



(45)

(51) Kv.lk.⁴/Int.Cl.⁴ C 12 N 15/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21)	Patentihakemus - Patentansökning	821678
(22)	Hakemispäivä - Ansökningsdag	12.05.82
(23)	Alkupäivä - Giltighetsdag	12.02.81
(41)	Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	12.05.82
(44)	Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.02.88
(86)	Kv. hakemus - Int. ansökan	
(32)(33)(31)	Pyydetty etuoikeus - Begärd prioritet	15.02.80
	10.04.80 Iso-Britannia-Storbritannien(GB)	
	8005184, 8011842	

- (71) CPC International Inc, International Plaza, Englewood Cliffs, New Jersey, USA(US)
- (72) Charles Antoine Colson, Dion-Valmont, Pierre Emile Cornelis, Dion-Valmont, Colette Simone Digneffe, Rosieres, Raoul G.P. Walon, Bryssel, Corrine Walon, Havre, Belgia-Belgium(BE)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä geneettisesti manipuloitujen mikro-organismien valmistamiseksi, joka sisältää amylaasia koodaavan yhdistelmä-DNA:n, sekä menetelmä amylaasin valmistamiseksi - Förfarande för framställning av en genetiskt manipulerad mikroorganism innehållande en för amylas kodande rekombinant-DNA, och ett förfarande för framställning av amylas
- (62) Jakamalla erotettu hakemuksesta 810425 (patentti 70424) -
Avdelad från ansökan 810425 (patent 70424)

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on amylaasin valmistusmenetelmä, jossa amylaasia tuottavissa olosuhteissa viljellään geneettisesti manipuloitua mikro-organismia, joka sisältää yhdistelmä-DNA:n. Tämä yhdistelmä-DNA sisältää amylaasia koodaavan geenin, ja se on valmistettu in vitro menetelmällä pilkkomalla bakteerista peräisin oleva luovuttaja-DNA ja liittämällä muodostuneet DNA-fragmentit vektoriin, joka on samalla tavalla pilkottu. Käytetty vektori on plasmidi tai lambda-faagin johdannaisen DNA.

Keksinnön kohteena ovat myös tällä tavalla geneettisesti manipuloitujen mikro-organismien.

Luovuttajabakteeri kuuluu edullisesti Bacillus- tai Klebsiella-sukuun, ja isäntämikro-organismi on edullisesti E. coli tai B. subtilis. Menetelmällä valmistettu amylaasientsyymi on edullisesti alfa-amylaasi, beta-amylaasi tai pullulanaasi.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av amylas, varvid man under amylas producerande förhållanden odlar en genetiskt manipulerad mikroorganism, vilken innehåller en rekombinant-DNA. Denna rekombinant-DNA innehåller en för amylas kodande gen, och den har framställts medelst en in vitro process genom att spjälka donator-DNA från en bakterie och kombinera de bildade DNA-fragmenten med en vektor som har spjälkts på samma sätt. Den använda vektorn är en plasmid eller DNA av ett derivat av fag lambda.

Uppfinningen avser även de på detta sätt genetiskt manipulerade mikroorganismerna.

Donator-bakterien hör företrädesvis till Bacillus- eller Klebsiella-släktet, och värd-mikroorganismen är företrädesvis E. coli eller B. subtilis. Det genom förfarandet framställda amylasenzymet är företrädesvis alfa-amylas, beta-amylas eller pullulanas.

Menetelmä geneettisesti manipuloidun mikro-organismin valmistamiseksi, joka sisältää amylaasia koodaavan yhdistelmä-DNA:n, sekä menetelmä amylaasin valmistamiseksi

5 Jakamalla erotettu hakemuksesta 810425.

Keksintö koskee menetelmää geneettisesti manipuloidun mikro-organismin valmistamiseksi, joka sisältää amylaasia koodaavan geenin, sekä menetelmää amylaasin tuottamiseksi, jossa käytetään tätä geneettisesti manipuloitua mikro-organismia.

Vaikka käsitettä geenimanipulaatio usein käytetään kuvamaan suurta joukkoa menetelmiä jonkin organismin geneettisen informaation keinotekoisista muuttamista varten, sitä tässä selityksessä ja patenttivaatimuksissa käytetään ainoastaan tarkoittamaan yhdistelmä-DNA:n valmistusta jostakin luovuttaja-mikro-organismista ja sopivasta vektorista in vitro, valikointia halutun geneettisen informaation perusteella ja valitun DNA:n vientiä sopivaan mikro-organismiin (isäntä-mikro-organismiin), jolloin haluttu (vieras) geneettinen informaatio tulee isännän täyden geenistön osaksi. Käsite "kloonattu mikro-organismi", kuten sitä käytetään läpi tämän selityksen ja patenttivaatimusten, tarkoittaa tällä menetelmällä valmistettua mikro-organismia.

Käsitteet "amylaasi" ja "amylolyyttinen entsyymi" ovat synonyymejä ja niitä käytetään kautta koko tämän selityksen ja patenttivaatimusten tarkoittamaan yleisesti niitä entsyymejä, jotka pystyvät katalysoimaan tärkkelyksen hydrolyysin, kuten alfa-amylaasi, beta-amylaasi, isoamylaasi (alfa-1,6, glukosidaasit, kuten pullulanaasi, mukaan luettuina), gluko-amylaasi jne.

Viime vuosien aikana on tietenkin kirjoitettu runsaasti geenimanipulaatiosta (joista monista erinomaisista katsauksista kaksi on "DNA Cloning and the Analysis of Plasmid Structure and Function", tekijöinä K.N. Timmis, S.N. Cohen ja S.C. Cabello, Prog. Molec. subcell Biol. 6, (1978) 1-58 ja "Lambdoid Phages that Simplify the Recovery of in

vitro Recombinants", tekijöinä Noreen E. Murray, W.J. Bram-
mar ja K. Murray, Molec. gen. Genet. 150 (1977) 53-6), jot-
ka sisältävät monia kuvauksia uusista, geneettisesti modi-
fioiduista mikro-organismeista, joilla on arvokkaita ominai-
5 suuksia. Bunzi Maruo'n, Yuko Yoneda'n ja Gakuzo Tamura'n
JP-patenttijulkaisussa nro SHQ 52-76480 (julkaistu 27.6.1977,
jätetty 19.12.1975 SHO 50-150641:nä) esitetään runsaasti
amylaasia tuottavien mikro-organismikantojen valmistus
in vivo mutageneesi-, transduktio- ja transformointimene-
10 telmin useiden geneettisten ominaisuuksien kokoamiseksi amy-
laasi-tuotannon edistämiseksi Bacillus-mikro-organismissa.
Nämä menetelmät, jotka eivät käsitä geenimanipulointia, ku-
ten se tässä määritellään, rajoittuvat yhteen ainoaan tai
muutamaan lähisukuiseen (geneettisesti käsittäen) mikro-
15 organismiin. Nämä kannat eivät myöskään ole sopivia geeni-
amplifikaatioon (esim. faagilla tai plasmidilla), jota täs-
sä keksinnössä käytetään suurempaa entsyymituotantoa var-
ten. Artikkelissa "Cloning of a Foreign Gene Coding for
Alpha-amylase in Bacillus subtilis", Biochemical and Bio-
20 physical Research Communications 91, nro 4, sivut 1556-1564
(joulukuu 28, 1979), Yuko Yoneda, Scott Graham ja Frank E.
Young kuvaavat alfa-amylaasia koodaavan geenin kloonausta
Bacillus subtilikseen sitomalla Bacillus amyloliquefaciens-
H:n pilkottu DNA temperantin faagin phi 3T DNA:han ja trans-
25 formoimalla sen jälkeen Bacillus subtilis -soluja, joista
amylaasi puuttuu. Kirjoittajat eivät esitä mitään todistus-
ta geeniamplifikaatiosta, johon liittyy amylaasientsyymin
yhtenäinen tuotanto, mikä on tämän keksinnön päätarkoitus.

Keksinnön kohteena on menetelmä geneettisesti mani-
30 puloidun mikro-organismien valmistamiseksi, jolloin isäntä-
mikro-organismiin lisätään yhdistelmä -DNA, joka sisältää
amylaasia koodaavan geenin, ja on valmistettu in vitro-mene-
telmällä pilkkomalla luovuttajakäbakteerista peräisin oleva DNA
ja yhdistämällä syntyneet DNA-fragmentit vektoriin, joka
35 on samalla tavalla pilkottu. Keksinnön mukaiselle menetel-
mälle on tunnusomaista, että tämä vektori on plasmidi tai

lamda-faagin johdannaisen DNA ja geneettisesti manipuloitu mikro-organismi on bakteeri, joka sopivissa viljelyolosuhteissa pystyy tuottamaan amylaasia oleellisesti puhtaamassa muodossa tai oleellisesti suuremman määrän kuin alkuperäinen luovuttaja-mikro-organismi tuottaa. Eräässä edullisessa suorituserityksessä näin tuotetuilla amylaaseilla on yksi tai useampi ominaisuus, joka tekee ne erityisen käyttökelpoisiksi teollisissa entsyymaattisissa tärkkelyshydrolyyseyissä (esim. tärkkelyksen entsyymaattisessa nesteyttämisessä ja/tai sokeriksi muuttamisessa liimojen, viimeistelyaineiden, maltodekstriinien, koostumukseltaan erilaisten tärkkelyssiirappien, maltoosin, dekstroosin jne. tuottamiseksi), kuten kestävyys korkeissa lämpötiloissa, raskasmetallikestävyys jne.

Keksintö toteutetaan uuttamalla ensin DNA bakteerimikro-organismista (luovuttaja-mikro-organismista), joka pystyy tuottamaan ainakin yhtä amylolyyttistä entsyymiä, pilkkomalla (sopivalla restriktioentsyymillä) DNA sekä, vektorina, lamda-faagin tai sen johdannaisen DNA ja yhdistämällä ja liittämällä saadut fragmentit yhdistelmä-DNA:iden muodostamiseksi, joista jotkut sisältävät amylaasia koodaavan geenin. Yhdistelmä-DNA:t tehdään biologisesti aktiivisiksi siirtämällä ne sopiviin isäntäsoluihin (esim. E. coli:iin) in vitro-kapseloinnilla tai transfektiolla.

