p0W525, p0W526, p0W527 ja p0W527 sekä niiden *Bacillus subtilis* M112-transformantit ovat esimerkkinä tästä menetelmästä erityksen suhteen. Jokainen plasmideista sisältää edellä kuvatun veg-promoottorin, ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin ja geenin, joka koodaa pre-proinsuliinia, proinsuliinin signaali-peptidiä sisältävää muotoa. Kun *Bacillus subtilis*-isäntäsoluja transformoidaan näillä vektoreilla, syntyy pre-proinsuliinia solunsäisästi ja proinsuliinia erittyä viljelyväliaineeseen.

Edellä mainittu menetelmä eritystä varten ei ole rajoitettu geenien käyttöön, jotka koodaavat pre-proinsuliinia. Mitä tahansa geeniä, joka koodaa signaali-peptidin sisältävää funktionaalista polypeptidiä, voidaan käyttää ja niitä ovat esimerkiksi geenit, jotka koodaavat immuunimodulaattoreita, esikasvuhormonia, ihmisen-esikasvuhormonia, sian-esikasvuhormonia, proteolyttisesti hajoitettavia entsyymejä ja sellulolyttisesti hajottavia entsyymejä. Lisäksi DNA, joka koodaa annettua signaali-peptidiä, voidaan syntetisoida suoraan tai pilkkoa aikaisemmin olemassa olevista geeneistä ja sitten liittää geeneihin, joista normaalisti puuttuu tällaiset signaali-peptidiä koodaavat sekvenssit. Tällä tavalla mikä tahansa geeni, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, voidaan modifioida niin, että tää menetelmää eristämistä varten voidaan käyttää. Siten tämä mene-

telmiä ei rajoitu geenien käyttöön, jotka luonnostaan sisältävät signaalipeptidiä koodaavan alueen.

Tämä keksintö on erityisen monipuolinen ja sitä voidaan käyttää minkä tahansa polypeptidin tuottamiseen, jota voi koodata geeni yhdistelmä-DNA-kloonausvektoris-
 5 sa. Eräs edullinen yhdistelmä-DNA-kloonausvektori on plasmidi vaikka myös bakteriofaagia ja muita vektoreita voidaan käyttää ja ovat alaan perehtyneille selviä. Kuvavien pre-proinsuliini- ja lacZ-geenien lisäksi ovat muita
 10 geenejä, joita voidaan käyttää, geenit, joita esiintyy luonnossa, geenit, joita ei esiinny luonnossa ja geenit, jotka ovat osaksi luonnossa esiintyviä ja osaksi synteettisiä tai ei-luonnossa esiintyviä. Erityisesti geenit voivat koodata ihmisen proinsuliinia, ihmisen
 15 insuliini-A-ketjua, ihmisen insuliini-B-ketjua, ei-ihmisen insuliinia, ihmisen kasvuhormonia, ei-ihmisen kasvuhormonia, naudan kasvuhormonia, sian kasvuhormonia, ihmisen interferonia, ei-ihmisen interferonia, virusantigeeniä, urokinaasia, jotakin peptidihormonia, jota-
 20 kin entsyymiä tai itse asiassa mitä tahansa muuta polypeptidiä, jolla on tutkimusarvoa tai kaupallista arvoa.

Tämän keksinnön yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorit eivät ole rajoitettuja käytettäväksi yhdessä ainoassa lajissa tai kannassa. Päinvastoin vektorit ovat
 25 laajalti käyttökelpoisia ja voidaan transformoida monen luokan isäntäsoluihin, erityisesti Bacillus-, Streptomyces- ja E. coli-ei-pilkkoviin kantoihin. Ei-pilkkovia kantoja valikoidaan ja eristetään helposti Bacillus- ja Streptomyces-luokista tavanomaisin menetelmin ja alalla hyvin
 30 tunnettujen periaatteiden laajentamisilla (Lomovskaya et al., 1980, Microbiological Reviews 44:206). Ei-pilkkovien kantojen isäntäsoluista puuttuvat restriktioentsyymit ja sentähden ne eivät leikkaa tai hajota plasmidi-DNA:ta transformoinnin jälkeen. Tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten isäntäsoluja, jotka sisältä-

vät restriktioentsyymejä, jotka eivät leikkaa yhtäkään näiden vektorien pilkontakohdista, pidetään myös ei-pilkkovina.

Bacilluksen ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttökelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esimerkiksi lajien *B. thuringiensis* var. *israeliensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. piliformis*, *B. tropicus*, *B. alvei*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. pasteurii*, *B. fastidiosus*, *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. apiarus*, *B. amyloliquifaciens*, *B. laterosporus*, ja *B. popillae*. ei-pilkkovat solut.

Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat aminoglykosidi-antibiootteja ja joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttökelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esim. lajien: *S. kanamyceticus* (kanamysiini), *S. chrestomyceticus* (aminosidiini), *S. griseofilavus* (antibiootti MA 1267), *S. microsporeus* (antibiootti SF-767), *S. ribosidificus* (antibiootti SF733), *S. flavopersicus* (spekttinomysiini), *S. spectabilis* (aktinospektasiini), *S. rimosus* forma *paromomycinus* (paromysiinit, katernuliini), *S. fradiae* var. *italicus* (aminosidiini), *S. bluensis* var. *bluensis* (gluensomysiini), *S. catenulae* (katernuliini), *S. olivoreticuli* var. *cellulophilus* (destomysiini A), *S. tenebrarius* (tobramysiini, apramysiini), *S. lavendulae* (neomysiini), *S. albogriseolus* (neomysiinit), *S. albus* var. *metamycinus* (metamysiini), *S. hygroscopicus* var. *sagamiensis* (spekttinomysiini), *S. bikiniensis* (streptomysiini), *S. griseus* (streptomysiini), *S. erythrochromogenes* var. *narutoensis* (streptomysiini), *S. poolensis* (treptomysiini), *S. galbus* (streptomysiini), *S. rameus* (strepto-

myciini), *S. olivaceus* (streptomysiini), *S. mashuensis* (streptomysiini), *S. hygrosopicus* var. *limoneus* (validamysiinit), *S. rimofaciens* (destomysiinit), *S. hygrosopicus* forma *glebosus* (glebomysiini), *S. fradiae* (hybrimysiinit neomysiinit), *S. eurocidicus* (antibiootti Al6316-C), *S. aquacanus* (N-metyyli-hydromysiini B), *S. crystallinus* (hygromysiini A), *S. noboritoensis* (hygromysiini), *S. hygrosopicus* (hygromysiinit), *S. atrofaciens* (hygromysiini), *S. kasugaspinus* (kasugamysiinit), *S. kasugaensis* (kasugamysiinit), *S. netropsis* (antibiootti LL-AM31), *S. lividus* (lividomysiinit), *S. hofuensis* (seldomysiini kompleks), ja *S. canus* (ribosyyli paromamiini) ei-pilkkovat solut.

Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat makrolidi-antibiootteja ja joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttökelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esim. lajien *S. caelestis* (antibiootti M188), *S. platensis* (platenomysiini), *S. rochei* var. *volubilis* (antibiootti T2636), *S. venezuelae* (metymysiinit), *S. griseofuscus* (bundliini), *S. narbonensis* (josamysiini, narbomysiini), *S. fungicidicus* (antibiootti NA-181), *S. griseofaciens* (antibiootti PA133A, B), *S. roseocitreus* (albosykliini), *S. bruneogriseus* (albosykliini), *S. roseochromogenes* (albosykliini), *S. cinerochromogenes* (gineromysiini B), *S. albus* (albomysiini), *S. felleus* (argomysiini, pikromysiini), *S. rochei* (lankasidiini, borrelidiini), *S. violaceoniger* (lankasidiini), *S. griseus* (borrelidiini), *S. maizeus* (ingramysiini), *S. albus* var. *coilmyceticus* (koleimysiini), *S. mycarofaciens* (asetyyli-leukomysiini, espinomysiini), *S. hygrosopicus* (turimysiini, relomysiini, maridomysiini, tylosiini, karbomysiini), *S. griseospiralis* (relomysiini), *S. lavendulae* (aldgamysiini), *S. rimous* (neutramysiini), *S. deltae* (deltamysiinit), *S. fungicidicus* var. *espinomyceticus* (espinomysiinit),

S. furdicidicus (mydekamysiini), S. ambofaciens
 (foromasidiini D), S. eurocidicus (metymysiini), S.
 griseolus (griseomysiini), S. flavochromogenes (amaro-
 mysiini, shinkomysiinit), S. fimbriatus (amaromysiini),
 5 S. fasciculus (amaromysiini), S. erythreus (erytromy-
 siinit), S. antibioticus (oleandmysiini), S.
 olivochromogenes (oleandomysiini), S. spinichromogenes
 var. suragaoensis (kujimysiinit), S. kitasatoensis
 (leukomysiini), S. narbonensis var. josamyceticus
 10 (leukomysiini A3, josamysiini), S. albogriseolus
 (mikronomysiini), S. bikiniensis (kalkomysiini), S.
 cirratus (kirramysiini), S. djakartensis (niddamysiini),
 S. eurythermus (angolamysiini), S. fradiae (tylosiini,
 laktenosiini, makrosiini), S. goshikiensis (bandamysiini),
 15 S. griseoflavus (akumysiini), S. halstedii (karbomysiini),
 S. tendae (karbomysiini), S. macrosporeus (karbomysiini),
 S. thermotolerans (karbomysiini), ja S. albireticuli
 (karbomysiini) ei-pilkkovat solut.

Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edul-
 20 lisia isäntäsoluja, jotka tuottavat β -laktaami-antibi-
 ootteja ja joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttö-
 kelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esim. lajien:
 S. ligmanii (Al6884, MM4550, MM13902), S. clavuligerus
 (Al6886B, klavulaanihappo), S. lactamdurans (kefamysiini
 25 C), S. griseus (cephamycin A, B), S. hygrosopicus
 (deasetoksikefalosporiini C), S. wadayamensis
 (WS-3442-D), S. chartreusis (SF 1623), S. heteromorphus
 ja S. panayensis (C2081X); S. cinnamonensis, S.
 fimbriatus, S. halstedii, S. rochei ja S. viridochromogenes
 30 (kefalomysiinit A, B); S. cattleya (tienamysiini); ja
 S. olivaceus, S. flavovirens, S. flavus, S. fulvoviridis,
 S. argenteolus, ja S. sioyaensis (MM 4550 ja MM 13902)
 ei-pilkkovat solut.

Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edul-
 35 lisia isäntäsoluja, jotka tuottavat polyeetteri-anti-
 biootteja ja joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttö-

kelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esim. lajien:
S. albus (A204, A28695A ja B, salinomysiini), *S.*
hygroscopicus (A218, emerisidi, DE3936), A120A,
 A28695A ja B, eteromysiini, dianemysiini), *S. griseus*
 5 (grisoriksiini), *S. conglobatus* (ionomysiini), *S.*
eurocidicus var. *asterocidicus* (laidlomysiini), *S.*
lasaliensis (lasalosidi), *S. ribosidificus* (lonomysiini),
S. cacaoi var. *asoensis* (lysoselliini), *S.*
cinnamomensis (monensiini), *S. aureofaciens* (narasiini),
 10 *S. gallinarius* (RP 30504), *S. longwoodensis* (lysoselliini),
S. flaveolus (CP38936), *S. mutabilis* (S-11743a),
 ja *S. violaceoniger* (nigerisiini) ei-pilkkovat solut.

Streptomyces-luokan ei-pilkkovien kantojen edullisia isäntäsoluja, jotka tuottavat glykopeptidi-antibiootteja ja joissa nämä vektorit ovat erityisen käyttö-
 15 kelpoisia ja voidaan transformoida, ovat esim. lajien
S. orientalis ja *S. haranomachiensis* (vankomysiini);
S. candibus (A-35512, avoparsiini) ja *S. eburosporeus*
 (LL-AM 374) ei-pilkkovat solut.

Muiden ei-pilkkovien *Streptomyces*-kantojen edullisia isäntäsoluja, joissa nämä vektorit ovat erityisen
 20 käyttökelpoisia ja voidaan transformoida, ovat lajien
S. coelicolor, *S. granuloruber*, *S. roseosporus*,
S. lividans, *S. espinosus* ja *S. azureus* ei-pilkkovat
 25 solut.

Keksintöä ei rajoiteta käytettäväksi *Bacilluksessa* ja *Streptomyces*'issä, vaan sitä voidaan käyttää myös erilaisissa *E. coli*-isäntäsoluissa. Edullisia *E. coli*-isäntäsoluja ovat *E. coli* K12, *E. coli* K12 JA221, *E. coli*
 30 K12 HB101, *E. coli* K12 C600, *E. coli* K12 C600M_k⁻R_k⁻, *E. coli* K12 C600M_k⁺R_k⁺ ja *E. coli* K12 RV308.

Samalla kun kaikki tämän keksinnön suoritusmuodot ovat käyttökelpoisia, jotkut näistä ekspressoimisvektoreista ovat edullisia. Siten ovat edullisia vektoreita
 35 plasmidit p0W523, p=W524, p0W525, p0W526, p0W527, p0W528, p0W529 ja p0W530 ja edullisia transformantteja

ovat *Bacillus subtilis* MI112/p0W523, *B. subtilis* MI112/p0W524, *B. subtilis* MI112/p0W525, *B. subtilis* MI112/p0W526, *B. subtilis* MI112/p0W527, *B. subtilis* MI112/p0W528, *B. subtilis* MI112/p0W529 ja *B. subtilis* MI112/p0W530. Tästä edullisesta ryhmästä, plasmidit p0W523, p0W525, p0W527 ja p0W529 ja transformantit *B. subtilis* MI112/p0W523, *B. subtilis* MI112/p0W525, *B. subtilis* MI112/p0W527 ja *B. subtilis* MI112/p0W529 ovat edullisimpia.