Syntyneet kloonit seulotaan sitten amylaasia koodaavan geenin suhteen ja yksi tai useampia positiivisia kloonveja valitaan ja monistetaan saaden siten aikaan uusia, geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja, jotka pystyvät, sopivissa viljelyolosuhteissa, tuottamaan oleellisesti suurempia määriä amylaasia kuin luovuttaja-mikro-organismilla voidaan tuottaa. Valinnaisesti uuden faagin DNA uuteetaan, pilkkotaan ja subkloonataan toiseksi vektoriksi, joka voi olla joko plasmidi tai toinen faagi, ja uudet kloonit seulotaan ja valikoidaan amylaasia koodaavan geenin läsnäolon perusteella. Voidaan suorittaa myös peräkkäisiä "sub-sub-kloonauksia".

Sen lisäksi, että keksinnön mukaisesti saadaan uusia, geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja, jotka ovat amylaasin "ylituottajia", on keksinnöllä se etu, että sen seurauksena siirtyy ensisijaisesti geeni yhden ainoan amylolyyttisen entsyymin tuotantoa varten, vähentäen siten suuresti puhdistamista, joka on tarpeen ei-geneettisesti manipuloitujen mikro-organismien viljelmissä.

Kun kloonattu mikro-organismi, joka sisältää halutun yhdistelmä-DNA:n, on tuotettu, mikro-organismia viljellään siten, että yhdistelmä-DNA:ta vahvistetaan siten antamaan amylaasia olennaisesti suuremmissa määrissä kuin luovuttajamikro-organismilla voidaan tuottaa.

Kun vektori on lambda-faagin johdannainen, jolloin isäntä-mikro-organismi on välttämättä E. coli, voidaan vahvistaminen ja entsyymin tuotanto toteuttaa seuraavasti. Jos faagi on lysogeeninen, viljellään mikro-organismia, ts. E. colia, ensin solujen monistamiseksi sopivaan tiheyteen, ne infektoidaan sitten sopivalla määrällä bakteriofaagia ja systeemiä viljellään, kunnes soluseinät ovat tuhoutuneet ja amylaasi leviää viljelyväliaineeseen.

Kun vektori-isäntä-systeemi on sopiva lambda-lysogeeninen E. coli, viljellään infektoitua isäntä-mikro-organismia ensin 32°C:ssa bakteerisolujen monistamiseksi sopivaan tiheyteen, minkä jälkeen lämpötila nostetaan 42°C:seen ja pidetään siinä tietty aika lysogeenisen syklin indusoiduksi ja tuodaan sitten 37°C:seen ja pidetään siinä vieraan läsnäolevan DNA:n amplifikaation aikaansaamiseksi, mitä seuraa suurten amylaasimäärien tuotanto. Soluseinät voivat mahdollisesti tuhoutua, riippuen olosuhteista, jossa tapauksessa amylaasi leviää viljelyväliaineeseen.

Kun vektori on monikopio-plasmidi, kuten pBR 322 tai pACYC 184, vieraan DNA:n amplifikaatio tapahtuu itsestään. Vaihtoehtoisesti geneettisesti manipuloitua mikro-organismia, joka sisältää plasmidi-DNA:n, viljellään ensin bakteerisolujen monistamiseksi haluttuun tiheyteen, minkä jälkeen lisätään kloramfenikolia, koska antibiootti estää

solujen lisämonistumisen ja amylaasin tuotannon, mutta sal-
lii plasmidi-DNA:n monistumisen (vahvistumisen) solujen si-
sällä. Lopuksi solut erotetaan viljelyväliaineesta ja pes-
tään kloramfenikolin poistamiseksi. Amylaasin tuotantoa
5 varten soluja viljellään sitten uudelleen, tietenkin ilman
kloramfenikolia, suurien amylaasimäärien tuottamiseksi.

Kaikissa geenimanipuloinneissa on tietenkin olennais-
ta, että pystytään "merkitsemään" ja siten valikoimaan ne
kloonit, jotka sisältävät halutun geneettisen informaation.
10 Sovellettaessa tätä keksintöä tähän päästään helposti käyttä-
mällä väliainetta, joka sisältää tärkkelystä, jos halutaan
alfa-amylaasi-, beta-amylaasi- tai glukoamylaasiaktiivisuut-
ta. Viljelyväliaine värjätään sitten jodilla; klooneja,
joilla on amylaasiaktiivisuus tärkkelystä sisältävällä vä-
15 liaineella, ympäröi valkea alue. Eräs spesifinen, edullinen
värjäysmenetelmä selostetaan tämän jälkeen. Jos halutaan
pullulanaasiaktiivisuutta, viljellään klooneja BBL-tryppi-
kaasi-väliaineessa, joka sisältää pullulaania. Myös tätä
menetelmää kuvataan yksityiskohtaisemmin jäljempänä.

20 Keksintöä kuvataan nyt tarkemmin yksityiskohtaises-
ti, kuten spesifisiä aineita ja menetelmiä, joita työssä
on käytetty. On todettava, että monet käytetyistä menetel-
mistä ovat vakiomenetelmiä ja tämän alan ammattimiesten
hyvin tuntemia; tästä huolimatta joitakin näistä kuvataan
25 yksityiskohtaisesti selvyuden vuoksi.

Luovuttaja-mikro-organismi

Luovuttaja-mikro-organismin tulisi olla bakteeri-
mikro-organismi, joka pystyy tuottamaan ainakin yhtä amy-
laasia (haluttu amylaasi tietenkin mukaan luettuna), ja
30 edullisesti se tuottaa amylaasia, jolla on ominaisuuksia,
jotka ovat haluttuja tärkkelyksen teollisessa hydrolyysis-
sä, esim. kestävyys korkeissa lämpötiloissa tai metallin
myrkyttämisestä vastaan. Todennäköisesti luovuttaja voi olla
myös eukaryoottinen amylaasia tuottava mikro-organismi (esim.
35 sieni tai hiiva). Kuten esimerkeistä käy ilmi, on menestyk-
sellisesti käytetty *Bacillus megaterium*-, *Bacillus coagulans*-,

Bacillus cereus- ja Klebsiella pneumoniae -kantoja kloonattujen mikro-organismien tuottamiseksi, jotka pystyvät tuottamaan suuria määriä alfa-amylaasia, kuumuutta kestäväää alfa-amylaasia, beta-amylaasia ja pullulanaasia vastaavasti.

5 Liitántä- ja restriktioentsyymit

Tässä työssä on yhdenmukaisesti käytetty liitántä-entsyyminä T4 DNA-ligaasia, mutta on helposti ymmärrettävä, että voidaan käyttää mitä tahansa DNA:ta liittäväää entsyymiä. Tässä työssä käytetyt spesifiset restriktioentsyymit on esitetty esimerkeissä. Sopivan restriktioentsyymin valinnan voi tietenkin alaan perehtynyt asiantuntija tehdä käyttäen hyvin tunnettuja menetelmiä. Tässä on menetelmänä restriktioentsyymien valitsemiseksi jatkokäsittelyä varten ollut pilkkoa luovuttaja-mikro-organismista uutettu DNA (luovuttaja-DNA) eri restriktioentsyymillä ja valita yksi (tai useampi kuin yksi), joka on sopivin lisäkokeita varten, entsyymien kyvyn perusteella pilkkoa DNA lukuisiksi fragmenteiksi kooltaan väliltä 2-15 kiloemästä.

15 Vektorit

20 On useita syitä miksi faagin lambda johdannaiset ovat erityisen tehokkaita luovuttajasta uutetun DNA:n kloonauksista varten. (1) Faagin lambda deletio-mutantit sallivat erikokoisten (riippuen tietenkin nimenomaisesta lambda-johdannaisesta) vieraiden DNA-fragmenttien insertion ja lisäksi 25 tekevät mahdolliseksi vierasta DNA:ta sisältävien kloonien yksinkertaisen tunnistamisen. (2) On kehitetty faagin lambda eri johdannaisia, jotka sallivat useiden restriktioentsyymien käytön, lisäten siten menestyksellisen kloonauksen toteutumismahdollisuuksia. (3) Vieraiden geenien erittäin hyvät vahvistukset ovat mahdollisia käytettäessä sopivia faagin lambda 30 johdannaisia. (4) Ligaation jälkeen rekombinantti-kloonien talteenotto tapahtuu helposti transfektiolla tai in vitro-täytöllä. Monipuolisuutensa, jota mikään muu olemassaoleva vektori ei voi antaa, ansiosta käytetään tätä keksintöä sovellettaessa faagin lambda johdannaisia ja E. colia isäntänä luovuttajasta uutetun DNA:n alkukloonauksista varten. 35

Muut edut faagin, mieluummin kuin plasmidin, käytöstä primaarikloonausta varten ovat seuraavat: (1) Rekombinanttien, joissa on vieraita DNA-insertiojaksoja, prosentti on suurempi; (2) Bakteerit hajoavat vapauttaen siten solusisältönsä ja siten kaiken amylaasin väliaineeseen helpottaen siten havaitsemista jodivärjäysmenetelmällä; (3) Faagin resistenssi jodia vastaan on suurempi kuin millään muulla elävällä bakteerilla.

Alaan perehtynyt pätevä geneetikko pystyy helposti valitsemaan sopivan plasmidin vektoriksi subkloonausta varten, jolloin yhtenä kriteeriona on tietenkin yhden ainoan tai rajoitetun määrän pilkontakohtia olemassaolo käytettävää restriktioentsyymiä varten.

Eniten tässä käytettyjä plasmideja ovat pBR 322 ja pACYC 184. Koskemattomassa tilassaan plasmidi pBR 322 antaa resistenssin sekä ampisilliinille että tetrasykliinille ja sisältää yhden ainoan pilkontakohdan jokaiselle Pst I-, EcoRI-, Hind III-, Bam HI- ja Sal I -entsyymeistä. Leikkaaminen ja insertio Pst I-kohdassa tuhoaa resistenssin ampisilliinille, kun taas insertio Bam HI- ja Sal I-kohtiin tuhoaa resistenssin tetrasykliinille. Insertio Hind III-kohtaan tuhoaa joskus resistenssin tetrasykliinille, edellyttäen, että kloonatussa geenissä ei ole omaa promoottoria.

Koskemattomassa tilassaan plasmidi pACYC 184 antaa resistenssin sekä tetrasykliinille että kloramfenikolille, ja sisältää yhden ainoan restriktiokohdan kullekin entsyymille Eco RI, Hind III, Bam HI ja Sal I. Leikkaaminen ja insertio Eco RI-kohdassa tuhoaa resistenssin kloramfenikolille, kun taas insertiolla kolmeen muuhun kohtaan Hind III:lle, Bam HI:lle ja Sal I:lle on samat vaikutukset kuin plasmidissa pBR 322, koska tämä alue on yhteinen kummallekin plasmidille.

Subkloonausta varten Bacillus subtilikseen käytettiin tässä plasmidia pC 194 vektorina. Tällä plasmidilla on yksi ainoa Hind III-kohta ja se antaa resistenssin kloramfenikolille.

75367

Isäntä-mikro-organismi

Koska faagin lambda johdannaisia voidaan ekspres-
soida ainoastaan E. colissa, täytyy tämän ilmeisesti olla
isäntä rekombinanttifaaagi-DNA:lle, joka on valmistettu
5 tämän keksinnön mukaisesti. Kun yhdistelmä-DNA toisaalta
on plasmidin muodossa, voidaan käyttää mitä tahansa mikro-
organismia, joka pystyy hyväksymään ja kopioimaan tällai-
sen plasmidi-DNA:n, esim. muita bakteeri-mikro-organismeja
tai hiivoja, kuten Saccharomyces cervisiaeta.

10 Käytännön syistä on tässä käytetty E. coli-kantoja
(esim. HB 101) suurimmaksi osaksi, koska ne ovat hyvin
tunnettuja kantoja geneettiseltä kannalta ja ovat herkkiä
infektiolle tunnetuilla faageilla ja plasmideilla, mistä
on seurauksena lisääntynyt entsyymien ylituotantokyky.

15 Kuten esimerkissä IIa on selostettu, voidaan rekombinanttiplasmidi subkloonata plasmidiksi, kuten pC 194:ksi, joka pystyy monistumaan B substiliksessa.

Menetelmä

20 Menetelmää kuvataan kaksivaiheisen kloonaukseen
avulla, jolloin ensimmäisessä vaiheessa (panos) käytetään
faagia ja toisessa vaiheessa plasmidia.

Kun luovuttaja-mikro-organismi, restriktio- ja ligaa-
tioentsyymit ja faagin lambda spesifinen johdannainen on
valittu, DNA:t uutetaan, pilkotaan, sekoitetaan ja yhtyneet
25 fragmentit liitetään, kaikki tavanomaisin menetelmin, jotka
eivät tässä selitystä kaipaa.

DNA tehdään sitten biologisesti aktiiviseksi E. co-
lissa transfektiolla tai in vitro kapseloinnilla. Tässä
työssä lambda-DNA:lla on päästy hyvään tulokseen kapseloin-
30 timenetelmällä (B. Hohn ja K. Murray, Proc. Natl. Acad.
Sci. USA, 74 (1977) 3259-3263). Ne kloonit, jotka ovat saa-
neet vieraan DNA:n, tunnistetaan sitten sopivin menetelmin.
Jos käytetään insertio-vektoria, kuten lambda NM590 tai
lambda NM607, antavat ne kloonit, jotka sisältävät vierasta
35 DNA:ta, kirkkaita plakkeja, kun taas ne, jotka eivät sisäl-
lä vierasta DNA:ta, antavat sameita plakkeja. Kun käytetään

korvausvektoria, kuten lambda NM761 tai lambda NM781, voidaan identifiointi tehdä viljelmällä E. coli lac amber-resipientilla laktoosi-indikaattori-väliaineella, esim. McConkey, EMB tai X gal.

5 Lukuisia (useita tuhansia) klooneista, jotka ovat ottaneet vastaan vieraan DNA:n, levitetään sitten väliaineelle, joka sisältää tärkkelystä, ja seulotaan amylaasia koodaavan geenin läsnäolon suhteen edellä mainitulla jodivärjäysmenetelmällä. Tällöin on tietenkin pidettävä huoli
10 siitä, että ei käytetä niin suuria jodiväkevyyksiä, että faagi tapetaan, ja tämä voi olla ongelma, jos jodi lisätään liuoksen muodossa. Tässä käytetty erittäin edullinen värjäysmenetelmä käsittää levyjen altistamisen jodihöyrylle lyhyeksi ajaksi; tätä menetelmää on tässä käytetty erittäin
15 hyvällä menestyksellä.

 Eräs edullinen menetelmä klooniin löytämiseksi, joilla on pullulanaasiaktiivisuus, jossa menetelmässä ei käytetä jodivärjäystä, selostetaan seuraavassa. Faageja viljellään petrimaljoilla, jotka sisältävät BBL-tryptikaasia ja
20 pullulaania väkevyydessä n. 0,25 %. Väliaineessa oleva pullulaani hydrolysoituu "positiivisten" plakkien ympärillä pullulanaasin vaikutuksesta maltotrioksi, jota bakteerit käyttävät. Siten ne bakteerit, jotka käyttävät maltotrioo-
25 sia, kasvavat paremmin kuin muut kasvualustalla, sillä seurauksella, että plakkeja, jotka tuottavat pullulanaasia, ympäröi läpikuultamaton rengas kasvavia bakteereja ja ne voidaan helposti havaita. Tätä menetelmää on selitetty yksityiskohtaisesti esimerkissä IV.

 Yksi (tai useampi) positiivinen klooni poimitaan siten ja monistetaan. Tämä voi tietenkin olla "lopullinen" geneettisesti manipuloitu mikro-organismi ja sitä voidaan käyttää tuottamaan suuria määriä amylaasia sopivalla viljelyllä, kuten edellä selostettiin. Vaihtoehtoisesti tätä kloonia voidaan käyttää DNA:n lähteenä toista kloonausta
35 varten plasmidiin tai muuhun, sopivampaan faagiin. Seuraavassa selostetaan menetelmää subkloonaamiseksi plasmidiin.

Jälleen kloonien DNA standardimenetelmiä käyttäen uutetaan ja pilkotaan restriktioentsyymillä, plasmidi pilkotaan samoin, fragmentit sekoitetaan ja uudelleenyhdistyneet osaset liitetään. Käytettäessä plasmidia pBR 322 kloonien, jotka ovat ottaneet vastaa amylaasia koodaavan geenin sisältävän DNA:n, tunnistaminen tapahtuu tekemällä DNA biologisesti aktiiviseksi isännässä, kuten E. colissa transformoimalla, viljelyväliaineessa, joka sisältää ampisilliiniä tai tetrasykliiniä, riippuen käytetystä restriktioentsyymistä. Viljelyväliaine sisältää myös tärkkelystä tai pullulaania ja kloonien, jotka sisältävät amylaasia koodaavan geenin, tunnistaminen tapahtuu jollakin edellä kuvatuista menetelmistä. Positiivisia klooneja viljellään sitten ja plasmidi-DNA:ta voidaan sitten vahvistaa kloramfenikolin avulla, kuten edellä selostettiin.

Piirroksat esittävät karttoja villintyyppisestä bakteriofagi lambda (kuviota la) ja kaikista käytetyistä vektoreista sekä seuraavien esimerkkien mukaisesti tuotetuista uusista rekombinantti-plasmideista. Erityisesti kuviossa 1 esitetään myös karttoja faageista lambda NM 590 (b) ja lambda 781 (c), [Murray, N.E., Brammar, W.J., Murray, K. Molec. gen. Genet. 150 (1977) 53-61]. Kuvio 2 käsittää karttoja plasmideista pBR 322 [Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W. Gene 2 (1977) 95-113] ja pACYC 184 [Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. J. Bact. 132 (1978) 1141-1156]. Kuvio 3 on kartta uudesta plasmidista pCP 1 ja kuvio 4 on uusi plasmidi pCP 2. Kuvio 5 valaisee esimerkkiä IIA, esittäen plasmideja pC 194, pCP 2,3 ja lopullista uutta plasmidia pCH 1.

Kuviot 6 ja 7 esittävät plasmideja pCP 3 ja pCP 4, vastaavasti. Kaikkien uusien rekombinanttiplasmidien karttoissa luovuttaja-DNA on osoitettu paksulla viivalla.

Esimerkit valaisevat keksintöä. Prosentit on laskettu painosta ellei toisin ole esitetty. Kaikki kokeet suoritettiin seuraten NIH (USA) ohjeita suojarakenteita varten.

Esimerkki I

Alfa-amylaasi-geenin kloonaus

Käytettiin seuraavia aineita:

restriktioendonukleaasi Hind III

5 T4 DNA-ligaasi

Faagi lambda NM 590. Faagi-DNA valmistettiin fenoli-
uutolla erittäin pitkälle puhdistetuista faagifragmenteista.

10 Plasmidi pBR 322. Plasmidi-DNA puhdistettiin lysot-
syykillä hajotetuista E. coli -soluista keesiumkloridi-
etidiumbromidi-tiheysgradien-teilla.

Isäntä-mikro-organismi, E. coli HB 101.

Luovuttaja-mikro-organismi oli Bacillus megaterium
-kanta, jolla on seuraavat mikrobiologiset tunnusmerkit:

15 (1) Morfologia: sauvoja (0,5 - 0,7 μ x 2,0 - 5,0 μ),
liikkuvia, grampositiivinen, itiöt ovat terminaalisia tai
subterminaalisia.

(2) Ravintoliemi: hyvä kasvu.

(3) Ravinto-agar-liemi: hyvä kasvu; pesäkkeet ovat
tiiviitä keskeltä ja hajanaisempia ympärillä.

20 (4) Maito: peptonisaatio ilman pH-arvon muutosta.

(5) Gelatiini: ei nesteytetty.

(6) Nitraattien pelkistys: negatiivinen.

(7) Katalaasireaktio: negatiivinen.

(8) Oksidaasireaktio: negatiivinen.

25 (9) Sytokromioksidaasireaktio: negatiivinen.

(10) Indolin tuotanto: negatiivinen.

(11) H₂S:n muodostus: negatiivinen.

30 (12) hiilihydraattien hyväksikäyttö: käyttää arabi-
noosia, ksyloosia, galaktoosia, glukoosia, levuloosia, mal-
toosia, raffinoosia, sakkaroosia, tärkkelystä ja niistä
tuotettua happoa. Ei käytä hyväksi ramnoosia, mannoosia,
melibioosia, inuliinia ja salisiinia.

35 (13) Polyolien hyväksikäyttö: käyttää hyväksi sorbi-
tolia ja mannitolia; ei käytä hyväksi adenitolia, dulsito-
lia ja inositolia.