Tämän keksinnön yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorit ja transformantit ovat laajsti käyttökelpoisia ja auttavat täyttämään ekspressoimisvälittäjien tarpeen, erityisesti käytettäväksi *Bacilluksessa*. Siten nämä vektorit sallivat tuotteiden, joita nyt biotuotetaan *E. coli:ssa*, geneettisen ekspressoimisen ja erittymisen *Bacilluksessa*. Tämä on erityisen edullista, koska *Bacilluksen* suurmittakaavainen fermentointi on paremmin tunnettu ja ymmärretty kuin *E. coli*'n fermentointi. Itse asiassa *E. coli*:n kaupallinen fermentointi on vielä suuresti kokeellista ja tulvillaan vaikeuksia. Keksintö kiertää tämän ongelman antamalla vaihtoehdon tuottaa yhdisteitä, joita nyt biosyntetisoidaan *E. coli:ssa*, kuten esim. ihmisen insuliinia, ihmisen proinsuliinia, glukagonia, interferonia, ihmisen kasvuhormonia, naudan kasvuhormonia jne. *Bacilluksessa*. Tämä voidaan tehdä, koska nämä vektorit ovat erittäin monipuolisia ja voivat mukautua DNA-sekvensseihin, jotka koodaavat edellä mainittuja tuotteita. Siten tämä keksintö antaa joustavuutta isäntien valinnassa ja antaa keinon *Bacilluksen* käyttämiseen polypeptidien ja muiden geenituotteiden biotuotannossa.

Näiden transformanttien kyky erittää polypeptidituotteita on kaupallisesti edullinen. Esimerkiksi polypeptidien eristäminen ja puhdistaminen voidaan suorittaa jatkuvasti fermentoinnin aikana ilman isäntäsolujen lyyttistä hajottamista. Erittäminen antaa myös suojan geenituotteiden proteolyyttistä hajoamista vastaan

luonnossa esiintyvien proteaasientsyymien vaikutuksesta. Mikro-organismit ovat tunnettuja tällaisten entsyymien tuottamisesta jotka nopeasti uuttavat suojaamattomia vieraita polypeptidejä. Tämä menetelmä erittämistä varten kiertää tämän ongelman antamalla keinon herkkien polypeptidien poistamiseksi isäntäsolusta ennen kuin proteolyyttinen hajoaminen voi tapahtua. Lisäksi isäntäsolut ovat myös suojattuja annetun geenituotteen myrkyllisiltä vaikutuksilta, koska erittyminen solusta estää vahingolliset vaikutukset ja mahdollisen solukuoleman, joka liittyy solun sisäiseen kasautumiseen.

Lajeja *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103, *Bacillus subtilis*/M1112/pHI-16, *E. coli* K12 JA221/pMS480, *E. coli* K12 BE904/pMC1403 ja *E. coli* K12 JA221/pOW601, plasmidien PEL103, pHI-16, pMS480, pMC1403 ja pOW601 vastaavina lähteinä ja *Streptomyces ambofaciens*'ia voidaan viljellä lukuisilla tavoilla käyttäen jotakin monista erilaisista väliaineista. Hiilihydraatti-lähteitä, jotka ovat edullisia viljelyväliaineessa, ovat esim. melassi, glukoosi, dekstriini ja glyseroli, ja typpilähteet käsittävät esim. soijajauhon, aminohapposeoksia ja peptoneja. Epäorgaanisia ravintosuoloja lisätään myös ja ne käsittävät tavalliset suolat, jotka pystyvät antamaan natrium-, kalium-, ammonium-, kalsium-, fosfaatti-, kloridi-, sulfaatti- tms. ioneja. Muiden mikro-organismien kasvua ja kehittymistä varten lisätään tarpeen mukaan myös hivenaineita. Tällaisia hivenaineita tulee tavallisesti epäpuhtauksina satunnaisesti väliaineen muita aineosia lisättäessä.

Streptomyces granuloruber No. A39912.13/pEL103:a kasvatetaan aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen laajalla pH-alueella n. 5-9 lämpötiloissa väliltä n. 15° - 40°C. Plasmidin pEL103 tuotantoa varten suurimassa määrässä, on kuitenkin toivottavaa aloittaa viljelyväliaineella pH n. 7,2:ssa ja pitää viljely n. 30°C:n

älmöpötilassa. *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/
pEL103:n viljelystä edellä mainituissa olosuhteissa on
seurauksena solujen säilö, josta plasmidi pEL103 eris-
tetään sopivasti alalla hyvin tunnetuin menetelmin.

5 Bacillus subtilis MI112/pHI-16:ta viljellään
aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen laajalla
pH-alueella n. 5-8,5 lämpötilassa väliltä n. 25° - 45°C.
Plasmidin pHI-16 tuotantoa varten suurimmassa määrässä
on kuitenkin toivottavaa aloittaa viljelyväliaineella
0 pH n. 7:ssä ja pitää viljely n. 37°C:n lämpötilassa.
Bacillus subtilis MI112/pHI-16:n viljelystä edellä maini-
tuissa olosuhteissa on seurauksena solujen säilö, josta
plasmidi pHI-16 eristetään sopivasti alalla hyvin tunne-
tuin menetelmin.

15 E. coli K12 JA221/pMS480:tä, E. coli K12 BE904/
pMC1043:a ja E. coli K12 JA221/pOW601:tä kasvatetaan
kutakin aerobisissa viljelyolosuhteissa suhteellisen
laajalla pH-alueella n. 6,5-8 lämpötiloissa väliltä
n. 25° - 40°C. Plasmidien pMS480, pMC1403 ja pOW601
20 tuottamiseksi suurimmassa määrässä on kuitenkin toivot-
tavaa aloittaa viljelyväliaineella pH n. 7,2:ssa ja pitää
yllä n. 37°C:n viljelylämpötila. E. coli-solujen vilje-
lystä edellä mainituissa olosuhteissa on seurauksena
solujen säilö, josta plasmidit vastaavasti eristetään
25 alalla hyvin tunnetuin menetelmin.

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin ja yksityiskohtaisesti tässä esitettyä keksintöä. Sekä selitys keksinnöstä että todelliset työvaiheet keksinnön rakente-
luksi kuvataan, milloin on sopivaa.

30 Esimerkki 1

Plasmidin p0W10 rakentelu

A. Plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-osasen rakentelu

1. Plasmidin pMS480 eristäminen

35 Bakteeria E. coli K12 JA221/pMS480 (NRRL B-15258)
viljeltiin TY-liemessä (1 % tryptonia, 0,5 % hiivauutet-

ta, 0,5 % natriumkloridia, pH 7) 100 μ g/ml:n kanssa antibioottia ampisilliini tavanomaisten mikrobiologisten menetelmien mukaisesti. 18 tunnin inkuboinnin jälkeen siirrettiin n. 0,5 ml viljelystä 1,5 ml:n Eppendorff-putkeen ja lingottiin n. 15 sekuntia. Ellei toisin ole esitetty, tehtiin kaikki käsittelyt ympäristön lämpötilassa. Saatu sakan päällä oleva neste poistettiin varovasti hienokärkisellä imulaitteella ja solupelletti suspendoitiin n. 100 μ l:ään vastavalmistettua lysotsyymi-liuosta, joka sisälsi 2 mg/ml lysotsyymiä, 50 mM glukosia, 10 mM EDTA (etyleenidiamiinitetra-asetaattia) ja 25 mM Tris-HCl (pH 8). 30 minuutin inkuboinnin jälkeen 0°C:ssa lisättiin n. 200 μ l alkalista SDS (natriumdodekyylisulfaatti)-liuosta (0,2N NaOH, 1 % SDS) ja sitten putkeen aikaansaatiin lievä pyörre ja pidettiin 0°C:ssa 5 minuuttia. Seuraavaksi lisättiin n. 150 μ l 3M natriumasetaattia (joka oli valmistettu liuottamalla 3 moolia natriumasetaattia minimimäärään vettä, asettamalla pH 4,8:aan jääetikalla ja asettamalla sitten tilavuus 1 litraksi) DNA-kokkareeseen, joka oli muodostettu sen jälkeen kun putken sisältöä oli heikosti sekoitettu muutama sekunti inversiolla.

Putkea pidettiin 0°C:ssa 60 minuuttia ja lingottiin sitten 5 minuuttia antamaan miltei kirkas sakan päällä oleva neste. N. 0,4 ml sakan päällä olevaa nestettä siirrettiin toiseen sentrifugiputkeen, johon lisättiin 1 ml kylmää etanolia. Sen jälkeen kun putkea oli pidetty -20°C:ssa 30 minuuttia, syntynyt sakka koottiin linkoamalla (2 minuuttia) ja sakan päällä oleva neste poistettiin imemällä. Näin koottu pelletti liuotettiin 200 μ l:ään 0,1M natriumasetatti/0,05M Tris-HCl (pH 8) ja seostettiin uudelleen lisäämällä 2 tilavuutta kylmää etanolia. 10 minuutin kuluttua -20°C:ssa sakka koottiin linkoamalla ja se muodosti halutun plasmidi-pMS480-DNA:n.

2. Plasmidin pMS480 EcoRI-SfaNI-uutto

N. 5 μ l (5 μ g) plasmidia pMS480 (eristetty esimerkissä A-1) TE-puskurissa (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 5 μ l DTT (100 mM ditioneittia) 5 μ l (1000 μ g/ml) BSA (naudan seerumialbumiinia), 25 μ l vettä, 5 μ l (5 New England Biolab-yksikköä) EcoRI-restriktioentsyymiä* ja 5 μ l 10-reaktioseosta** inkuboitii 37°C:ssa n. 1 tunti. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia. Seuraavaksi reaktioseos jäädytettiin jäissä ja sitten lisättiin n. 1,1 μ l 5M NaCl, 4 μ l vettä ja 5 μ l (5 New England Biolab-yksikköä) SfaNI-restriktioentsyymiä, mitä seurasi toinen inkubointi 37°C:ssa 1 tunnin ajan. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten reaktioseos jäädytettiin jäissä, uutettiin sekä fenolilla että kloroformi/isoamyylialkoholilla (24:1) ja saostettiin sitten etanolilla. Halutut n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-pilkontaosaset erotettiin tavalliseen tapaan ja eristettiin agarosegeeli-sähköforeesilla (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Halutut n. 0,38 kb:n osaset liuotettiin n. 30 μ l:ään vettä.

*Restriktio- ja muita entsyymejä voidaan saada seuraavista lähteistä:

New England Bio Labs., Inc.
32 Tozer Road
Beverly, Massachusetts 01915
Boehringer-Mannheim Biochemicals
7941 Castleway Drive
Indianapolis, Indiana 46250

** Reaktioseos (10X) EcoRI-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella:
500 mM NaCl
1000 nM Tris-HCl, pH 7,2
50 mM MgSO₄

B. Plasmidin p0W601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osasen rakentelu

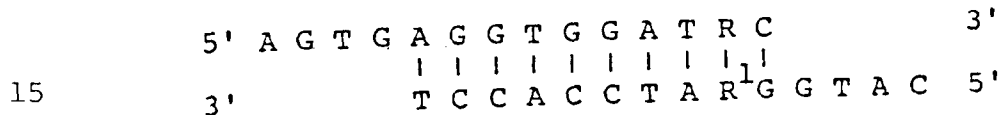
1. Plasmidin p0W601 eristäminen

Plasmidi p0W601 eristetään E. coli K12 JA221/
5 p0W601:stä (NRRL B-15259). Kanta viljeltiin ja plasmidi eristettiin pääasiallisesti esimerkin 1A-1 esityksen mukaisesti.

2. Plasmidin p0W601 EcoRI-NcoI-uutto

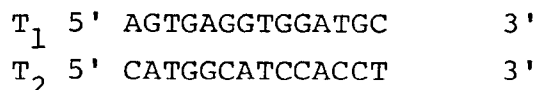
Haluttu uutto suoritetaan pääasiallisesti esi-
10 merkin 1A-2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia p0W601 eikä plasmidia pMS480.

C. DNA-osasen rakentelu



jossa R on G ja R¹ on C.

Haluttu rakentelu käsittää synteessin ja seuraavaa esitettyjen oligonukleotidien T₁ ja T₂ 5'-fosforyloinnin.
20



Oligonukleotidejä T₁ ja T₂ käytettiin halutun DNA-fragmentin rakentamiseksi, jolla oli NcoI-komplementaarinen pää. Oligonukleotidi-synteesi toteutettiin tavanomaisesti modifioidulla fosfotriesteri-menetelmällä käyttäen täysin suojattuja deoksiribonukleotidirakenneryhmiä.
25

Edellä mainitulle synteесille on tyypillistä seuraava menettely osaselle T₁, kuten on yhteenvedona esitetty oheisten piirrosten kuvassa 3. Eri nukleotidi-osat, joita on käytetty T₁:n synteесissä, on merkitty numeroin kuvassa. Käytetyt lyhennykset ovat seuraavat: MSTe, mesityleenisulfonyylitetratsoli; BSA, bentseenisulfonihappo; TLC, ohutlevykromatografia; HPLC, suurteho-
30
35

nestekromatografia; DMT, 4,4'-dimetoksitriityyli; CE, 2-syaanietyyli; R, p-kloorifenyyli; Bz, bentsoyyli; (Y)₂NH, di-isopropyyliamiini; iBu, isobutyryyli; Py, pyridiini; AcOH, etikkahappo.