(14) Dekarboksyylaasireaktio lysiinillä: negatiivinen.

(15) Ureolyysi: heikko.

(16) Kestävyys raskametalleja vastaan: kasvaa suoraan 500 ppm:lla Cr⁺⁺⁺.

(17) Natriumkloridiliemi: kasvua NaCl-pitoisuudessa 3,5 %.

5 (18) Optimilämpötila kasvua varten: 30-37°C
 Maksimilämpötila kasvulle: 40-50°C
 Minimilämpötila kasvulle: 5-20°C

(19) Hapen tarve: aerobinen.

Mikro-organismi tunnistettiin *Bacillus megaterium*iksi
 10 mikrobiologisten tunnusmerkkiensä perusteella viitaten käsikirjaan Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8. painos), R.E. Buchanan ja N.E. Gibbons, aputoimittajia; julkaissut Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md. Tämä mikro-organismi on talletettu kokoelmaan National
 15 Collection of Industrial Bacteria (NCIB), Torry Research Station, PO Box No. 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Skotlanti, 12.2.1980, ja sille on annettu NCIB nro 11568.

Seuraavassa selostus käytetystä menetelmästä.

20 A. In vitro -rekombinaatio lambda ja B megaterium-DNA:iden välillä

N. 7 /ug B. megaterium-DNA:ta pilkottiin 10 yksiköllä Hind III 37°C:ssa yksi tunti 25 /ul:ssa Tris-puskuria pH 7,5:ssä. N. 2 /ug lambda NM 590 pilkottiin samalla tavalla samalla entsyymillä. Reaktiot pysäytettiin kuumentamalla 75°C:ssa 10 minuuttia.

Suoritettiin kaksi testiä pilkonnan tehokkuuden määrittämiseksi:

1. Näiden kahden reaktioseoksen näytettä elektroforesoitettiin agarosigeelillä 20 tuntia 20 voltilla. Geelin värjäämisen jälkeen etidumbromidilla havaittiin nauhojen odotettu malli: lambda DNA:n kaksi nauhaa, jotka ovat peräisin ainoan Hind III -kohdan pilkonnasta lambda-DNA:lla, ja hyvin suuri luku miltei limittäisiä nauhoja bakteeri-DNA:sta, joka on pilkottu lukuisissa kohdissa.

35 2. Faagi-DNA:n transfektio määritys osoitti, että pilkonta oli ollut yli 99-%:isen tehokas, hävittäen siten miltei täysin faagi-DNA:n biologisen aktiivisuuden.

Pilkotut DNA:t sekoitettiin ja niitä inkuboitiin viisi tuntia 10°C:ssa 0,15 yksikön kanssa T4 DNA-ligaasia DNA-fragmenttien mielivaltaisen uudelleen temperoitumisen ja kovalenttisen sitoutumisen sallimiseksi.

5 Tämän inkuboinnin päätyttyä DNA sekoitettiin in vitro kapseloidun preparaatin kanssa, joka käsitti kahden komple-
mentaarisesti vajaan faagilysaatin (lambda Dam ja lambda Eam),
jotka oli indusoitu ei-supressiivisista kannoista, seoksen.
Tässä seoksessa jokainen DNA-molekyyli, jolla on lambda
10 DNA:n cos-äärimmäiset hännät ja joka on sopivaa kokoa, voi
yhdistyä faagiproteiiniin muodostaen siten in vitro biolo-
gisesti aktiivisen faagipartikkelin, joka pystyy infektoi-
maan E. colin ja tuottamaan infektiokeskuksen (plakin).

15 Tämän prosessin tehokkuuden määrittämiseksi suori-
tettiin kaksi tarkistusta:

1. Näyte seoksesta levitettiin E. colille, löydet-
tiin 3×10^5 plakkia μg :aa kohti käytetystä lambda DNA:sta.
Tämä oli n. 100 kertaa enemmän kuin pilkotusta preparaatis-
ta löytyi, mikä osoittaa ligaasikäsitteilyn hyvän tehokkuuden.

20 2. Näin muodostuneita plakkeja tutkittiin visuaali-
sesti. 70 % niistä oli kirkkaita samean asemesta, mikä osoit-
taa B. megaterium-DNA:n fragmentin läsnäolon, joka liittyy
lambdageeniin Cl, ja siten inaktivoi sen aiheuttaen plakin
sameuden.

25 Siten voitiin todeta, että preparaatti sisälsi umpi-
mähkäisen näytteen kaikista B. megateriumille mahdollisista
Hind III-DNA-fragmenteista, jotka pystytään insertoimaan
faagiin lambda NM 590.

30 B. Faagin lambda johdannaisen, jossa on B. megaterium
amylaasi, eristäminen

Loput kapseloimisseoksesta käytettiin E. colin ymp-
päämiseen suureen määrään tärkkelystä sisältäviä levyjä,
joissa oli n. 10^3 elinvoimaista partikkelia levyä kohti.
Infektoidun E. colin kasvun ja plakkien muodostumisen jäl-
35 keen levyt seulottiin tärkkelystä hajottavien plakkien
läsnäolon suhteen. Tämä tehtiin altistamalla levyt jodi-

höyryille lyhyeksi ajaksi; odotettiin, että tällaisen faagin muodostama plakki olisi kirkkaan alueen ympäröimä tuloksena hajonneista soluista vapautuneen amylaasin diffuusiosta ja toiminnasta. Yksi tällainen plakki löydettiin ja faagi, jonka se sisälsi, poimittiin välittömästi alaviljelyä varten (pitempi altistus jodihöyryille olisi tappanut faagin). Tämä plakki lisääntyi todella runsaasti (amylaasia tuottaen) ja se on tässä nimetty "lambda NM 509 Amy 1":ksi. Faagi lambda NM 590 Amy 1 on tallennettu kokoelmaan 12.12.1980 NCIB nro 11569:nä.

C. Amylaasigeenin uudelleenklonaus plasmidiin pBR 322

Tämä suoritettiin ylituottavan kannan saamiseksi, tarkoitus oli myös valmistaa suuri määrä amylaasigeeniä sisältävää DNA:ta.

1 μ g DNA:ta lambda NM 590 Amy 1:stä ja 0,3 μ g plasmidin pBR 322 DNA:ta pilkottiin, sekoitettiin ja käsiteltiin ligaasilla, kuten osassa A selostettiin. Tätä preparaattia käytettiin transformoimaan (käyttäen tavallisia menetelmiä) kanta HB 101. Valikointi oli ampisilliini (ap)-resistenssiä varten (ominaisuus, jonka solut saavat tämän plasmidin läsnäolosta). Tämä plasmidi antaa normaalisti myös resistenssin tetrasykliinille (Tc). Vieraan DNA:n tuominen tähän plasmidiin pilkkoo kuitenkin tet-geenin, siten tetrasykliiniherkkien transformoitujen kloonien osuus heijastuu kloonattua DNA:ta sisältävien plasmidien osuuteen. Tässä tapauksessa 16 % klooneista sisälsi uutta plasmidia, joka antoi amylaasiaktiivisuuden E. colille. [Plasmidien yleisen kansainvälisen nimityksen mukaisesti tässä kuvattavat plasmidit on nimetty (pCP):ksi ja tämän esimerkin nimenomainen plasmidi nimetään (pCP 1):ksi.]

Tämä osoittaa, että geenin uudelleenklonaus samalla entsyymillä (tässä tapauksessa Hind III) on hyvin tehokas menetelmä (16 % 10^5 :n asemesta).

Tämän plasmidin sisältävä mikro-organismi nimetään E. coli Cl 7001 (pCP 1):ksi ja se on talletettu kokoelmaan NCIB 12.2.1980 NCIB nro 11570:nä.

D. Amplifikaatio ja entsyymituotanto

Entsyymituotantoa plasmidia (pCP 1) sisältävissä soluissa parannettiin kahdella tavalla seuraavasti:

1. Kyllästetyt viljelmät

5 Viljelmä inkuboitiin yli yön 37°C:ssa pyörivällä täryttimellä 5 l:n väliseinillä varustetuissa erlenmeyer-pulloissa, jotka sisälsivät 1 litran viljelyväliainetta (LB; hiivauute-tryptoni).

2. Amplifikaatio kloramfenikolilla

10 Viljelmä inkuboitiin 37°C:ssa pyörivällä täryttimellä 5 l:n väliseinillä varustetuissa erlenmeyer-pulloissa, jotka sisälsivät 1 litran viljelyväliainetta (LB), kunnes saavutettiin tiheys 0,8 (650 nm), jossa vaiheessa lisättiin 150 µg/ml kloramfenikolia. Tämä esti kromo-

15 somaalisen DNA:n lisämonistumisen, mutta ei amylaasigeeniä sisältävän plasmidin (pCP 1) monistumista. Plasmidin amplifikaation jälkeen (3 000 kopiaan asti) verrattuna kromosomaaliseen DNA:aan, kloramfenikoli poistettiin proteiinisynteesin uudelleenalkamisen sallimiseksi. Eri-

20 tyisesti vahvistuksen jälkeen solut erotettiin väliaineesta linkoamalla, pestiin kloramfenikolin poistamiseksi ja viljeltiin uudelleen amylaasituotantoa varten.

E. Entsyymien talteenotto

25 Tässä käytettiin "osmoottista shokki"-menetelmää alfa-amylaasin talteenottamiseksi erittäin puhtaassa muodossa. Menetelmä, jonka ovat esittäneet H.C. Neu ja L.A. Heppel julkaisussa J. Biol. Chem. 240 (1965) 3685-3692 oli seuraava:

30 Soluja viljeltiin ensin yli yön, minkä jälkeen ne suspendoitiin 25-%:iseen sakkaroosiliuokseen, jonka tilavuus oli puolet viljelmästä, ja ravisteltiin 10 minuuttia 24°C:ssa, mikä käsittely plasmolysoi solut. Sitten lisättiin EDTA lopullisesti 1 mM:ksi (soluseinien tekemiseksi läpäiseviksi), ja ainetta ravisteltiin toiset 10 minuut-

35 tia 24°C:ssa. Suspensio lingottiin ja solut suspendoi-

tiin nopeasti uudelleen kylmään (n. 0°C) veteen ja ravisteltiin tässä lämpötilassa 10 minuuttia. Suspensio linnogottiin uudelleen ja 96 % entsyymistä voitiin ottaa talteen päällä olevasta nesteestä (supernatantista).

5 Vertailua varten viljeltiin luovuttaja-mikro-organismia (*Bacillus megaterium*) ja määritettiin entsyymaktiivisuus. Entsyymimäärä millilitraa kohti viljelyväliainetta mitattiin DNS-menetelmällä, jolloin yksi entsyymaktiivinen yksikkö määriteltiin määräksi entsyymiä, joka tuottaa yhden mg:n pelkistävää sokeria (käyttäen maltoosia vertailuna) minuuttissa 10 minuutin inkubointiaikana. Substraatti oli hyvin puhdas amyloosi.

10 Luovuttaja-mikro-organismi tuotti 66,0 entsyymaktiivista yksikköä/l viljelmästä. *E. coli* CL 7001 (pCP 1) kylästetyt viljelyt tuottivat 116,6 yksikköä/l viljelmää, kun taas viljelyn jälkeen (vahvistus) viiden tunnin aikana kloramfenikolin kanssa, mitä seurasi 15 tuntia ilman kloramfenikolia, *E. coli* CL 7001 (pCP 1) tuotti 15 84,5 yksikköä/litra. Tämä osoittaa, että kylästetty viljelymenetelmä on riittävä antamaan hyvän lisäyksen entsyymituotantoon.

20 *E. coli* CL 7001 (pCP 1):n tuottamalla entsyymillä, joka on identifioitu eräksi alfa-amylaasiksi, on seuraavat tunnusmerkit. Se pilkkoo sekä amyloosin että amylopektiinin glukoosiksi, maltoosiksi ja maltotriooseksi, pääasiassa maltoosiksi, ja se pilkkoo sekä syklodekstriinin että maltotrioosein glukoosiksi ja maltoosiksi. Se pilkkoo pullulaanin panoosiksi ja/tai iso-panoosiksi, mikä on samanlainen ominaisuus kuin entsyymillä, jota äskettäin 25 ovat kuvanneet Mizuho Shimizu, Mutsuo Kanno, Masaki Tamura ja Mikio Suekane "Purification and Some properties of a Novel Alpha-Amylase Produced by a Strain of *Thermoactinomyces vulgaris*", *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 9, 1681-30 1688.

75367

Esimerkki II

Lämpöä kestävä alfa-amylaasigeenin kloonauk-

Luovuttaja-mikro-organismi oli alkuperäinen Bacillus-

kanta, joka oli eristetty kompostista ja identifioitu

5 Bacillus coagulansiksi. Se tuottaa lämpöä kestävä alfa-
amylaasia ja sillä on seuraavat mikrobiologiset tunnusmer-
kit:

(1) Morfologia: sauvoja (0,6 - 1 μ x 2,5 - 5,0 μ),
liikkuvia gram-positiivisia ja -negatiivisia. Itiöt ovat
10 keskeisiä tai terminaalaisia, eivät muuta muotoaan.

(2) Ravintoliemi: hyvä kasvu.

(3) Ravinto-agar-viilös: hyvä kasvu, lankamainen,
leviävä, kermanvalkoinen.

(4) Orgaanisen hapon hyväksikäyttö

15 - sitraatti: positiivinen

- malonaatti: negatiivinen.

(5) Gelatiini: nesteytyy

(6) Asetyylimetyylikarbinolin (acetain) tuotanto:
positiivinen.

20 (7) Ortonitrofenyyli-galaktosidi-hydrolyysi: posi-
tiivinen.

(8) Nitraattien pelkistys: positiivinen, saattaa
syntyä kaasua.

(9) Katalaasireaktio: positiivinen.

25 (10) Indolin tuotanto: negatiivinen.

(11) Dekarboksyylaasireaktio

- lysiinillä : negatiivinen

- ornitiinillä : negatiivinen

- arginiinilla : negatiivinen.

30 (12) H₂S:n muodostus: negatiivinen.

(13) Hiilihydraattien hyväksikäyttö: käyttää hyväksi
arabinoosia, galaktoosia, glukoosia, levuloosia, mannoosia,
maltoosia, sakkaroosia, tärkkelystä, trehaloosia ja tuottaa
niistä happoa.

35 (14) Pullulaania käytetään hyväksi minimiväliaineel-
la.

(15) Polyolien hyväksikäyttö: käyttää hyväksi glyserolia, sorbitolia, mannitolia, inositolia. Ei käytä adonitolia, dulsitolia.

(16) Ureolyysi: negatiivinen.

5 (17) Lesitiinin hyväksikäyttö: negatiivinen.

(18) Optimilämpötila kasvulle: 50°C

Maksimilämpötila kasvulle: 55-60°C

Minimilämpötila kasvulle: 15-25°C

(19) Hapen tarve: aerobinen ja anaerobinen.

10 Kanta on talletettu kokoelmaan NCIB 21.2.1980 NCIB nro 11571:nä.

DNA uutettiin ja altistettiin Eco RI:n; Hind III:n; Pst I:n; Sal I:n; Bam HI:n ja Bgl II:n vaikutukselle. Ai-noastaan Bgl II pystyi kehittämään useita fragmentteja Iaajalta
15 molekyylipainoalueelta. Eco RI:lla oli kuitenkin mahdollis-ta kehittää fragmentteja, kun NaCl-väkevyys alennettiin 50 mM:ksi. Sen tähden päätettiin käyttää Eco RI:a fragment-tien muodostamiseksi kloonausta varten Eco RI-lambda-vektoriin (lambda NM 781).

20 A. B. coagulansin ja lambda NM 781:n DNA:iden pil-konta

1,25 µg lambda NM 781:n DNA:ta leikattiin yhdellä yksiköllä Eco RI:a 25 µ:ssä seuraavaa puskuria: 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 10 mM 2-merkaptoetanolii, 10 mM MgSO₄ ja
25 100 mM NaCl.

2 µg B. coagulansin DNA:ta leikattiin samalla entsyy-millä samanlaisessa puskurissa, paitsi että NaCl-väkevyys oli alennettu 50 mM:ksi. Inkubointiaika oli kaksi tuntia 37°C:ssa ja reaktio pysäytettiin kuumentamalla 10 minuut-tia 75°C:ssa. Pilkonnan täydellisyys tarkistettiin elektro-foreesilla 1-%:isissa agarosigeeleissä.

B. Rekombinanttifagien ligaatio ja talteenotto

Pilkotut DNA:t sekoitettiin ja liitettiin käyttäen kahta yksikköä T4 DNA -ligansia seoksessa, joka sisälsi
35 60 mM Tris HCl (pH 8), 10 mM MgSO₄, 10 mM 2-merkaptoetanolii ja 0,1 mM ATP. Reaktio saatettiin tapahtumaan 10-15 tunnin aikana 10°C:ssa. Ligaation jälkeen sekoitettiin 0,2 µg:n

DNA-eriä ATP:n kanssa antamaan loppuväkevyyys 10^{-2} M. Nämä näytteet saatettiin in vitro-kapselointiin ja käytettiin infektoimaan E. colin kanta HB 101. Saatiin n. $1,6 \times 10^4$ PFU (Plaque Forming Units, plakkeja muodostavia yksiköitä)/ μ g lambda DNA:ta. Näiden faagien joukosta jotkut osoittivat amylaasiaktiivisuutta (amylaasiaktiivisuuden havaitsemiseksi petrimaljoilla ja faagin talteenottoa ja puhdistusta varten ks. esimerkki I).

Havaittiin melko suuri amylaasia tuottavien faagien osuus (yksi 400:ssa).

Valittiin yksi ja nimettiin se "lambda NM 781 alfa Amy 1":ksi. Se on talletettu kokoelmaan NCIB 12.2.1980 NCIB nro 11572:na.

C. Amylaasi geenin uudelleenklonaus lambda NM 781 alfa Amy 1:sta plasmidiin pBR 322

1 μ g lambda NM 781 alfa Amy 1 DNA:ta ja sama määrä DNA:ta plasmidista pBR 322 leikattiin Eco RI:lla käyttäen tavanomaisia olosuhteita. Ligaatio ja transformointi suoritettiin, kuten esimerkissä I selostettiin. E. coli HB 101:n pesäkkeet, jotka sisälsivät rekombinanttiplasmidin, havaittiin niiden amylaasiaktiivisuudesta. Valittiin yksi tällainen pesäke ja nimettiin se E. coli CL 7002 (pCP 2):ksi. Se on talletettu kokoelmaan NCIB 12.2.1980 nro 11573:na.

D. Geenituotteen amplifikaatio

Lambda NM 781 alfa Amy 1:n amylaasia koodaavan geenin ja amylaasin tuotannon vahvistaminen suoritettiin seuraavasti. Isäntäbakteereita (E. coli HB 101) kasvatettiin LB-väliaineessa 2 mM $MgCl_2$:n kanssa $37^{\circ}C$:ssa, kunnes saavutettiin optinen tiheys 0,3 (650 nm:ssä). Lambda NM 781 alfa Amy 1 lisättiin sitten, faagien lukumäärä laskettiin infektion moninkertaisuuden n. 1-2 saamiseksi, ts. yksi tai kaksi faagia bakteerisolua kohti. Viljelyä jatkettiin sitten voimakkaasti sekoittaen $37^{\circ}C$:ssa ja optista tiheyttä seurattiin, kunnes se alkoi alentua. Kun se oli alentunut alle 0,5, viljelmä korjattiin talteen ja pantiin jäihin. Viljelmä lingottiin ja sakan päällä oleva neste testattiin amylaasiaktiivisuuden suhteen.

Vahvistaminen ja entsyymituotanto *E. coli* Cl 7002 (pCP 2):lla suoritettiin käyttäen sekä kyllästettyä viljelymenetelmää että kloramfenikolivahvistusta, kuten esimerkissä I.

5 Amylaasiaktiivisuus määritettiin käyttäen DNS-menetelmää sekä faagilysaatista että *E. coli*n, joka sisälsi rekombinanttiplasmidin, viljelmistä. Taulukossa I esitetään arvot, jotka on saatu amylaasiaktiivisuudelle *B. coagulans*in alkuperäiskannassa, jakautuminen solun ulkopuolisen ja soluun sidotun aktiivisuuden välillä. Aktiivisuudet, jotka on
10 saatu rekombinanttifagilla (lambda NM 781 alfa Amy 1) ja kannalla, joka sisältää rekombinanttiplasmidin *E. coli* CL 7002 (pCP 2), on myös annettu. Entsyymituotannossa havaittiin n. kolminkertainen lisäys rekombinanttifagilla ja vielä paljon parempi lisäys havaittiin plasmidilla (n. 300-
15 kertainen).