- 5 Täysin suojattujen deoksiribotetranukleotidien 2 (312 mg, 0,15 mmoolia) ja deoksiribodinukleotidien 4 (50 mg, 0,017 mmoolia) sulut puretaan 5'-hydroksyyleillä käsittelemällä 2-%:sella BSA 7:3 (tilav./tilav.) kloroformi/metanolissa (2:lla ja 1 ml:lla, vastaavasti)
- 10 10 minuuttia 0°C:ssa. Reaktiot lopetetaan lisäämällä kyllästettyä vesipitoista ammoniumbikarbonaattia (2 ml), uutetaan kloroformilla (25 ml) ja pestään vedellä (kaksi kertaa, 10 ml). Orgaaniset kerrokset kuivataan (magnesiumsulfaatti), haihdutetaan pieniin tilavuuksiin
- 15 (n. 5 ml) ja saostetaan lisäämällä petrolieetteriä (35° - 60°C:n jae). Värittömät sakat kootaan linkoamalla ja kuivataan eksikkaattorissa tyhjässä antamaan 6 ja 8, vastaavasti, kumpikin homogeeninen piihappogeelittlc:lla (Merck 60 F254, kloroformi/metanoli, 9:1).
- 20 Tetrameerit 1 ja 3 (400 mg, 0,17 mmoolia; 100 mg, 0,0343 mmoolia) muutetaan fosfodiestereikseen (5 ja 6) käsittelemällä di-isopropyyliamiini pyridiinillä (1:5, tilav./tilav., 2 ml) 30 minuuttia ympäristön lämpötilassa. Reaktioseos saostettiin sitten lisäämällä vedetöntä eetteriä (20 ml). Reagenssit poistetaan linkoamalla
- 25 ja dekantoimalla päällä oleva neste. Jäännökset kuivataan haihduttamalla vedettömän pyridiinin kanssa. Dimeeri 8 (0,04 mmoolia) ja tetrameeri 7 yhdistettään MSTe:n (65 mg, 0,25 mmoolia) kanssa vedettömässä pyridiinissä (1 ml) ja reaktioseos jätetään ympäristön lämpötilaan kahdeksi tunniksi. TLC-analyysi osoittaa, että 95 % dimeeristä 8 on muuttunut heksameeri-tuotteeksi (tehty
- 30 näkyväksi havaitsemalla DMT-ryhmä suihkuttamalla 10-%:sella vesipitoisella rikkihapolla ja kuumentamalla 100°C:ssa).
- 35 Reaktioseos saostetaan lisäämällä eetteriä ja sakan pääl-

lä oleva neste dekantoidaan. Heksameerin sulku puretaan 5'-asemassa 2-%:sella BSA (8 ml) kuten edellä dimeerille 4 ja tetrameerille 2 kuvattiin. Tuote (10) puhdistetaan piihappogeelipylväällä (Merck 60 H, 3,5 x 5 cm) vaihegradientti-eluoinnilla kloroformi/metanolilla (98:2 - 95:5, tilav./tilav.). Jakeet, jotka sisältävät tuotetta 10, haihdutetaan kuiviin.

Samalla tavalla tetrameeri 5 yhdistetään tetrameeriin 6 ja täysin suojattu tuote puhdistetaan suoraan piihappogeelillä. Tämän jälkimmäisen yhdisteen sulku puretaan 3'-päässä di-isopropyliamiini/pyridiinillä, kuten edellä kuvattiin, antamaan osan 9.

Lopuksi oktomeeri 9 ja heksameeri 10 yhdistetään vedettömässä pyridiinissä (0,5 ml) kondensatioaineena MSTe (100 mg, 0,39 mmoolia). Kun tämä on loppuunsuoritettu (45 min., ympäristön lämpötila) seos haihdutetaan pyörivällä haihduttimella ja jäännös kromatografoidaan piihappogeelillä. Annoksessa yhdistettä 11: (20 mg) pyridiinissä (0,5 ml) puretaan sulku täydellisesti käsittelemällä väkevällä ammoniumhydroksidilla (7 ml, 8 tuntia, 60°C) ja käsittelemällä sen jälkeen 80-%:sessa etikkahapossa (15 minuuttia, ympäristön lämpötilassa). Etikkahapon haihduttamisen jälkeen kiinteä jäännös liuotetaan tislattuun veteen (2 ml) ja uutetaan etyylieterillä (3 x, 2 ml). Vesipitoinen faasi haihdutetaan kuiviin ja liuotetaan uudelleen 50-%:seen pyridiiniin vedessä. Tuote puhdistettiin valmistavalla ohutlevykromatografialla polyetyleni-imiini-selluloosa (PEI/UV₂₅₄)-levyillä (Narang S. A. et al., 1980, Methods in Enzymology 65:610) sitten HPLC:lla kääntöfaasi C-18-kolonnilla (Waters). 12:n sekvenssi vahvistetaan kaksikulotteisella sekvenssianalyysillä.

Seuraavaksi rakennettiin oligonukleotidi T₂. Tämä tehtiin pääasiallisesti edellä esitetyn synteesiprotokollan mukaisesti oligonukleotidiä T₁ varten.

10 mikrogramman määriä syntynyttä oligonukleotidiä T_1 ja T_2 fosforyloidaan kvantitatiivisesti $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ -ATP:llä (New England Nuclear) T_4 -polynukleotidi-kinasin läsnäollessa antamaan spesifiset aktiivisuudet
 5 n. 1 Ci/mmol. Radiomerkattuja osasia puhdistetaan 20-%:selä polyakryyliamidi/7M ureageeli-sähköforeesilla ja eluotujen osasten sekvenssit varmistetaan osittaisten käärmemyrkkyyutteiden kaksikulotteisella sähköforeesi/homokromatografialla (Jay et al., 1974, Nucleic acids
 10 Res. 1:331). Oasia T_1 ja T_2 lämpökäsitellään sitten tavanomaisesti halutun DNA-osasen muodostamiseksi.

D. Plasmidin p0W10 rakentelu liittämällä 1) plasmidin pMS480 n. 38 kb:n EcoRI-SfaNI-osanen; 2) plasmidin p0W601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-osanen ja 3) esimerkin 1C
 15 synteettinen DNA-osanen sekä E. coli K12 JA221/p0W10:n rakentelu

N. 8 μ l (0,01 μ g) plasmidin pMS480 n. 0,38 kb:n EcoRI-SfaNI-fragmenttia, 8 μ l (0,10 μ g) plasmidin p0W601 n. 4 kb:n EcoRI-NcoI-fragmenttia, 10 μ l (0,7
 20 μ g) esimerkin 1C DNA-fragmenttia, 10 μ l vettä, 4 μ l (10 mM) ATP, 2,5 μ l (100 mM) ditiotreitolia (DTT), 5 μ l liitännäseosta** ja 2,5 μ l T_4 DNA-ligaasia* (n. 2 New England Bio Lab-yksikköä) inkuboitiiin 16°C:ssa n. 16 tuntia. Reaktio lopetettiin inkuboimalla 65°C:ssa 10 mi-
 25 nuuttia ja sitten, jäissä jäädyttämisen jälkeen, käytettiin syntynyt liitetty seos transformoimaan E. coli K12 JA221 (NRRL B-15211) pääasiallisesti Lederberg'in ja Cohen'in, 1974, J. Bacteriology 119:1072 transfor-
 mointimenettelyn mukaisesti TY-levyllä, joka sisäl-

30 * T_4 -DNA-ligaasia saadaan seuraavasta lähteestä:

New England Bio Labs., Inc.
 32 Tozer Rd.
 Beverly, Massachusetts 01951

**Liitännäseos valmistettiin seuraavalla kokoonpanolla:
 35 500 mM Tris-HCl, pH 7,6
 100 mM MgCl_2

si 10 μ l/ml antibioottia tetrasykliini. Syntyneitä transformantteja viljeltiin tavalliseen tapaan ja käytettiin plasmidin p0W10 myöhempää tuotantoa ja eristämistä varten pääasiallisesti esimerkin 1A menettelyn mukaisesti. Plasmidin p0W10 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

Esimerkki 2

Plasmidien p0W525 ja p0W526 sekä E. coli K12 JA221/p0W525:n ja E. coli K12 JA221/p0W526:n rakentaminen

A. Plasmidin pHI-16 eristäminen

1. Bacillus subtilis M1112/pHI-16:n viljely

Bacillus subtilis M1112/pHI-16:n (NRRL B-12597) vegetatiivinen viljely valmistettiin tavanomaiseen tapaan levittämällä PAB-agarille (PAB* /Penassay-liemi/, joka sisälsi agaria 15 g/l ja klooriamfenikolia 10 μ g/ml). Sen jälkeen kun ympättyä levyä oli inkuboitu 37°C:ssa n. 18 tuntia, valikoitiin yksi ainoa pesäke ja käytettiin 500 ml:aan steriloitua PAB-väliainetta, jossa oli 10 μ g/ml klooriamfenikolia, ymppäämiseen. Syntynyttä ympättyä lientä inkuboitiin 37°C:ssa n. 18 tuntia, minkä jälkeen syntyneet Bacillus subtilis M1112/pHI-16-solut olivat valmiit korjattavaksi talteen ja sen jälkeen plasmidi-DNA:n eristämistä varten.

*PAB voidaan saada firmasta Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

2. Plasmidin eristäminen

N. 10 g (märkäpaino) Bacillus subtilis M1112/pHI-16-soluja koottiin ensin talteen linkoamalla (10 minuuttia, 4°C, 10,000 r/min), pestiin sitten n. 50 ml:ssa TES (10 mM Tris (pH 8), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) ja koottiin lopuksi uudelleen linkoamalla. Pellettiin lisättiin n. 20 ml TE-puskuria, jossa oli 25 % sakkaroosia, mitä seurasi n. 10 mg lysotsyymiä 250 μ l:ssä vettä. Seosta inkuboitiin 37°C:ssa n. 30 minuuttia, mitä seurasi n. 100 yksikön RNase lisääminen. Syntynyttä seosta inkuboitiin jälleen 37°C:ssa 30 minuuttia ja sitten

sen jälkeen kun se oli tehty 1-%:seksi ja 1M:ksi SDS:n (natriumdodekyylisulfaatin (ja vastaavasti natriumkloridin suhteen, seosta jäähdytettiin jäähauteella n. 3 tuntia. Lysaatin linkoamisen jälkeen (30 minuuttia, 4°C, 5 19,000 r/min) sakan päällä oleva neste asetettiin 31,8 ml:ksi TE:lla ja sitten lisättiin 28,7 g keesiumkloridia ja 0,4 ml (10 mg/ml) etidiumbromidia. Keesiumkloridigradientti asetettiin linkoamalla kierrosnopeudella 49,500 r/min 16 tuntia. Plasmidi-nauha kerättiin ja lingottiin 10 kierrosnopeudella 55,000 r/min 16 tuntia, kerättiin uudelleen, uutettiin kolmesti yhtä suurilla tilavuusmäärillä isoamyylialkoholia, dialysoitiin laimeata TE:tä vastaan, saostettiin etanolilla ja suspendoitiin uudelleen 400 µl:ään TE. Syntynyt plasmidi pHI-16 DNA varastoitiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten. 15

Plasmidin pHI-16 n. 0,74 kg:n HpaII-osanen sisältää kanamysiini-resistenssigeenin. Siten käsittelystä HpaII-restriktioentsyymillä, jota seurasi liitäntä, on tuloksena n. 3,9 kb:n plasmidi, joka tässä on nimetty 20 pHI-18:ksi, josta puuttuu kanamysiini-resistenssigeeni. Yksityiskohtainen menetelmä plasmidin pHI-18 rakentamiseksi selostetaan seuraavassa.

B. Plasmidin pHI-18 rakentelu

1. Plasmidin pHI-16 osittainen HpaII-uutto
25 N. 5 µl (2,5 µg) plasmidi-pHI-16-DNA, 1 µl (2 mg/ml) BSA, 37 µl vettä, 2 µl HpaII (joka sisältää 2 New England Bio Labs-yksikköä)-restriktio-entsyymiä ja 5 µl reaktioseosta* inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunti. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu kuumentamalla 65°C:ssa 10 minuuttia. DNA saostettiin lisäämällä 2 tilavuutta 95-%:sta etanolia. Syntynyt DNA-sakka pestiin 70-%:ses- 30 sa etanolissa, kuivattiin tyhjässä, suspendoitiin 5 µl:ään TE-puskuria ja varastoitiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten

35 *Reaktioseos HpaII-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla kokoonpanolla:

60 mM KCl
 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
 100 mM MgCl₂
 10 mM ditiotreitolia

5 2. Plasmidin pHI₁₆ HpaII-uutteen liitöntä

N. 5 μ l plasmidin pHI-16 HpaII-uutetta (valmistettu esimerkissä 3B-1) 2 μ l T4 DNA-ligaasia ja 43 μ l liitöntäseosta* inkuboitiin n. 16°C:ssa n. 18 tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 5 μ l 3M natriumasettaattia ja 150 μ l 95-%:sta etanolia. Haluttu DNA-sakka pestiin 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspendoitiin 10 μ l:aan TE-puskuria ja varastoitettiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten.

* Liitöntäseos valmistettiin seuraavalla kokoonpanolla.