Faagin (lambda NM 781 alfa Amy 1) tapauksessa kaikki entsyymi vapautuu solun hajotuksessa ja on niin muodoin läsnä viljelyväliaineessa. Plasmidin tapauksessa suurin
20 osa entsyymistä on soluun sidottua (96 %).

E. Uudelleenklonaus faagin lambda johdannaiseen, joka pystyy lysogenisoimaan *E. coli*n

Vektori/isäntäsystemin, joka käsittää lambda lysogeenisin *E. coli*n, valmistuksen valaisemiseksi tehtiin seuraava koe.
25

Käytettiin bakteriofagia lambda T4 liq. CI 857 Wam Eam Sam (lambda NM 989). Se on kuvattu julkaisussa *J. Mol. Biol.* Vol. 132 (1979), "Molecular Cloning of the DNA Ligase Gene from Bacteriophage T4. I.. Characterization of the
30 Recombinants" G.G. Wilson ja Noreen E. Murray (sivut 471-491) ja "II.. Amplification and Separation of the Gene Product" Noreen E. Murray, S.A. Bruce ja K. Murray (sivut 493-505).

Tämä faagi sisältää bakteriofaagin T4 DNA-ligaasi-
35 geenin ja pystyy lysogenisoimaan *E. coli*n. Sillä on lisäksi lämpöherkkä immunitteettigeeni ja kaksi amber-mutaatiota E-geenissä ja S-geenissä vastaavasti. S-geenin mutaatio

tekee bakteerit sellaisiksi, että ne eivät enää hajoa tämän faagin infektiolla. Subkloonauksen tarkoituksena oli korvata DNA-ligaasigeeni amylaasiaa koodaavalla geenillä.

5 Faagin ja plasmidin (pCP 2) DNA leikattiin Eco RI:lla ja fragmentit liitettiin. Ligaatiossa saatu faagi-DNA pakattiin sitten in vitro ja plakit tehtiin näkyviksi levittämällä kannalle E. coli Sup E Sup F. Plakit, joilla oli amylaasiaktiivisuus, poimittiin ja faagit puhdistettiin käyttäen edellä kuvattuja menetelmiä.

10 Tätä faagia käytettiin sitten lysogenoimaan kanta E. coli C 600 (CL 1205) käyttäen tavanomaisia menetelmiä. Lysogeenipesäkkeet tehtiin näkyviksi tärkkelystä sisältävällä väliaineella käyttäen jodivärjäystä. Tämä kanta on nimetty tässä E. coli CL 7003 (lambda alfa Amy 1):ksi ja
15 se on talletettu kokoelmaan NCIB 6.3.1980 NCIB nro 11586:na.

Geenituotteen amplifikaatio suoritettiin seuraavalla tavalla. Lysogeenia viljeltiin 32°C:ssa LB-väliaineessa, kunnes saavutettiin tiheys 0,8 650 nm:ssä, lingottiin sitten ja solut suspendoitiin tuoreeseen LB-väliaineeseen, jota oli esilämmitetty 45°C:ssa. Viljelyä inkuboitiin sitten 45°C:n kylvyssä 15 minuuttia hajotussyklin indusoimiseksi (koska immunitteettigeenituote on lämpöherkkä).

25 Inkubointia jatkettiin sitten voimakkaasti ravistaen 37°C:ssa kolme tuntia. Amylaasiaktiivisuus mitattiin sitten päällä olevassa nesteessä ja soluissa. Arvot on esitetty taulukossa I.

Tämä erikoiskoe valaisee "sub-sub-kloonauksen" menetelmää plasmidista uuteen lambda-faagiin. On helposti ymmärrettävissä, että DNA lambda NM 781 alfa Amy 1:stä olisi aivan yhtä helposti voitu sub-kloonata faagiin lambda T4 lig. CI 857 Wam Eam Sam. Vaihtoehtoisesti luovuttaja-DNA olisi voitu kloonata suoraan viimeksi mainittuun faagiin, jolloin mikä tahansa määrä muunnoksia esimerkkiprosessista on
35 toteuttavissa.

F. Lambda NM 781 alfa Amy 1:n E. coli CL 7002
(pCP 2):n ja E. coli CL 7003 (lambda alfa Amy 1):n tuotta-
man amylaasin talteenotto ja luonnehtiminen

Kuten esimerkissä I käytettiin osmoottista shokkia
 5 entsyymien talteenottoon. Lisäksi, koska tämän esimerkin
 entsyymi on lämpöä kestävä, voitiin sitä puhdistaa edel-
 leen lisäämällä vesipitoiseen liuokseen 10 mM Ca^{++} ja läm-
 mittämällä liuos 80°C :seen ja pitämällä se siinä 10 minuuttia;
 tämä käsittely saostaa kaikki E. coli -proteiinit ja sal-
 10 lli alfa-amylaasin talteenoton äärimmäisen puhtaassa muo-
 dossa, jolloin yleensä mitään orgaanista jätettä tai muita
 entsyymejä ei ole läsnä.

Alfa-amylaasin spesifisyys määritettiin: se on ak-
 tiivinen amyloosin ja tärkkelyksen suhteen, hydrolyysi-
 15 tuotteet ovat glukoosi, maltoosi ja maltotriooosi sekä pie-
 niä määriä suurempimolekyylipainoisia komponentteja. Tämä
 entsyymi ei ole aktiivinen syklodekstriinille. Myös entsyy-
 min lämmönkestävyys tutkittiin ja sen osoitettiin olevan
 hyvin suuri. Optimilämpötila aktiivisuudelle 0,5-%:isella
 20 amyloosilla on välillä $80-90^{\circ}\text{C}$. 8 %:lla liukoista tärkke-
 lystä optimi on n. 100°C :n paikkeilla.

On mahdollista, että mikro-organismi, jota tässä
 nimitetään Bacillus coagulansiksi, on todellisuudessa
 Bacillus licheniformis.

Taulukko I

Amylaasiaktiivisuus, yksiköissä^x/litra, B. coagulansin alkuperäisessä kannassa ja esimerkin II rekombinanttikloneissa

	Päällä ole- va neste	Solulima	Solut	Yhteensä	Entsyymituotan- non lisäys
B. coagulans	42	-	-	42	1
lambda NM 781 alfa Amy I	144	-	-	144	3,43 ^x
E. coli CL 7002 (pCP 2) CM-amplifikaatiolla	230	-	5 700 ^{xx}	5 930	141,2 ^x
E. coli CL 7002 (pCP 2), viljelyt yli yön	276,2	12 960	232	13 467	320,6 ^x
E. coli CL 7003 (lambda alfa Amy I)	23	-	1 162 ^{xx}	1 185	26,1 ^x

^x1 yksikkö määritellään entsyymimääräksi, joka antaa 1 mg:n maltoosiekvivalenttia/ml/ minuutti 50°C:ssa käyttäen 0,5 %:ista amyloosia substraattina.

^{xx}Osmoottista shokkimenetelmää ei käytetty, mutta hajotus tehtiin, joten tämä arvo edustaa amylaasiaktiivisuuden summaa solulimassa ja soluissa.

Esimerkki IIA

Plasmidin pCP 2 subkloonaus plasmidiksi pc 194 ja uuden plasmidin ekspressoiminen Bacillus subtiliksessa.

Tämä esimerkki kuvaa menetelmää, jolla keksinnön mukaisesti valmistettu rekombinantti-DNA voidaan ekspressoida isäntäbakteerissa, muussa kuin E. colissa, nimittäin eräässä Bacillus subtilis-kannassa.

Plasmidi pCP 2, esimerkistä II, sisältää 3,31 Kb:n fragmentit B. coagulans-luovuttajasta; plasmidia luonnehditaan lisäksi sillä, että se antaa ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssin ja sisältää kaksi pilkkomiskohtaa sekä Eco RI:lle että Hind III:lle. Plasmidi pCP 2 pilkottiin neljäksi fragmentiksi sekä Eco RI:lla että Hind III:lla, käsiteltiin ligaasilla ja käytettiin transformoimaan HB 101, kuten edellisissä esimerkeissä.

Muodostettiin uusia plasmideja, jotka tässä nimettiin pCP 2,3:ksi ja joissa oli 2,64 Kb:n fragmentit B. coagulans-DNA:ta, jolloin tämä fragmentti sisälsi alfa-amylaasia koodaavan geenin. pCP 2,3:lla on yksi ainoa kohta sekä Eco RI että Hind III varten ja antaa sekä ampisilliini- että tetrasykliiniresistenssin.

Seuraavaa vaihetta varten valittiin plasmidi pc 194, jonka tiedetään olevan plasmidi, joka pystyy monistumaan Bacillus subtiliksessa. pc 194 antaa kloramfenikoliresistenssin ja sillä on yksi ainoa Hind III-kohta.

Sekä pCP 2,3 että pc 194 avattiin Hind III:lla, sekoitettiin ja liitettiin muodostamaan uusi plasmidi, joka nimettiin pCH 1:ksi, ja joka sisälsi alfa-amylaasia koodaavan geenin ja jolla oli sekä kloramfenikoliresistenssi että ampilliiniresistenssi, joskin kloramfenikoliresistenssin taso oli alhainen E. colissa. Kuten edellä preparaattia käytettiin transformoimaan E. coli HB 101.

B. subtiliksen mutanttikantaa, joka on nimetty QB 1133:ksi (saatu Cr Michael Steinmetz'ilta, Institut de Recherche en Biologia Moleculaire, Universite Paris VII, Tour 43, 2 Place Jussieu, 75221 Paris Cedex 05), ja jolla ei ole alfa-amylaasiaktiivisuutta, käsiteltiin sitten

S. Chang'in ja S. Cohen'in, Molec. Gen. Genet. 168 (1979) 111 - 115 menetelmän mukaisesti protoplastien muodostamiseksi. Protoplastit transformoitiin sitten pCH 1:llä käyttäen Chang'in ja Cohen'in (Ibid) polyetyleeniglykolivälitteistä transformointimenetelmää.

Protoplasteja inkuboitiin sitten runsassisältöisessä väliaineessa 1,5 tuntia bakteereissa olevan plasmidin sallimiseksi ekspressoida resistenssi kloramfenikolille.