15 66 mM Tris-HCl, pH 7,8
 10 mM ditiotreitoli
 6,6 mM MgCl₂
 4 mM ATP

C. Bacillus subtilis MI112/pHI-18:n rakentelu

20 Bacillus subtilis MI112 voidaan saada tavanomaisesti viljelemällä B. subtilis MI112/pHI-16:ta (NRRL B-12597) klooriamfenikolin poissaollessa. B. subtilis MI112/pHI-16-solut menettävät itsestään pHI-16 plasmidin edellä mainituissa viljelyolosuhteissa kehittäen siten
 25 halutun klooriamfenikoliherkän B. subtilis MI112-kannan. Alaan perehtyneet tietävät ja ymmärtävät, että herkkyyttä klooriamfenikolille voidaan käyttää sen testaamiseen ja varmistamiseen, että valikoidaan ainoastaan B. subtilis MI112-soluja, joista plasmidi puuttuu, ja käytetään
 30 tässä esitetyissä Bacillus-transformointimenetelmissä.

N. 50 ml steriiliä PAB ympättiin Bacillus subtilis MI112:lla ja inkuvoitiin 37°C:ssa kunnes saavutettiin solutiheys 2×10^8 solua/ml. Soluista erotettiin sitten alkulima käyttäen steriilitekniikkaa pelleteoimalla
 35 ja suspendoimalla solut sitten uudelleen n. 5 ml:aan SMMP (yhtä suuret tilavuusmäärät sekä 4 x PAB ja liuosta,

- joka käsittää 1,0M sakkaroosia, 0,04M maleiinihappoa ja 0,04M MgCl_2 , pH asetettu 6,5:een NaOH:lla). Sitten lisättiin n. 250 μl lysotsyymiä (20 mg/ml SMM:ssa) /0,5M sakkaroosia, 0,02M maleiinihappoa ja 0,02M MgCl_2 , pH asetettu 6,5:een NaOH:lla/) käyttäen suodatinsterilointia. Soluja inkuboitiin lievästi ravistellen 37°C :ssa n. 2 tuntia. Saadut alulimat pelletoitettiin, pestiin 5 ml:lla SMMP ja suspendoitiin sitten uudelleen 5 ml:aan SMMP. Linkoamisen jälkeen (25°C , 12 minuuttia, 2,600 r/min) transformoitiin n. 0,1 ml alkulimoista lisäämällä n. 20 μl 1:1 seosta, joka sisälsi plasmidin pHI-18-DNA:ta ja 2X SMM. Sitten lisättiin välittömästi n. 1,5 ml PEG-liuosta (40 g PEG 6000 /polyetyleeniglykolia/, 50 ml 2X SMM ja vettä 100 ml:ksi) ja n. 2 minuutin kuluttua lisättiin myös 5 ml SMMP. Seuraavaksi alulimat pelletoitettiin, suspendoitiin 1 ml:aan SMMP ja inkuboitiin 30°C :ssa lievästi ravistellen n. 2 tuntia. Näin valmistetun suspension tasaosia levitettiin klooriamfenikoli-levyille, jotka sisälsivät DM3-regenerointiväliainetta, jolla litraa kohti oli seuraava koostumus.
- 91 g D-mannitolia 555 ml:ssa deionoitua vettä, joka sisälsi 12 g agaria
 - 10 g kasaminohappoja 50 ml
 - 10 g hiivauutetta 50 ml
 - 20 % glukoosia 25 ml
 - 5 % dikaliumfosfaattia 100 ml
 - 1M MgCl_2 20 ml
 - 10 % gelatiinia
 - 10 mg klooriamfenikolia
- D-mannitolia, kasaminohappoja hiivauutetta käsiteltiin auklaavissa yhdessä. Gelatiini lisättiin välittömästi autoklaavi-käsittelyn jälkeen ja jäljellä olevat aineosat lisättiin seoksen jäähtyttyä. Väliaineen lopullinen klooriamfenikoli-pitoisuus oli 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Syntyneet klooriamfenikoli-resistentit pesäkkeet

testattiin kanamysiini-herkkyyden suhteen. Valikoitiin klooriamfenikoliresistentti ja kanamysiini-herkkä pesä-
ke halutuksi *Bacillus subtilis* MI112/pHI-18 kannaksi.
Tätä kantaa viljeltiin ja sen identtisyys vahvistettiin
5 lisäksi tavanomaisella restriktioentsyymillä ja perusta-
van plasmidin agarosigeeli-sähköforeesianalyysillä
(Maniatis et al., 1982).

D. Plasmidien pHI-18 ja pOW10 EcoRI-uutto

10 N. 4 μ l (3 μ g) pHI-18, 1 μ l (1 mg) pOW10,
5 μ l vettä, 1 μ l 10X EcoRI-puskuria ja 1,5 μ l
(joka sisälsi 5 New England Bio Lab-yksikköä) EcoRI-
restriktioentsyymiä inkuboitiin 37°C:ssa 1,5 tuntia.
Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 65°C:
ssa 10 minuuttia, EcoRI-uutettu DNA jäähdytettiin jäissä,
15 saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 30 μ l:ään
vettä.

E. Plasmidin pHI-18- ja pOW10-EcoRI-uutteiden lii-
tääntä sekä *E. coli* K12 JA221/pOW525:n ja *E. coli* K12
JA221/pOW526:n rakentaminen

20 N. 30 μ l pHI-18- ja pOW10-EcoRI-uutteita, 4 μ l
(100 mM) 10X ditiotreitolia, 4 μ l (10 mM) ATP, 4 μ l
10X ligaasi-puskuria ja 1 μ l (joka sisälsi 3 New
England Bio Labs-yksikköä) T4-DNA-ligaasia, inkuboitiin
16°C:ssa n. 4 tuntia. Reaktio lopetettiin inkuboimalla
25 65°C:ssa 10 minuuttia ja sitten, jäissä jäähdyttämisen
jälkeen, syntynyt liitetty DNA käytettiin transformoi-
maan *E. coli* K12 JA221 (NRRL B-15211) pääasiallisesti
Lederberg'in ja Cohen'in (1974) transformointimenetelmän
mukaisesti TY-levyillä, jotka sisälsivät 10 μ g/ml
30 tetrasykliiniä. Saatuja transformantteja viljeltiin
tavanomaiseen tapaan ja käytettiin plasmidien pOW525
ja pOW526 myöhempää tuotantoa ja eristämistä varten
pääasiallisesti esimerkin 1A menetelmän mukaisesti.
Plasmidit pOW525 ja pOW526 voidaan tunnistaa ja erottaa
35 toisistaan tavanomaisesti restriktioentsyymillä ja aga-
roosigeeli-sähköforeettisella analyysillä (Maniatis

et al., 1982). Plasmidien p0W525 ja p0W526 pilkontakoh-
tien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

Esimerkki 3

5 Bacillus subtilis MI112/p0W525:n ja B. subtilis
MI112/p0W526:n rakentaminen

Haluttut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esi-
merkin 2C menettelyn mukaisesti, paitsi että käytettiin
plasmideja p0W525 ja p0W526 eikä plasmidia pHI-18. Syn-
tyneet Bacillus subtilis MI112/p0W525- ja B. subtilis
10 MI112/p0W526-klooriamfenikoliresistentit ja kanamysii-
ni-herkät transformantti-pesäkkeet eristetään tunnettu-
jen menetelmien mukaisesti ja tunnistetaan sitten ta-
vanomaisesti restriktioentsyymillä ja perustavien plasmi-
dien agaroosigeeli-sähköforeesianalyysillä. Näin raken-
15 netut transformantit, jotka ovat käyttökelpoisia plasmi-
dien p0W525 ja p0W526 myöhempää tuotantoa ja eristämis-
tä varten, tuottavat pre-proinsuliinia solunsisäisesti
ja eritävät myös proinsuliinia viljelyväliaineeseen. Tä-
mä määritettiin kummankin solulysaatin ja viljelyväliai-
20 neen in vitro analyysillä.

Esimerkki 4

Plasmidien p0W527 ja p0W528 sekä E. coli K12
JA221/p0W527 ja E. coli K12 JA221/p0W528:n
rakentaminen

25 Halutut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esi-
merkin 2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin
plasmidia pBS1 eikä plasmidia pHI-18. Plasmidi pBS1
rakennetaan kuten seuraavassa esitetään.

A. Plasmidin PEL103 eristäminen

30 1. Streptomyces granuloruber No. A39912.13/
pEL103 viljely

Streptomyces granuloruber No. A39912.13/PeL103:n
(NRRL 12549) vegetatiivinen ympäristö valmistettiin tavalli-
seen tapaan viljelemällä kantaa aerobisissa uppo-olo-
35 suhteissa 50 ml:ssa steriloitua tryptikaasi-soija-

tä* pitoisuudessa 35 g/l deionoidussa vedessä.

Tryptikaasi-soijaliemiymppiä inkuboitiin 48 tuntia 30°C:n lämpötilassa. Inkuboinnin jälkeen . 10 ml ymppiä siirrettiin 500 ml:aan steriloitua lientä ja inkuvoitiin n. 20 tuntia 30°C:ssa. pH:ta ei asetettu. Inkuvoinnin jälkeen *Streptomyces granuloruber* No. A399 No. A39912.13/pEL103-solut olivat valmiit korjuuta varten ja plasmidi-DNA:n myöhempää eristämistä varten.

10 *Tryptikaasi-soijaliemi saadaan firmasta BBL Division, Becton-Dickinson & Company, Cockeysville, Maryland 21030

2. Plasmidin eristäminen

N. 12 g (märkä paino) *Streptomyces granuloruber* No. A39912.13/pEL103-soluja lingottiin (10 minuuttia, 4°C, 10,000 r/min), pestiin 10-%:sessa glyserolissa ja korjattiin sitten talteen linkoamalla uudelleen edellä mainituissa olosuhteissa. Soluihin lisättiin n. 50 ml TES-puskuria (0,01M Tris(hydroksimetyyli)amioetaania /Tris/, 0,001M EDTA, 34 % sakkaroosia, pH 8), mitä seurasi n. 0,25 g lysotsyymiä 10 ml:ssa 0,25M EDTA. Sen jälkeen kun seosta oli inkuboitu 37°C:ssa n. 15 minuuttia, lisättiin n. 0,5 ml 10-%:sta Triton X-100 TE-puskurissa (0,01M Tris, 0,001M EDTA, pH 8). Syntynyt seosta inkuboitiin sitten 65°C:ssa n. 15 minuuttia. Sen jälkeen kun lusaattia oli lingottu (45 minuuttia, 4°C, 18,000 r/min) sakan päällä olevaa nestettä uutettiin neljä kertaa isoamyylialkoholilla ja kerran kloroformi-isoamyylialkoholi-liuoksella (24:1). Seuraavaksi lisättiin 0,1 tilavuutta 3M natriumasetaattia vesipitoiseen faasiin, mitä seurasi kolme tilavuutta kylmää (-20°C) 95-%:sta etanolia. Etanoli-saostus suoritettiin nopeasti kuivassa jää-etanoli-kylvyssä ja DNA-sakka koottiin linkoamalla (15 minuuttia, 4°C, 10,000 r/min. Sakka kuivattiin tyhjössä ja suspendoitiin uudelleen 1,1 ml:aan STE-puskuria (0,01M Tris, 0,001M EDTA, 0,01M natriumklo-

ridia). Linkoaminen (40 tuntia, 15°C, 35,000 r/min) käyttäen keesiumkloridi-gradientteja, etidiumbromidin kanssa, suoritettiin plasmidi-DNA:n puhdistamiseksi. Linkoamisen jälkeen haluttu plasmidi pEL103-DNA-rihma
 5 poistettiin ja etidiumbromidi uutettiin tavanomaisin menetelmin. DNA:n saostamisen jälkeen kolmeen tilavuuteen etanolia näin eristetty plasmidi pEL103-DNA liuotettiin 1 ml:aan 10-kertaisesti laimennettua TE-puskuria ja varastoitiin sitten -20°C:ssa.

10 B. Plasmidin pLR2 rakentaminen

1. Plasmidin pIJ6 HindIII-uutto

N. 20 µl (20 µg) plasmidi pIJ6-DNA:ta, jonka on esittänyt Thompson et al., 1980, Nature 286:525, 5 µl BSA (naudan seerumialbumiini, 1 mg/ml), 19 µl vettä,
 15 1 µl HindIII- (joka sisältää kolme New England Bio Labs-yksikköä) restriktioentsyymiä ja 5 µl reaktio-seosta* inkuboitiin 37°C:ssa 2 tuntia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 50 µl 4M ammoniumasetaattia ja 200 µl 95-%:sta etanolia. Saatu DNA-sakka pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä, suspen-
 20 doitiin 20 µl:ään TE-puskuria ja varastoitiin -20°C:ssa.

* Reaktioseos HindIII-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella.

25 600 mM NaCl
 100 mM Tris-HCl, pH 7,9
 70 mM MgCl₂
 10 mM ditiotreitolia

2. Plasmidin pBR322 HindIII-uutto

30 N. 8 µl (4 µg) plasmidi pBR322-DNA:ta*, 5 µl reaktioseosta, 5 µl BSA (1 mg/ml), 31 µl vettä ja 1 µl HindIII-restriktioentsyymiä inkuboitiin 37°C:ssa 2 tuntia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 60°C:ssa 10 minuuttia lisättiin n. 50 µl 4M
 35 ammoniumasetaattia ja 200 µl 95-%:sta etanolia. Syntynyt DNA-sakka pestiin kahdesti 70-%:sessa etanolissa, kui-

vattiin tyhjössä ja suspendoitiin 45 μ l:ään vettä.

*Plasmidi pBR322 voidaan saada firmasta Boehringer-Mannheim Biochemicals, jonka osoite on annettu esimerkiksi 1A-2.

- 5 3. HindIII-uutettujen plasmidien pIJ6 ja
 pBR322 liitäntä
- N. 20 μ l HindIII-käsiteltyä plasmidia pIJ6, 20
 μ l HindIII-käsiteltyä plasmidia pBR322, 5 μ l BSA
 (1 mg/ml), 1 μ l T4-DNA-ligaasia ja 5 μ l liitäntä-
10 seosta* inkuboitiin 16°C:ssa 4 tuntia. Reaktio lopetet-
 tiin lisäämällä n. 50 μ l 4M ammoniumasetaattia ja 200
 μ l 95-%:sta etanolia. Syntynyt DNA-sakka pestiin kah-
 desti 70-%:sessa etanolissa, kuivattiin tyhjössä ja
 suspendoitiin TE-puskuriin. Suspendoitu DNA muodosti ha-
15 lutun plasmidin pLR2.

*Liitäntäseos valmistettiin seuraavalla koostumuksella.

500 mM Tris-HCl, pH 7,8
200 mM ditiotreitolia
20 100 mM MgCl₂
 10 mM ATP

- C. E. coli K12 HB101/pLR2:n rakentaminen
- N. 10 ml E. coli K12 HB101-soluja (Bolivar et al.,
 1977, Gene 2:75-93) pelleteoitiin linkoamalla ja suspen-
25 doitiin sitten n. 10 ml:aan 0,01M natriumkloridia. Seu-
 raavaksi solut pelleteoitiin uudelleen, suspendoitiin
 uudelleen n. 10 ml:aan 0,03M kalsiumkloridia, inkuboi-
 ttiin jäissä 20 minuuttia, pelleteoitiin kolmannen kerran
 ja suspendoitiin lopuksi uudelleen 125 ml:aan 0,03M kal-
30 siumkloridia. Syntynyt solususpensio oli kelvollista
 myöhempää transformointia varten.

- Plasmidi pLR2 TE-puskurissa saostettiin etano-
 lilla, suspendoitiin 150 μ l:ään 30 mM kalsiumkloridi-
 liuosta ja sekoitettiin lievästi koeputkessa n. 200
35 μ l:n kanssa kelvollisia E. coli K12 HB101-soluja. Syn-

tynyttä seosta inkuboitiin jäissä n. 45 minuuttia ja sitten 42°C:ssa n. 1 minuutti. Seuraavaksi lisättiin n. 3 ml L-lientä (Bertani, 1951, J. Bacteriology 62:293), joka sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä. Seosta inkuboitiin ravistaen 37°C:ssa 1 tuntia ja levitettiin sitten L-agar-levyille (Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs, Cold Spring Harbor, New York), joka sisälsi ampisilliiniä. Eloojääneet pesäkkeet valikoitiin ja testattiin odotetun fenotyypin suhteen (Amp^R, Test^S) ja ne muodostivat halutut E. coli Kl2 HB101/pLR2-transformantit.

D. Plasmidien pEL107 ja pEL105 rakentaminen

1. Plasmidin pLR2 BamHI-uutto ja tiostreptoni-resistenssin antavan n. 1,6 pb:n osan eristäminen

N. 50 µg plasmidi pLR2-DNA:ta, 10 µl reaktio-seosta*, 10 µl BSA (1 mg/ml), 29 µl vettä ja 1 µl (4-yksikköä/µl) BamHI-restriktioentsyymiä inkuboitiiin 37°C:ssa 2 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasettaattia ja 2,5 tilavuutta 95-%:sta etanolia seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla ja suspendoitiin sitten n. 50 µl:ään TE-puskuria. Haluttu n. 1,6 kb:n BamHI-pilkontaosan eristettiin tavalliseen tapaan DNA-suspensiosta agarosigeelissä sähköforeesilla (Maniatis et al. 1982). Eristämisen jälkeen osan suspendoitiin uudelleen n. 20 µl:ään TE-puskuria jälkeentulevaa liitääntää varten.

2. Plasmidin pEL103 osittainen BamHI-uutto

N. 20 µg plasmidi pEL103-DNA:ta, 10 µl reaktio-seosta, 10 µl BSA (1 mg/ml), 39 µl vettä ja 1 µl BamHI-restriktioentsyymiä (valmistettu laimentamalla 2 µl entsyymiä 8 µl:ssä vettä) inkuboitiin ympäristön lämpötilassa n. 15 minuuttia. Sen jälkeen kun oli lisätty yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasettaattia ja 2 ti-

lavuutta 95-%:sta etanolia, seosta jäähdytettiin -20°C :ssa n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi DNA-sakka koottiin linkoamalla, huuhdeltiin 70-%:sessa etanolissa, kuivatettiin tyhjiössä ja suspendoitiin n. 50 μl :ään TE-puskuria.

5 3. Liitântä

Seosta, jossa oli n. 20 μ g osittain uutettua plasmidi pEL103-DNA:ta, 10 μ g plasmidin pLR2 n. 1,6 kb:n BamHI-pilkontaosasia, 5 μ l liitöntäseosta, 5 μ l BSA (1 mg/ml), 10 μ l vettä ja 1 μ l T4-DNA-ligaasia, inkuboi-
tiin n. 16°C:ssa n. 4 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisät-
ty 40 μ l 4M ammoniumasetattia ja 200 μ l kylmää etano-
lia, seosta jäähdytettiin -20°C:ssa n. 18 tuntia DNA:n
saostamiseksi. DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin
70-%:sella etanolilla, koottiin jälleen ja suspendoitiin
sitten 50 μ l:ään väliainetta P (Hopwood ja Wright 1978,
Molecular and General Genetic 162:307) myöhempää trans-
formointia varten.

20 Saadaan eri tyyppisiä yhdistelmä-plasmideja riip-
puen siitä mikä mahdollisista pELl03-pilkontaosasista
tulee liitetyksi n. 1,6 kb:n BamHI-tiostreptoniresistenssin
25 antavaan osaseen. Liitäntä plasmidin pELl03 n. 2,8 kb:n
BamHI-pilkontaosaseen antaa halutut n. 4,4 kb:n plasmi-
dit pELl07 ja pELl05. Saadaan kahdella tavalla suunnat-
tuja yhdistelmä-plasmideja, koska n. 1,6 kb:n BamHI-
resistenssiä antava osanen voi olla suuntautunut jompaan-
25 kumpaan suuntaan. Kummankin plasmidin pELl07 ja pELl05
pilkontakohtien ja funktionaalinen kartta on esitetty
oheisten piirrosten kuvassa 4.

30 E. Streptomyces ambofaciens/pEL107:n ja S.
ambofaciens/pEL105:n rakentaminen

Käyttäen n. 20 μ g DNA:ta esimerkiksiä 4D-3 ja 1×10^8 *Streptomyces ambofaciens*'in, kannan, joka on talletettu ja tehty osaksi pysyvää varastoviljelykokoelmaa laboratoriossa Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, josta se on yleisön saatavissa saanti-

numerolla NRRL 2420, protoplastia (valmistettu Baltz'in mukaisesti, 1978, J. of General Mikrobiology, 107:93), tehtiin halutut rakentelut pääasiallisesti International Publication'in (of International Patent Application No. PCT/GB79/00095) No W079/0,1169, esimerkin 2 mukaisesti. Halutut transformantit valikoitiin tiostreptoniresistenssin suhteen peittämällä regeneroituvat protoplastit modifioidulla r2-väliaine-(Baltz, 1978, J. of General Mikrobiology 107:93) pinta-agarilla, joka sisälsi riittävästi tiostreptonia lopullisen levyväkevyyden saamiseksi 50 μ g:ksi/ml. Syntyneet *Streptomyces ambofaciens*/pEL107- ja *S. ambofaciens*/pEL105-tiostreptoniresistentit pesäkkeet eristettiin tunnettujen menetelmien mukaisesti, viljeltiin ja tunnistettiin sitten restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien geelielektroforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982).

Siten erilaisten eristettyjen pesäkkeiden vegetatiivisia ymppejä (10 ml) valmistetaan tavanomaiseen tapaan ymppeämällä tryptikaasi-soijalientä, joka sisältää riittävästi tiostreptonia lopullisen väkevyyden saamiseksi 50 μ g:ksi/ml. Valmistetaan useita ymppejä ja toteutetaan seuraava menettely kunnes kaikki halutut transformantityypit ja perustavat plasmidit on eristetty. Siten, sen jälkeen kun soluja on inkuboitu 30°C:ssa kunnes ne ovat täydellisesti kasvaneet, lingotaan 6 ml soluja sisältävää lientä. Syntynyt pelletti pestään TE-puskurissa, pelletoidaan uudelleen ja suspendoidaan sitten 400 μ l:ään 50 mM Tris, pH 8,0. Seuraavaksi lisätään n. 80 μ l 0,25M EDTA, 20 μ l RNAasia ja 100 μ l (10 mg/ml TE:ssä) lysisyymiä. Sen jälkeen kun seosta on inkuboitu 37°C:ssa n. 15 minuuttia, lisätään n. 10 μ l 10-%sta Triton X-100 ja 150 μ l 5M NaCl, mitä seuraa lopullinen inkubointi 60°C:ssa 15 minuuttia. Syntynyttä lisaattia lingotaan (15 minuuttia, 4°C, 15,000 r/min) ja sitten sakan päällä olevaa nestettä uutetaan tavalliseen tapaan kahdesti fenolilla, kerran kloroformi/isoamyylialkoholi-liuoksella.

la (24:1) ja saostetaan sitten etanolilla. Perustavien plasmidien ja siten transformanttien identtisyys määritetään tavanomaiseen tapaan restriktioentsyymillä ja agaroosigeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Plasmidi pEL105 eristettiin tavanomaiseen tapaan plasmidin pBS1 myöhempää rakentamista varten.

F. Plasmidien pBS1 ja pBS3 rakentaminen

1. Plasmidin pEL105 osittainen BamHI-uutto

N. 10 μ l (5 μ g) plasmidia pEL105 (eristetty tavalliseen tapaan *Streptomyces ambofaciens*/pEL105:stä [valmistettu esimerkissä 4E] pääasiallisesti esimerkin 4A-1 esityksen mukaisesti), 2 μ l BSA (1 mg/ml), 29 μ l vettä, 1 μ l BamHI- (laimennettu vedellä suhteessa 1:4) restriktioentsyymiä 5 μ l reaktioseosta inkuboitiin 25°C:ssa 15 minuuttia. Reaktio lopetettiin lisäämällä n. 50 μ l 4M ammoniumasettaattia ja 300 μ l 95-%:sta etanolia. Jäähdyttämisen jälkeen -20°C:ssa n. 2 tuntia syntynyt DNA-sakka koottiin linkoamalla, pestiin kahdesti 70-%:ses-
sa etanolissa, kuivattiin tyhjössä ja suspendoitiin sit-
ten n. 10 μ l:ään TE-puskuria. Koska plasmidilla pEL105 on kaksi BamHI-pilkontakohtaa, saadaan kahden eri frag-
mentin seos.

2. Plasmidin pHI-18 BamHI-uutto

N. 5 μ l (5 μ g) plasmidia pHI-18, 2 μ l BSA (1 mg/ml), 9 μ l vettä, 1 μ l BamHI- (4 yksikköä/ μ l) restriktioentsyymiä ja 1,5 μ l reaktioseosta inkuboi-
tiin 37°C:ssa n. 2 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty yhtä suuri tilavuusmäärä 4M ammoniumasettaattia ja 2,5 ti-
lavuutta 95-%:sta etanolia seosta jäähdytettiin -20°C:ssa
n. 18 tuntia DNA:n saostamiseksi. DNA-sakka koottiin
linkoamalla, pestiin 70-%:sessa etanolissa ja suspendoi-
tiin sitten n. 10 μ l:ään TE-puskuria.

3. Liitäntä

N. 5 μ l BamHI-uutettua plasmidia pHI-18, 8 μ l plasmidi pEL105 BamHI-osittaisuutetta, 27 μ l vettä, 5 μ l (4 mM) ATP, 5 μ l liitäntäseosta ja 2 μ l

T4-DNA-ligaasia inkuboitiin 16°C:ssa n. 18 tuntia. Reak-
tio lopetettiin lisäämällä 50 µl 4M ammoniumasetaattia
ja 200 µl 95-%:sta etanolia. Inkuboinnin jälkeen -20°C:ssa
n. 2 tuntia haluttu plasmidi pBS1- ja pBS3-DNA-sakka
5 koottiin linkoamalla, pestiin 70-%:sessa etanolissa,
kuivattiin tyhjöissä, suspendoitiin 10 µl:ään TE-pusku-
ria ja varastoitiin 4°C:ssa tulevaa käyttöä varten.

Koska plasmidilla pEL105 on kaksi BamHI-pilkonta-
kohtaa, on osittaisesta BamHI-uutosta seurauksena kaksi
10 n. 4,4 kb:n BamHI-osasta. Siten plasmidien pBS1 ja pBS3
insertio-isomeerit valmistuvat myös edellä kuvatulla
menetelmällä. Syntyy plasmideja, joilla on kaksi suuntaus-
ta, koska BamHI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankum-
paan suuntaan. Kummankin plasmidin pBS1 ja pBS3 pilkonta-
15 kohtien ja toiminnallinen kartta on esitetty oheisten
piirrosten kuvassa 5.