Protoplastit levitettiin sitten regeneroimisväliaineelle, johon oli lisätty kloramfenikolia määrässä 20 µg/ml. Kahden päivän inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa oli ilmestynyt transformoitujen solujen pesäkkeitä; pesäkkeet, joilla oli alfa-amylaasiaktiivisuus, havaittiin jodihöyryvärjäysmenetelmällä. Yksi klooni, joka nimettiin B. subtilis CL 8001 (pCH 1):ksi, talletettiin 13.1.1981 NCIB nro 11629:nä. Alkuperäinen kanta QB 1133 talletettiin myös 13.1.1981 NCIB nro 11628:na.

B. subtilis CL 8001 (pCH 1) on pysyvä ainoastaan kloramfenikolin läsnäollessa. Sitä voidaan käyttää tuottamaan alfa-amylaasia viljelemällä väliaineessa, joka sisältää kloramfenikolia (20 µg/ml). Alfa-amylaasi voidaan helposti ottaa talteen viljelynesteestä.

Yli yön kestäväen viljelyn jälkeen kloramfenikolin läsnäollessa määritettiin tuotetun alfa-amylaasin määrä seuraavasti:

Päällä oleva neste (U/L)	Solut (U/L)	Yhteensä (U/L)
136	14	150

Esimerkki III

Beta-amylaasin kloonaus

Luovuttaja-mikro-organismi oli Bacillus cereus kanta, jota on kuvattu Agency of Industrial Science & Technology'n (Japani) brittiläisessä patentissa nro 1 466 009. Se on talletettu kokoelmaan Fermentation Research Institute of Chiba-shi, Japani 20.12.1973 FERM - P nro 2391:nä ja talletettu myös kokoelmaan American Type Culture Collection ATCC nro 31102:nä 26.12.1974. Sen

tiedetään tuottavan sekä beta-amylaasia että alfa-1,6-glukosidaasia.

A. Beta-amylaasigeenin kloonaus lambda NM 781:ssä

Menetelmät, joita käytettiin pilkontaan, liittämiseen
5 ja rekombinanttifaagien talteenottoon, olivat samat kuin
esimerkissä II. B. cereuksen DNA (2 μ g) pilkottiin normaaliolosuhteissa Eco RI -restriktioentsyymillä. Faagivektori-DNA (1,25 μ g, lambda NM 781) leikattiin myös Eco RI:lla. Ligaatio ja pakkaaminen suoritettiin, kuten edellä selostettiin.
10

Löydettiin useita rekombinanttifageja, joilla oli amylaasiaktiivisuus (n. 1 500:sta). Yksi näistä faageista (nimetty "lambda NM 781 beta Amy 1:ksi) valittiin; se on talletettu kokoelmaan NCIB 12.2.1980 NCIB nro 11574:nä.

15 B. Beta-amylaasigeenin lambda NM 781 beta Amy 1:stä uudelleenklonaaminen plasmidiin pBR 322

Entsyymituotannon lisäämiseksi tätä ensimmäistä beta-amylaasikloonaa käytettiin beta-amylaasia koodaavan DNA:n lähteenä sen subklonaamiseksi monikopioplasmidiin pBR 322.
20

2 μ g lambda NM 781 beta Amy 1 DNA:ta ja 1 μ g pBR 322 leikattiin Eco RI:lla, sekoitettiin ja käsiteltiin T4-ligaasilla. Ligaatio ja transformointi toteutettiin, kuten edellä selostettiin.

25 Yhdellä pesäkkeellä 200:sta ampisilliiniresistentistä pesäkkeestä oli tärkeästä hajottava aktiivisuus. Yksi eristettiin ja nimettiin E. coli CL 7004 (pCP 3):ksi; se talletettiin 15.9.1980 NCIB nro 11602:na.

30 C. Beta-amylaasigeenin uudelleenklonaus faagin lambda-johdannaiseen, joka pystyy lysogenisoimaan E. colin

Käytetty vektori oli lämpöherkkä lambda T4 lig faagi CI 857 Wam Eam Sam (lambda NM 989), jota kuvattiin esimerkiksi II. N. 1 μ g plasmidin pCP 3 DNA:ta ja 0,5 μ g faagi-DNA:ta pilkottiin, sitten fragmentit liitettiin yhteen ja syntyneet DNA-fragmentit pakattiin in vitro. Faagipartikkelit, joilla oli amylaasiaktiivisuus, eristettiin ja käytettiin antamaan lysogeenisiä pesäkkeitä samalla menetelmällä kuin edellä.

E. coli C 600-kanta, joka on lysogeeninen tälle rekombinanttifaagille, eristettiin ja nimitettiin E. coli CL 7005:ksi (lambda beta Amy 1); tämä talletettiin 15.9.1980 NCIB nro 11603:na.

5 D. Amylaasi-geenituotteen amplifikaatio

Kaikissa klooneissa ja subklooneissa amylaasiaktiivisuus havaittiin DNS-menetelmällä. Beta-amylaasiaktiivisuus varmistettiin TLC-kromatogrammeilla maltoosin yhden
10 ainoan täplän läsnäololla amyloosi-digestoinnin jälkeen.

Beta-amylaasigeenin amplifikaatio eri klooneissa suoritettiin, kuten edellä selostettiin. Taulukossa II on esitetty entsyymaattinen aktiivisuus alkuperäisessä kannas-
15 sa verrattuna tähän aktiivisuuteen kolmessa kloonissa; tämä aktiivisuus saatiin joko faagilysaatista tai esimerkissä II kuvatulla osmoottisella shokkimenetelmällä.

Taulukko II

Solun ulkopuolinen ja soluun sidottu beta-amylaasiaktiivisuus
B cereuksessa ja rekombinanttiklooneissa

	Solun ulkopuolinen aktiivisuus		(1) Soluun sidottu aktiivisuus		Kokonaisaktiivisuus yksikköä/litra
	Yksikköä/litra	%	Yksikköä/litra	%	
B. cereus (2) ATCC 31102	1 420		Ei määritetty		1 420
lambda NM 781 beta Amy 1	80				80
E. coli CL 7004 (PCP 3) (3)	59	77,2	17,4	22,8	76,4
E. coli CL 7005 (lambda beta Amy 1) (4)	19	44,2	24	55,8	43

- (1) Soluun sidottu aktiivisuus: käsitteily lysotsyymillä solujen hajotuksen kanssa
 (2) Viljely suoritettiin 30°C:ssa yli yön (hiivauute, 1 %; baktotryptoni, 1 %; NaCl, 0,5 %)
 (3) Viljelyt yli yön 37°C:ssa (sama viljelyväliaineyhdistelmä)
 (4) Viljely 32°C:ssa → 45°C:ssa → 37°C:ssa, aktiivisuus mitattu päällä olevassa nesteessä ja soluissa hajotuksen jälkeen, kuten E. coli lambda alfa Amy 1 esimerkissä II.

75367

Esimerkki IV

Pullulanaasigeenin kloonaus

Luovuttaja-mikro-organismi oli Klebsiella pneumoniae, jonka on kuvattu H. Bender julkaisussa Biochem. Z. 334 (1961) 79-95 ja joka on talletettu kokoelmaan ATCC 6.6.1983 nro 15050:na. Se on mainittu myös A.E. Staley'n brittiläisessä patentissa nro 1 273 789.

2,25 µg luovuttaja-DNA:ta uutettiin ja fragmentoitettiin Eco RI:lla käyttäen standardiolosuhteita, ja 1,25 µg lambda NM 781 DNA:ta leikattiin samalla entsyymillä samoissa olosuhteissa. Inkubointi kesti kolme tuntia 37°C:ssa, minkä jälkeen reaktio lopetettiin kuumentamalla 10 minuuttia 75°C:ssa. Pilkonnan täydellisyys määritettiin, kuten esimerkissä II.

Pilkotut DNA:t liitettiin, otettiin talteen ja käytettiin E. coliin kannan HB 101 infektoimiseen, kaikki, kuten esimerkissä II. Saatiin n. 2×10^5 PFU/µg lambda-DNA:ta.

Kahden päivän inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa levyillä, jotka sisälsivät BBL-tryptikaasia + 0,25 % pullulaania, jotkut plakit osoittivat pullulanaasiaktiivisuutta, ts. niitä ympäröivät sameat renkaat, jotka ovat luonteenomaisia "ylikasvaneille" bakteereille. Pullulanaasia tuottavien faagien osuus oli suuruusluokkaa 1/2500.

Yksi valittiin ja se nimettiin tässä lambda NM 781 Pul 1:ksi; se talletettiin kokoelmaan NCIB 9.4.1980 NCIB nro 11592:na.

Pullulanaasiaktiivisuus havaittiin DNS-menetelmällä ja tuote pullulaanin hydrolyysistä faagilysaateilla tunnistettiin maltotriiosiksi ohutlevykromatografialla.

Lambda NM 781 Pul 1 sisältää suuren DNA-fragmentin (Klebsiella pneumoniaesta) pituudeltaan 13,5 Kb; tämä fragmentti pilkottiin uudelleen Eco RI:lla, mikä johti kahteen fragmenttiin, pituudeltaan 6,1 Kb ja vastaavasti 7,4 Kb. 6,1 Kb:n subfragmentti kloonattiin sitten uudelleen lambda NM 781:ssä ja sen osoitettiin sisältävän pullulanaasigeenin. Tätä uutta rekombinanttifaaagia nimitetään lambda 781 Pul 2:ksi; se talletettiin 15.9.1980 NCIB nro 11604:nä.

6,1 Kb:n alaryhmää subkloonattiin edelleen moni-
pioplasmidissa pACYC 184 (pBR 322:n johdannainen, jossa on
jälkimmäisen Tc^R -geeni ja Cm^R -geeni, jossa on yksi Eco RI-
kohta). Tätä uutta klooniam nimitetään E. coli CL 7006

5 (pCP 4):ksi; se talletettiin 15.9.1980 NCIB nro 11605:nä.

Kolmas subkloni rakennettiin kytkemällä 6,1 Kb:n
fragmentti faagiin lambda NM 898, kuten esimerkissä II ku-
vattiin. Tätä klooniam nimitetään E. coli CL 7007 (lambda
Pul 2):ksi; se talletettiin 15.9.1980 NCIB nro 11606:na.