G. *Bacillus subtilis* M1112/pBS1:n ja *B. subtilis* M1112/pBS3:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esi-
merkin 2C menettelyn mukaisesti, paitsi että käytettiin
20 plasmideja pBS1 ja pBS3 eikä plasmidia PHI-18. Syntyneet
Bacillus subtilis M1112/pBS1- ja *B. subtilis* M1112/pBS3-
klooriamfenikoliresistentit ja kanamysiini-herkät trans-
formanttipesäkkeet eristettiin tunnettujen menetelmien
25 mukaisesti, viljeltiin ja tunnistettiin sitten tavanomai-
sesti restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien
agaroosigeeni-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al.,
1982). *Bacillus subtilis* M1112/pBS1 valikoitiin ja vil-
jeltiin plasmidin pBS1 jälkeentulevaa eristämistä varten.

30 H. Plasmidien p0W527 ja p0W528 sekä *E. coli* K12
JA221/p0W527:n ja *E. coli* K12 JA221/p0W528:n
lopullinen rakentaminen

Halutut plasmidit p0W527 ja p0W528 sekä trans-
formantit *E. coli* K12 JA221/p0W527 ja *E. coli* K12
35 JA221/p0W528 rakennettiin pääasiallisesti esimerkin 2
menettelyn mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidi-
a pBS1 eikä plasmidia PHI-18. Syntyy yhdistelmäplasmidi-

deja, joilla on kaksi suuntausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jompaankumpaan suuntaan. Kummankin plasmidin p0W527 ja p0W528 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 1.

5

Esimerkki 5

Bacillus-subtilis M1112/p0W527:n ja B. subtilis M1112/p0W528:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkiksi 2C esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmideja p0W527 ja p0W528 eikä plasmidia pHI-18. Syntyneet Bacillus subtilis M1112/p0W527- ja B. subtilis M1112/p0W528-klooriamfenikoliresistentit ja kanamysiini-herkät transformanttipesäkkeet eristetään tunnettujen menetelmien mukaisesti ja tunnistetaan sitten tavanomaiseen tapaan restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien agaroosigeeni-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982). Täten rakennetut transformantit, jotka ovat käyttökelpoisia plasmidien p0W527 ja p0W527 myöhempää tuotantoa ja eristämistä varten, tuottavat pre-proinsuliinia solunsisäisesti ja erittävät myös proinsuliinia viljelyväliaineeseen. Tämä määritettiin sekä solu-lysaattien että viljelyväliaineen in vitro-analyysillä.

Esimerkki 6

Plasmidin p0W303 ja E. coli K12 BE904/p0W303:n rakentaminen

A. Plasmidin p0W10 NcoI-uutto

N. 2 μ l (2 μ g) plasmidia p0W10 (valmistettu esimerkissä 1D), TE-puskurissa, 25 μ l (100 mM) DTT, 0,5 μ l (1000 ug/ml) BSA, 17 μ l vettä, 1 μ l (joka sisälsi neljä New England Bio Lab-yksikköä) NcoI-restriktioentsyymiä ja 2,5 μ l 10X reaktioseosta* inkuboitiin 37°C:ssa 1,5 tuntia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia, uutettu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 34,5 μ l:ään vettä.

35

*Reaktioseos NcoI-restriktioentsyymiä varten valmistettiin seuraavalla koostumuksella.

1500 mM NaCl

60 mM Tris-HCl, pH 7

60 mM MgCl₂

B. Plasmidin pMC1403 BamHI-uutto

5 Haluttu uutto suoritettiin pääasiallisesti esi-
merkin 6A esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin
plasmidia pMC1403 ja BamHI-restriktioentsyymiä sekä
reaktioseosta eikä plasmidia p0W10 ja NcoI-restriktio-
entsyymiä ja reaktioseosta. Plasmidi pMC1043 eristettiin
10 E. coli K12 BE904/pMC1403:sta (NRRL B-15213) pääasial-
lisesti esimerkin 1A-1 esityksen mukaisesti. Uutettu
DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin 34,5 μ l:ään
vettä.

15 C. NcoI-uutetun plasmidin p0W10 ja BamHI-uutetun
plasmidin pMC1043 Klenow-täyttö

Esimerkkien 6A ja 6B ja NcoI- ja BamHI-uutteet
yhdistettiin (69 μ l) ja inkuboitiin sitten 4 μ l:n kanssa
jokaista seuraavista dATP, dGTP, dCTP ja TTP, 5 μ l:n
(joka sisälsi 10 yksikköä DNA polymeraasi I suurta
20 (Klenow) osasta* ja 10 μ l 10X Klenow-puskuria (0,5M
Tris-HCl, pH 7,2, 0,1M MgSO₄, 1 mM DTT) kanssa 16°C:ssa
30 minuuttia. Sen jälkeen kun reaktio oli lopetettu
inkuboimalla 65°C:ssa 10 minuuttia DNA saostettiin eta-
nolilla, uutettiin kerran fenolilla ja kahdesti klorofor-
25 mi/isoamyylialkoholilla (24:1) ja saostettiin sitten
uudelleen etanolilla. Klenow-täytetty DNA liuotettiin
20 μ l:ään vettä myöhempää EcoRI-uuttoa varten.

30 *DNA polymeraasi I:n Klenow-osanen voidaan saada seuraa-
vasta lähteestä.

Boehringer-Mannheim Biochemicals

7941 Castleway Drive

Indianapolis, Indiana 46250

35 D. Klenow-täytettyjen NcoI- ja BamHI-osasten
EcoRI-uutto

N. 20 μ l (4 μ g) Klenow-täytettyä DNA:ta, 5 μ l

(100 mM) DTT, 5 μ l (1000 mg/ml) BSA, 2 μ l (joka sisältää 10 New England Bio Lab-yksikköä) EcoRI-restriktioentsyymiä ja 5 μ l (10X) reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa 1 tunti ja sitten 65°C:ssa 10 minuuttia. Syntynyt EcoRI-uutettu DNA saostettiin etanolilla ja liuotettiin sitten 30 μ l:ään vettä.

E. EcoRI-uutettujen Klenow-täytettyjen NcoI- ja BamHI-osasten liitäntä ja E. coli Kl2 BE904/p0W303:n rakentaminen

N. 30 μ l EcoRI-uutettuja Klenow-täytettyjä osasia, 4 μ l (100 mM) DTT, 4 μ l (100 mM) ATP, 4 μ l 10X ligaasipuskuria ja 1 μ l (joka sisälsi 10 New England Bio Lab-yksikköä) T4 DNA-ligaasia inkuboitiin 16°C:ssa n. 16 tuntia ja sitten 65°C:ssa 10 minuuttia. Jäissä jäähdyttämisen jälkeen käytettiin n. 15 μ l syntynyttä liitettyä DNA:ta, joka tässä on nimetty plasmidiksi p0W303, transformoimaan E. coli Kl2 BE904 (NRRL B-15212). Tämä tehtiin pääasiallisesti esimerkin 1D menetelmän mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmidia p0W303 eikä plasmidia p0W10 ja 80 μ g/ml ampisilliinia tetrasyklinin asemasta. Lisäksi TY-levyt sisälsivät 40 μ g/ml 5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galaktosidia (x-gal), niin että väriä voitiin käyttää sopivana β -galaktosidaasi-aktiivisuuden määrittämiseksi. Syntyneet siniset ja ampisilliiniresistentit transformantit muodostuvat halutun E. coli Kl2 BE904/p0W303:n. Transformantteja viljeltiin käyttäen tavanomaisia mikrobiologisia menetelmiä ja käytettiin plasmidin p0W303 myöhempää tuotantoa ja eristämistä varten pääasiallisesti esimerkin 1A-1 menetelmän mukaisesti. Plasmidin p0W303 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

Esimerkki 7

Plasmidien p0W523 ja p0W524 sekä E. coli Kl2 BE904/p0W523:n ja E. coli Kl2 BE904/p0W524:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esimerkkien 2D ja 2E esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin

tettiin plasmidia p0W303 eikä plasmidia p0W10 ja 80 $\mu\text{g/ml}$ ampisilliinia käytettiin tetrasykliinin asemasta. Lisäksi TY-levyt sisälsivät 40 $\mu\text{g/ml}$ x-gal, niin että väriä voitiin käyttää β -galaktosidaasi-aktiivisuuden sopivana määrittymisenä. Saadaan yhdistelmä-plasmideja, joilla on kaksi suuntausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jommassakummassa suunnassa. Kummankin plasmidin p0W523 ja p0W524 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piirrosten kuvassa 2.

10

Esimerkki 8

Bacillus subtilis M112/p0W523:n ja B. subtilis M112/p0W524:n rakentaminen

15

Halutut rakentelut tehtiin pääasiallisesti esimerkiksi 2C esityksen mukaisesti, paitsi että käytettiin plasmideja p0W523 ja p0W524 eikä plasmidia pHI-18. Lisäksi regeneroimisväliaine modifioitiin niin, että se sisälsi 40 $\mu\text{g/ml}$ x-gal, niin että väriä voitiin käyttää β -galaktosidaasi-aktiivisuuden sopivana määrittymisenä. Syntyneet Bacillus subtilis M112/p0W523- ja B. subtilis M112/p0W524-klooriamfenikoli-resistentit ja kanamysiini-herkät transformantti-pesäkkeet eristettiin tunnettujen menetelmien mukaisesti. Transformantit tuottivat tummansinisiä pesäkkeitä x-gal sisältävillä levyillä, mikä osoitti, että geeni, joka koodasi β -galaktosidaasiaktiivisuutta, oli oikeassa translationaalisessa lukusuunnassa suoraa ekspressointia varten. Tämä vahvistettiin lisäksi in vitro-määrittelyksellä, joka osoitti β -galaktosidaasi-aktiivisuuden läsnäolon transformanteissa, sekä myös plasmidien rakenneanalyysillä. Haluttu- ja B. subtilis M112/p0W523- ja B. subtilis M112/p0W524-transformantteja viljeltiin ja tunnistettiin sitten tavanomaisesti restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien agarosigeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al., 1982).

30

Esimerkki 9

Plasmidien p0W529 ja p0W530 sekä E. coli K12
BE904/p0W529:n ja E. coli K12 BE904/p0W530:n
rakentaminen

5 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkkien 2D ja 2E esityksen mukaisesti, paitsi että
käytetään plasmideja p0W303 ja pBS1 eikä plasmideja
p0W10 ja pHI-18, ja että käytetään 80 µg/ml ampisilliiniä
10 tetrasykliinin asemesta. Lisäksi TY-levyt sisältävät
40 µg/ml x-gal, niin että väriä voidaan käyttää
β-galaktosidaasi-aktiivisuuden sopivana määrittämis-
Saadaan rekombinantti-plasmideja, joilla on kaksi suun-
tausta, koska EcoRI-pilkottu DNA voidaan liittää jommas-
sakummassa suunnassa. Kummankin plasmidin p0W529 ja
15 p0W530 pilkontakohtien kartta on esitetty oheisten piir-
rosten kuvassa 2.

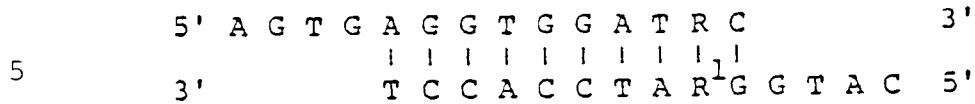
Esimerkki 10

Bacillus subtilis MI112/p0W529:n ja B. subtilis
MI112/p0W530:n rakentaminen

20 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkin 8 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
plasmideja p0W529 ja p0W530 eikä plasmideja p0W523 ja
p0W524. Transformantit antavat tummansinisiä pesäkkei-
tä x-gal sisältävillä levyillä, mikä osoittaa, että
25 geeni, joka koodaa β-galaktosidaasiaktiivisuutta on
oikeassa translationaalisessa lukusuunnassa suoraa
ekspressoointia varten. Tämä vahvistetaan lisäksi in vit-
ro-määrittäyksellä, joka osoittaa, β-galaktosidaasiakti-
ivisuuden läsnäolon transformanteissa, sekä myös plasmidi-
30 dien rakenneanalyysillä. Haluttuja B. subtilis
MI112/p0W529- ja B. subtilis MI112/p0W530-transformant-
teja viljellään ja tunnistetaan sitten tavanomaisesti
restriktioentsyymillä ja perustavien plasmidien aga-
roosigeeli-sähköforeesianalyysillä (Maniatis et al.,
35 1982).

Esimerkki 11

DNA-osasen rakentaminen



jossa R on C ja R¹ on G.

Haluttu rakentaminen käsittää seuraavassa esitettyjen oligonukleotidien T₃ ja T₄ synteessin ja 5'-fosforyloinnin.

T₃ 5' AGTGAGGTGGATCC 3'

T₄ 5' CATGGGATCCACCT 3'

Oligonukleotideja T₃ ja T₄ käytettiin halutun DNA-osasen rakentamiseen, jolla on NcoI-komplementaarinen pää BamHI-pilkontakohdan vieressä. Oligonukleotidi-synteesi suoritettiin tavanomaisesti modifioidulla fosfotriesterimenetelmällä käyttäen täysin suojattuja deoksiribonukleotidi-rakenneryhmiä. Haluttu rakentaminen tehtiin pääasiallisesti esimerkin 1C esityksen mukaisesti.

20 Esimerkki 12

Plasmidin p0W11 ja E. coli K12 JA221/p0W11:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 1 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään esimerkin 11 DNA-osasta eikä esimerkin 1C DNA-osasta. Plasmidin p0W11 pilkontakohtien kartta on samanlainen, paitsi edellä mainittua BamHI-kohtaa, kuin on esitetty plasmidille p0W10 kuvassa 1 oheisissa piirroksissa.

30 Esimerkki 13

Plasmidien p0W531 ja p0W532 sekä E. coli K12 JA221/p0W531:n ja E. coli K12 JA221/p0W532:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 2 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia p0W11 eikä plasmidia p0W10. Kummankin plasmidin p0W531 ja p0W532 pilkontakohtien kartta on samanlainen.

nen, lukuunottamatta edellä mainitulle lisä-BamHI-kohdalle p0W11-osasesta, kuin on esitetty plasmideille p0W525 ja p0W526 oheisten piirrosten kuvassa 1.

Esimerkki 14

5 Bacillus subtilis M1112/p0W531:n ja Bacillus subtilis M1112/p0W532:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 3 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmideja p0W531 ja p0W532 eikä plasmideja p0W525 ja p0W526.

10 Esimerkki 15

Plasmidien p0W533 ja p0W534 sekä E. coli JA221/p0W533:n ja E. coli K12 JA221/p0W534:n rakentaminen

15 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 4 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia p0W11 eikä plasmidia p0W10. Kummankin plasmidin p0W533 ja p0W534 pilkontakohtien kartta on samanlainen, paitsi edellä mainitulle lisä-BamHI-kohdalle p0W11-osasesta, kuin oheisten piirrosten kuvassa 1
20 plasmideille p0W527 ja p0W528 esitettiin.

Esimerkki 16

Bacillus subtilis M1112/p0W533:n ja Bacillus subtilis M1112/p0W534:n rakentaminen

25 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 5 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmideja p0W533 ja p0W534 eikä plasmideja p0W527 ja p0W528.

Esimerkki 17

30 Plasmidin p0W310 ja E. coli K12 BE904/p0W310:n rakentaminen

Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esimerkin 6 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään plasmidia p0W11 eikä plasmidia p0W10. Plasmidin p0W310 pilkontakohtien kartta on samanlainen, lukuunottamatta
35 edellä mainitulle lisä-BamHI-kohdalle p0W11-osasesta, kuin plasmidille p0W303 oheisten piirrosten kuvassa 2 esitetty.

Esimerkki 18

Plasmidien p0W535 ja p0W536 sekä E. coli K12
BE904/p0W535:n ja E. coli K12 BE904/p0W536:n
rakentaminen

- 5 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkin 7 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
plasmidia p0W310 eikä plasmidia p0W303. Kummankin plas-
midin p0W535 ja p0W536 pilkontakohtien kartta on saman-
lainen, lukuunottamatta edellä mainitulle lisä-BamHI-
10 kohdalle p0W310-osasesta, kuin plasmideille p0W523 ja
p0W524 oheisten piirrosten kuvassa 2 esitetty.

Esimerkki 19

Bacillus subtilis MI112/p0W535:n ja Bacillus
subtilis MI112/p0W536:n rakentaminen

- 15 Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkin 8 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
plasmideja p0W535 ja p0W536 eikä plasmideja p0W523
ja p0W524.

Esimerkki 20

Plasmidien p0W537 ja p0W538 sekä E. coli K12
BE904/p0W537:n ja E. coli K12 BE904/p0W538:n
rakentaminen

- Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkin 9 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
25 plasmidia p0W310 eikä plasmidia p0W303. Kummankin plasmi-
din p0W537 ja p0W538 pilkontakohtien kartta on samanlai-
nen, lukuunottamatta edellä mainitulle lisä-BamHI-koh-
dalle p0W310-osasesta, kuin oheisten piirrosten kuvas-
sa 2 plasmideille p0W529 ja p0W530 esitetty.

30 Esimerkki 21

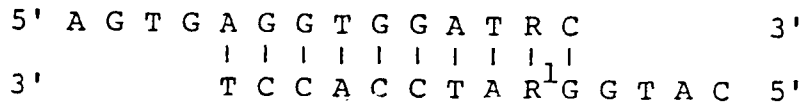
Bacillus subtilis MI112/p0W537:n ja Bacillus sub-
tilis MI112/p0W538:n rakentaminen

- Halutut rakentelut tehdään pääasiallisesti esi-
merkin 10 esityksen mukaisesti, paitsi että käytetään
35 plasmideja p0W537 ja p0W538 eikä plasmideja p0W529 ja
p0W530.

Patenttivaatimukset

1. Ribosomin sitomiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi, joka on

5



jossa

10

A on deoksiadenyyli,

G on deoksiguanyyli,

C on deoksisytosyyli,

T on tymidyyli,

R on G tai C ja

15

R¹ on G tai C,

sillä rajoituksella, että R ja R¹ eivät samanaikaisesti ole sama deoksiribonukleotidi.

2. Yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektori,

t u n n e t t u siitä, että se käsittää

20

1) patenttivaatimuksen 1 mukaisen ribosomin sitomiskohdan sisältävän DNA-sekvenssin,

2) Bacillus subtiliksen veg-promoottorin ja

3) geenin, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, sillä rajoituksella, että tämä vektori on valikoitavissa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi ohjaavat geenin transkriptiota ja ekspressoitumista isäntäsolussa, joka on transformoitu tällä vektorilla.

25

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen vektori,

t u n n e t t u siitä, että geenin koodaama funktio-

30

naalinen polypeptidi on ihmisen pre-proinsuliini, ihmisen proinsuliini, ihmisen insuliini A-ketju, ihmisen insuliini B-ketju, ei-ihmis-insuliini, ihmisen kasvuhormoni, ei-ihmisen kasvuhormoni, naudan kasvuhormoni, sian kasvuhormoni, ihmisen interferoni, ei-ihmisen interferoni, virusantigeeni, urokinaasi, joka peptidihormoni tai entsyymi.

35

4. Patenttivaatimusten 2 ja 3 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi p0W10, p0W303, p0W523, p0W524, p0W525, p0W526, p0W527, p0W528, p0W529 tai p0W530.

5 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi p0W523, p0W524, p0W525, p0W526, p0W527, p0W528, p0W529 tai p0W530.

10 6. Patenttivaatimusten 2 ja 3 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi p0W11, p0W531, p0W532, p0W534, p0W510, p0W535, p0W536, p0W537 tai p0W538.

15 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi p0W531, p0W532, p0W533, p0W534, p0W535, p0W536, p0W537 tai p0W538.

8. Jonkun patenttivaatimuksen 2-7 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on läsnä isäntäsolussa.

20 9. Patenttivaatimuksen 5 tai 7 mukainen isäntä, joka on läsnä Bacilluksessa, edullisesti lajissa subtilis.

25 10. Menetelmä yhdistelmä-DNA-ekspressoimisvektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se liitetään

1) patenttivaatimuksen 1 mukainen ribosomin sitoiskohdan sisältävä DNA-sekvenssi,

2) Bacillus subtiliksen veg-promoottori ja

30 3) geeni, joka koodaa funktionaalista polypeptidiä, sillä rajoituksella, että tämä vektori on valikoitavissa ja että promoottori ja DNA-sekvenssi ohjaavat geenin transkriptiota ja ekspressoitumista isäntäosluksa, joka on transformoitu tällä vektorilla.

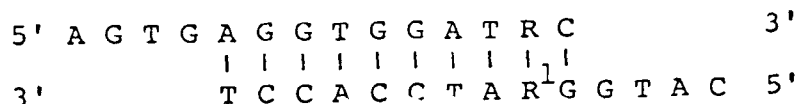
35 11. Menetelmä funktionaalisen polypeptidin tuottamiseksi Bacilluksessa, jolloin tämä polypeptidi erit-

tyy viljelyäliaineeseen, t u n n e t t u siitä, että transformoidaan Bacillus-isäntäsolu patenttivaatimuksen 5 tai 7 mukaisella yhdistelmä-ekspressoimisvektorrilla ja viljellään transformoitua Bacillus-isäntäsolua kasvuolosuhteissa.

Patentkrav

1. DNA-sekvens som innehåller ett ställe för
ribosombindning och är

5



där

10

A är deoxialdenyl,

G är deoxiguanyl,

C är deoxicytocytl,

T är tymidyl,

R är G eller C och

15

R¹ är G eller C,

med den begränsningen, att R och R¹ inte är samtidigt
samma deoxiribonukleotid.

2. Rekombinant-DNA-expressionsvektor, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den består av

20

1) DNA-sekvensen som innehåller bindningsställe
för ribosom, enligt patentkravet 1,

2) veg-promotorn av *Bacillus subtilis* och

3) en gen som koderar för en funktional polypeptid,
med den begränsningen, att denna vektor är utväljbar
och att promotorn och DNA-sekvensen styr transkriptionen
och expressionen av denna gen i en värdcell som
transformerats med denna vektor.

25

3. Vektor enligt patentkravet 2, k ä n n e -

t e c k n a d därav, att den funktionella polypeptiden

30

som koderas av genen är människo-pre-poinsulin,
människo-proinsulin, människo-insulin A-kedja, människo-
insulin B-kedja, icke-människo-insulin, människo-
växthormon, icke-människoväxthormon, oxväxthormon,
grisväxthormon, människointerferon, icke-människo-
interferon, virusantigen, urokinas, någon peptidhormon
och/eller enzym.

35

4. Vektor enligt patentkraven 2 och 3, som är plasmid p0W10, p0W303, p0W523, p0W524, p0W525, p0W526, p0W527, p0W528, p0W529 eller p0W530.

5 5. Vektor enligt patentkravet 4 som är plasmid p0W523, p0W524, p0W525, p0W526, p0W527, p0W528, p0W529 eller p0W530.

6. Vektor enligt patentkraven 2 och 3, som är plasmid p0W11, p0W531, p0W532, p0W533, p0W534, p0W510, p0W535, p0W536, p0W537 eller p0W538.

10 7. Vektor enligt patentkravet 6, som är plasmid p0W531, p0W532, p0W532, p0W533, p0W534, p0W535, p0W536, p0W537 eller p0W538.

8. Vektor enligt något av patentkraven 2-7, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är närvarande i en värdcell.

9. Vård enligt patentkravet 5 eller 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är närvarande i Bacillus, företrädesvis i species subtilis.

20 10. Förfarande för framställning av en rekombinant-DNA-expressionsvektor k ä n n e t e c k n a t av sammanfogning av

1) DNA-sekvensen enligt patentkravet 1 som innehåller bindningsstället för ribosom,

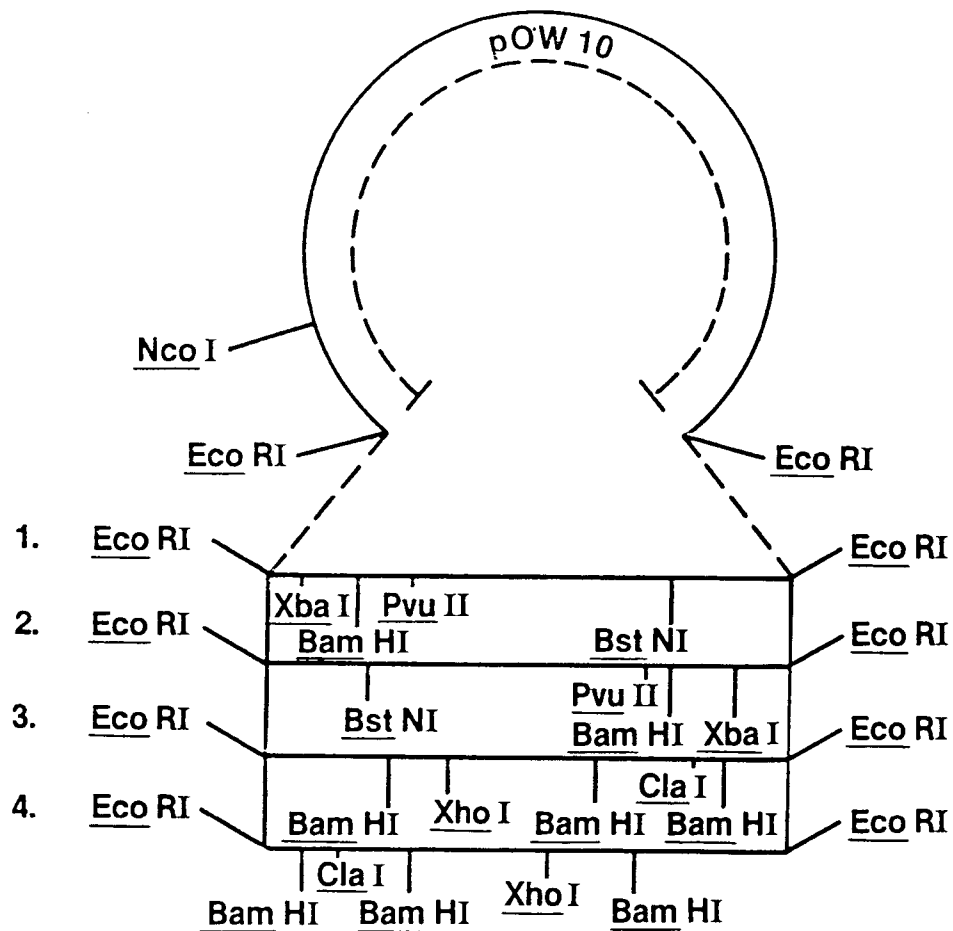
2) veg-promotorn av Bacillus subtilis och

25 3) en gen som koderar för en funktionell polypeptid, med den begränsningen att vektorn är utväljbar och att promotorn och DNA-sekvensen styr transkriptionen och expressionen av denna gen i en värdcell som transformerats med denna vektor.

30 11. Förfarande för framställning av en funktionell polypeptid i Bacillus, varvid polypeptiden avsöndras i odlingsmediet, k ä n n e t e c k n a t därav, att en Bacillus-värdcell transformeras med rekombinant-expression-vektorn enligt patentkravet 5 eller 7 och den trans-
35 formerade Bacillus-värdcellen odlas under växtbetingelser.