10 Pullulanaasin ekspressio- ja amplifikaatiotasoa tut-
kittiin kaikissa klooneissa. Tulokset on koottu taulukkoon
III.

Kuten tuloksista voidaan nähdä, indusoi maltoosi
pullulanaasiaktiivisuutta, kun 0,04 % maltoosia on lisätty
15 LB-väliaineeseen. Lisäksi membraanijakeen Triton X 100-kä-
sittely oli tarpeen pullulanaasin talteenottamiseksi, mikä
osoittaa, että aktiivisuus sijaitsee membraaneissa.

Taulukko III

Klebsiella-pullulanaasin ekspressio E. coli -klooneissa. Aktiivisuus on ilmaistu maltoosi-ekvivalentti-yksikköinä yhdelle litralle viljelyä.

	Päällä oleva neste	Membraanit	Yhteensä	Entsyymituotannon lisäys
Klebsiella pneumonia + maltoosi	24	3,5	27,5	1
NM 781 Pul 1	0,76	2,6	3,86	0,14
NM 781 Pul 1 + maltoosi	2,2	9,84	12,04	0,44
NM 781 Pul 2	9,6	23,8	32,9	1,19
NM 781 Pul 2 + maltoosi	8,6	26,7	35,3	1,28
x E. coli CL 7006 (pCP 4)	Ei havaittu	3,4	3,4	0,123
x E. coli CL 7006 (pCP 4) + maltoosi	Ei havaittu	114	114	4,14
xxE. coli CL 7007 (lambda Pul 2) + maltoosi	47	93,5	140,5	5,13

x Viljelyt yli yön.

xxViljely 32°C:ssa → 45°C:ssa → 37°C:ssa, aktiivisuus mitattu päällä olevassa nesteessä ja soluissa hajotuksen jälkeen, kuten E. coli lambda alfa Amy 1:lle esimerkissä II.

75367

1. Menetelmä geneettisesti manipuloidun mikro-organismien valmistamiseksi, jolloin isäntämikro-organismiin lisätään yhdistelmä -DNA, joka sisältää amylaasia koodaavan geenin ja on valmistettu in vitro-menetelmällä pilkkomalla luovuttajabakteerista peräisin oleva DNA ja yhdistämällä syntyneet DNA-fragmentit vektoriin, joka on samalla tavalla pilkottu, t u n n e t t u siitä, että vektori on plasmidi tai lambda-faagin johdannaisen DNA ja geneettisesti manipuloitu mikro-organismi on bakteeri, joka sopivissa viljelyolosuhteissa pystyy tuottamaan amylaasia oleellisesti puhtaammassa muodossa tai oleellisesti suuremman määrän kuin alkuperäinen luovuttajamikro-organismi tuottaa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luovuttajabakteeri on Bacillus-suvun kanta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luovuttajabakteeri on Bacillus megaterium, Bacillus coagulans, Bacillus cereus tai Klebsiella pneumoniae.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luovuttajabakteeri on Bacillus megaterium NCIB n:o 11568, Bacillus coagulans NCIB n:o 11571, Bacillus cereus ATCC n:o 31102 tai Klebsiella pneumoniae ATCC n:o 15050.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vektori on plasmidi pBR 322, pACYC 184 tai pC 194.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vektori on faagi lambda NM 590, lambda NM 781 tai lambda NM 989.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 tai 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA käsittää faagit lambda NM 590 Amy 1, NCIB n:o 11569; lambda NM 781 alfa Amy 1, NCIB n:o 11572; lambda NM 781 beta Amy 1, NCIB

n:o 11574; lambda NM 781 Pul 1, NCIB n:o 11593 ja lambda NM 781 Pul 2, NCIB n:o 11604.

5 8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että geneettisesti manipuloitu mikro-organismi on E. coli tai B. subtilis.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että geneettisesti manipuloitu mikro-organismi on E. coli CL 7001 (pCP 1), NCIB n:o 11570; E. coli CL 7002 (pCP 2), NCIB n:o 11573; E. coli CL 7003 (lambda alfa Amy 1), NCIB n:o 11586; E. coli CL 7004 (pCP 3), NCIB n:o 10 11602; E. coli CL 7005 (lambda beta Amy 1), NCIB n:o 11603; E. coli CL 7006 (pCP 4), NCIB n:o 11605, E. coli CL 7007 (lambda Pul 2), NCIB n:o 11606 tai B. subtilis CL 8001 (pCH 1), NCIB n:o 11629.

15 10. Menetelmä amylaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että jonkin patenttivaatimuksen 1-9 mukaisesti valmistettua geneettisesti manipuloitua mikro-organismia viljellään amylaasia tuottavissa olosuhteissa.

20 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA on läsnä hajottavan faagin muodossa ja viljely suoritetaan infektoidussa bakteeri-isännässä.

25 12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA on läsnä faagin muodossa lysogeenisessä E. colissa ja viljely suoritetaan niin, että faagin monistuminen indusoidaan lämpökäsittelyllä.

30 13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA on läsnä geneettisesti manipuloidussa mikro-organismissa plasmidin muodossa ja viljely suoritetaan stationäärifaasiin saakka.

35 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi on pBR 322:n tai pACYC 184:n johdannainen ja monistumista tehostetaan viljelemällä mikro-organismia kloramfenikolin läsnäollessa ennen sen viljelyä stationäärifaasiin saakka.

15. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että näin valmistettu amylaasi on alfa-amy-
laasi ja mikro-organismin yhdistelmä-DNA sisältää amylaasia
koodaavan geenin, joka on saatu Bacillus megateriumista.

5 16. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että näin valmistettu amylaasi on lämpöä
kestävä alfa-amyalaasi ja mikro-organismin yhdistelmä-DNA si-
sältää amylaasia koodaavan geenin, joka on saatu Bacillus
coagulansista.

10 17. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että näin valmistettu amylaasi on beta-
amylaasi ja mikro-organismin yhdistelmä-DNA sisältää amylaa-
sia koodaavan geenin, joka on saatu Bacillus cereuksesta.

15 18. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että näin valmistettu amylaasi on pullula-
naasi ja mikro-organismin yhdistelmä-DNA sisältää amylaasia
koodaavan geenin, joka on saatu Klebsiella pneumoniaesta.

Patentkrav

75367

1. Förfarande för framställning av en genetiskt manipulerad mikroorganism, varvid man i en värdmikroorganism
5 introducerar rekombinant-DNA, som innehåller en amylaskodande gen och som framställts medelst ett in vitro-förfarande genom att klyva DNA, härlett från en donormikroorganism, och genom att förena de bildade DNA-fragmenten med en på samma sätt klyvd vektor, k ä n n e t e c k n a t därav,
10 att vektorn är en plasmid eller DNA:n av ett derivat av en lambdafag och den genetiskt manipulerade mikroorganismen är en bakterie, som under lämpliga odlingsförhållanden förmår producera amylas i en väsentligt renare form eller i en väsentligt större mängd än den ursprungliga donormikroorganismen producerar.
15

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att donorbakterien är en stam av släktet *Bacillus*.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att donorbakterien är *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* eller *Klebsiella pneumoniae*.
20

4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att donorbakterien är *Bacillus megaterium* NCIB nr 11568, *Bacillus coagulans* NCIB nr 11571, *Bacillus cereus* ATCC nr 31102 eller *Klebsiella pneumoniae* ATCC nr 15050.
25

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att vektorn är plasmiden
30 pBR 322, pACYC 184 eller pC 194.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att vektorn är fagen lambda NM 590, lambda NM 781 eller lambda NM 989.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4 eller
35 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA:n omfattar fagerna lambda NM 590 Amy 1, NCIB nr 11569; lambda

NM 781 alfa Amy 1, NCIB nr 11572; lambda NM 781 beta Amy 1, NCIB nr 11574; lambda NM 781 Pul 1, NCIB nr 11593; och lambda NM 781 Pul 2, NCIB nr 11604.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5,
5 k ä n n e t e c k n a t därav, att den genetiskt manipulerade mikroorganismen är E.coli eller B. subtilis.

9. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5,
k ä n n e t e c k n a t därav, att den genetiskt manipulerade mikroorganismen är E. coli Cl 7001 (pCP 1), NCIB nr
10 11570; E. coli CL 7002 (pCP 2), NCIB nr 11573; E. coli CL 7003 (lambda alfa Amy 1), NCIB nr 11586; E. coli CL 7004 (pCP 3), NCIB nr 11602; E. coli CL 7005 (lambda beta Amy 1), nr 11603; E. coli CL 7006 (pCP 4), NCIB nr 11605; E. coli CL 7007 (lambda Pul 2), NCIB nr 11606; eller B. subtilis
15 CL 8001 (pCH 1), NCIB nr 11629.

10. Förfarande för framställning av amylas, k ä n n e t e c k n a t därav, att en genetiskt manipulerad mikroorganism, framställd enligt något av patentkraven 1-9, odlas under amylasproducerande förhållanden.

20 11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA:n är närvarande i form av en lytisk fag och odlingen genomförs i en infekterad bakterievärd.

25 12. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA:n är närvarande i form av en fag i lysogen E. coli och odlingen utförs så, att mångfaldigandet av fagen induceras genom en värmebehandling.

30 13. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA:n är närvarande i den genetiskt manipulerade mikroorganismen i form av en plasmid och odlingen utförs till stationär fas.

35 14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att plasmiden är ett derivat av pBR 322 eller pACYC 184 och att mångfaldigandet förstärks genom odling av mikroorganismen i närvaro av kloramfenikol innan odlingen av denna till stationär fas.

15 15. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det så framställda amyaset är
ett alfa-amylas och mikroorganismens rekombinant-DNA inne-
håller en amyaskodande gen, vilken erhållits från *Bacillus*
5 *megaterium*.

10 16. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det så framställda amyaset är
että värmebeständigt alfa-amylas och mikroorganismens rekombinant-DNA innehåller en amyaskodande gen, vilken erhållits från *Bacillus*
10 *coagulans*.

15 17. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det så framställda amyaset är
ett beta-amylas och mikroorganismens rekombinant-DNA inne-
håller en amyaskodande gen, vilken erhållits från *Bacillus*
15 *cereus*.

20 18. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att det så erhållna amyaset är ett
pullulanas och mikroorganismens rekombinant-DNA innehåller
en amyaskodande gen, vilken erhållits från *Klebsiella* *pneu-*
20 *moniae*.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 91 (1979),
Y. Yoneda et al., pp. 1556-64.
Chemical Abstracts, vol. 92 (1980) 90668a.
Agricultural and Biological Chemistry, vol. 43 (1979), pp. 2637-38.