FIG. 1

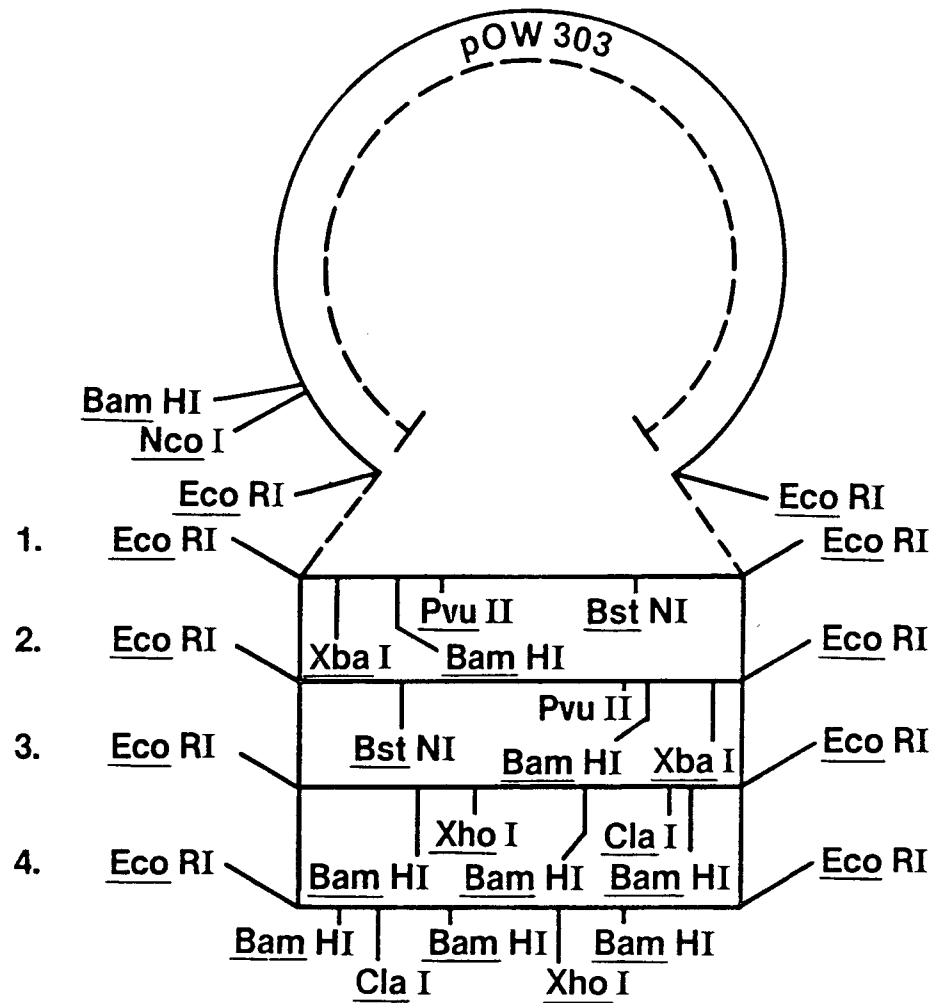
Plasmidien pOW 525, pOW 526, pOW 527 ja pOW 528
pilkontakohdien kartta



1. pOW 525 (~8.4 kb)
2. pOW 526 (~8.4 kb)
3. pOW 527 (~12.8 kb)
4. pOW 528 (~12.8 kb)

FIG. 2

Plasmidien pOW 523, pOW 524, pOW 529 ja pOW 530
pilkontakohtien kartta



1. pOW 523 ~ 14.2 kb
2. pOW 524 ~ 14.2 kb
3. pOW 529 ~ 18.6 kb
4. pOW 530 ~ 18.6 kb

FIG. 3

Synteesimenetelmä osaselle T₁

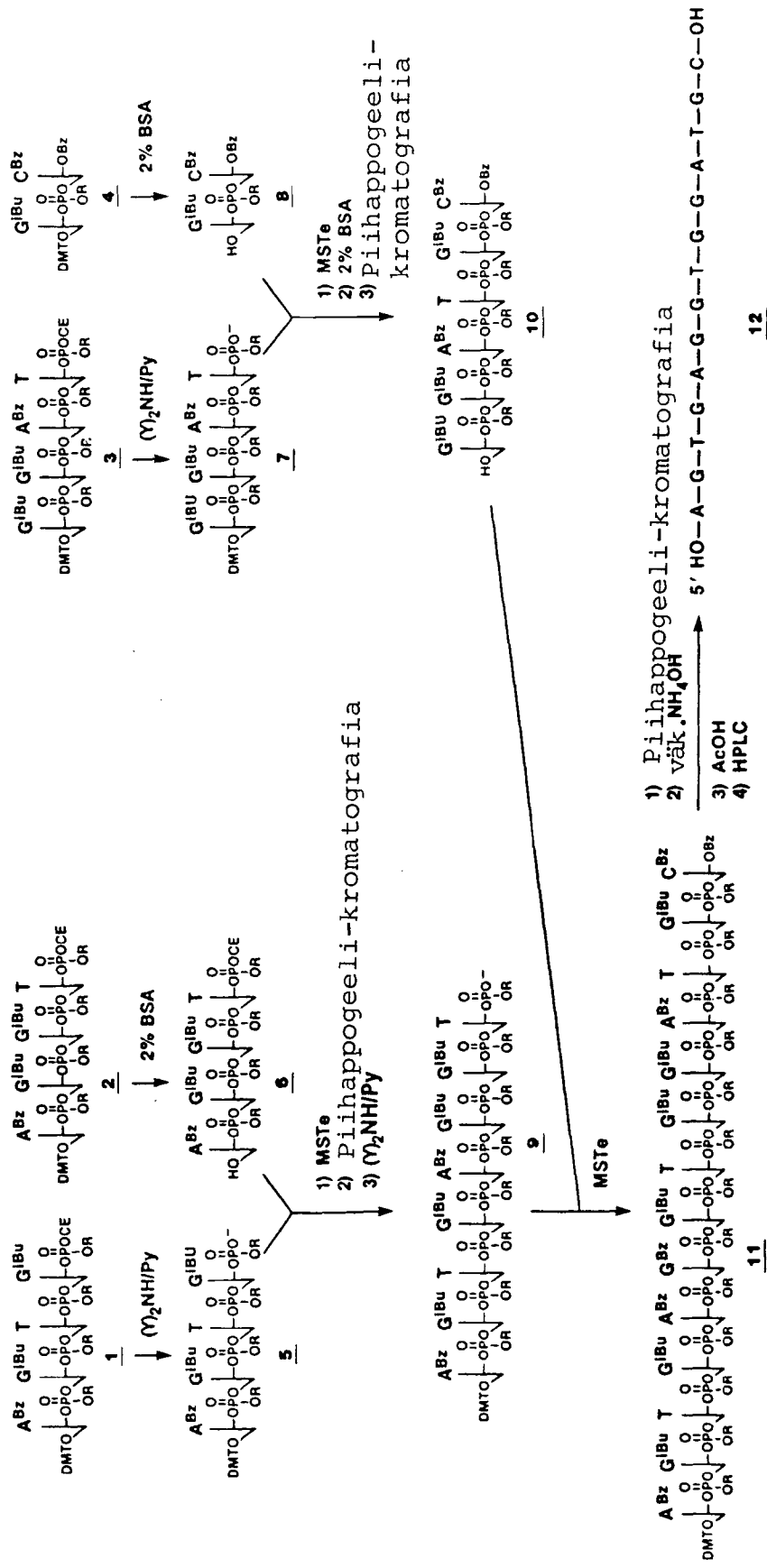


FIG. 4

Plasmidien pEL 107 ja pEL 105 pilkontakohtien kartta

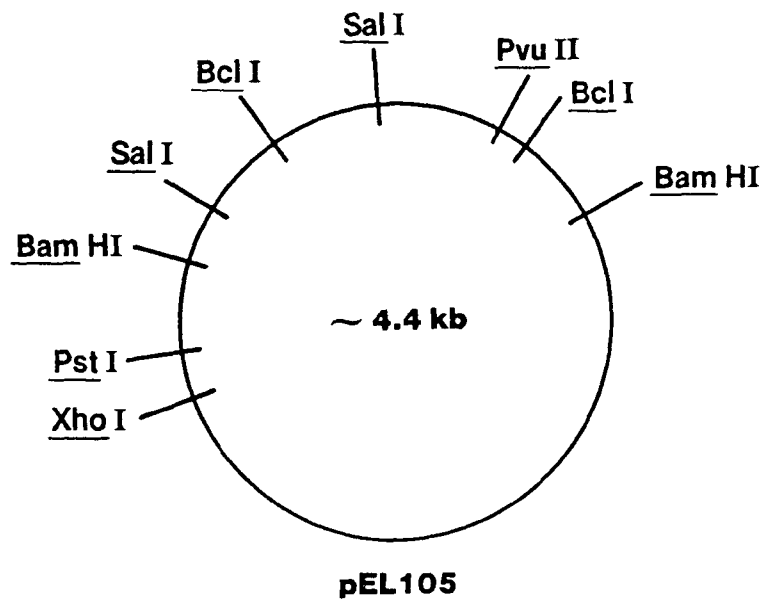
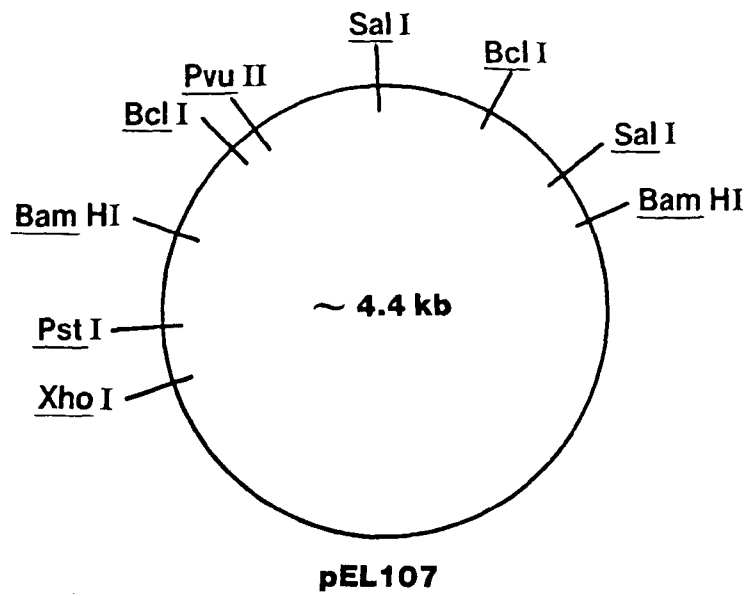
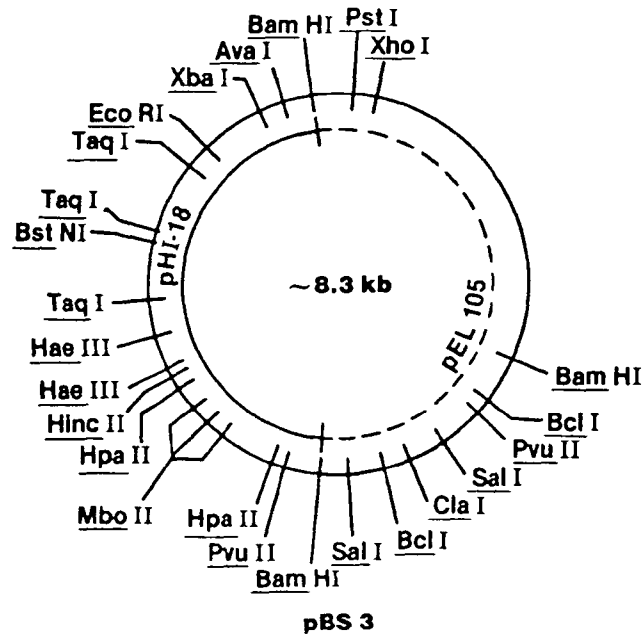
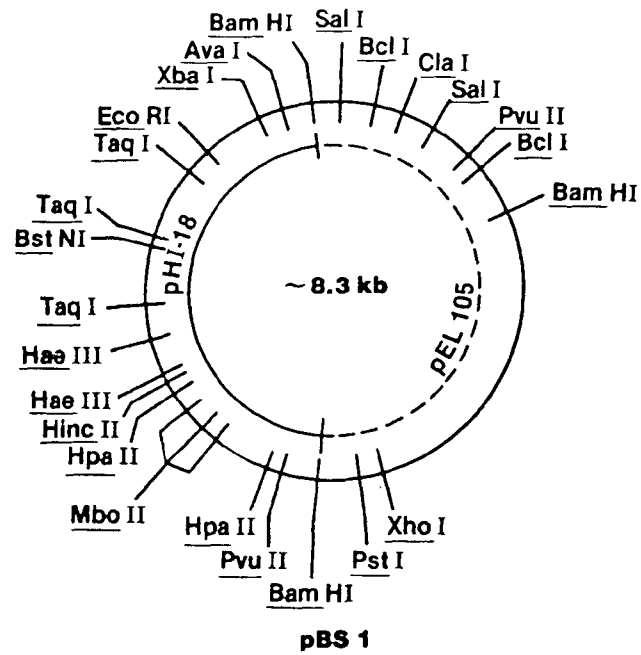


FIG. 5

Plasmidien pBS 1 ja pBS 3 pilkontakohtien kartta



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

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

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Nerkitse hakemusjulkaisujen lehti-, sisäl. Offenlegungsschrift/ numeron eteen K ja P. ja vastavasteti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP _____

WO _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

26/286 L Koino

Allekirjoitus