



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

81380

C (11) 12N 15/00
P. 06.06.84 US 617874 P

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/64

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	852038
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	22.05.85
(24) Alkupäivä - Löpdag	22.05.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	07.12.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.06.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
06.06.84 US 617874 P	

(71) Hakija - Sökande

1. CPC International Inc., P.O. Box 8000, International Plaza, Englewood Cliffs, N.J.,
USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Davis, Philip E., 8235 "D" Portsmouth, Darien, Ill., USA, (US)
2. Mielenz, Jonathan R., 3499 Nancy Place, Shoreview, Minn., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä amylaasinegatiivisen ja mahdollisesti itiöttömän Bacillus subtilis-mutantin valmistamiseksi, joka on käyttökelpoinen isäntänä isäntä-vektori systeemissä
Förfarande för framställning av amylas-negativ och möjligen sporfri mutant av Bacillus subtilis, som är användbar som värd i värd-vektorsystem

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 92233 (C 12N 15/00), EP A 92234 (C 12N 15/00), EP A 92235 (C 12N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee biologisesti puhdasta, amylaasinegatiivista, itiöitä muodostamatonta mutanttia B. subtilis ATCC 39 701 ja amylaasinegatiivista mutanttia B. subtilis ATCC 39 706 näiden B. subtilis -kantojen valmistusta sekä menetelmiä, joissa niitä käytetään. Itiöitä muodostamaton mutantti, joka ei sisällä amylaasia koodaavaa geeniä, on erityisen käyttökelpoinen isäntänä isäntä-vektorisysteemissä parannettujen amylaasia tuottavien mikro-organismikantojen tuotantoon tähtäävää yhdistelmä-DNA-tutkimusta varten.

Uppfinningen avser den biologiskt rena, amylasnegativa, icke sporbildande mutanten B. subtilis ATCC 39701 och den amylasnegativa mutanten B. subtilis ATCC 39706, framställningen av dessa B. subtilis-stammar samt förfarande, var de används. Den icke sporbildande mutant, vilken saknar amylaskodande gener, är speciellt användbar som värd i ett värd-vektorsystem för rekombinant DNA-arbete som riktar sig mot framställningen av förbättrade stammar av amylasproducerande mikroorganismer.

Menetelmä amylaasinegatiivisen ja mahdollisesti itiöttömän *Bacillus subtilis*-mutantin valmistamiseksi, joka on käyttökelpoinen isäntänä isäntä-vektori systeemissä

5 Tämä keksintö liittyy uuteen amylaasinegatiiviseen *Bacillus subtilis*-mutanttiin, joka on käyttökelpoinen isäntänä, johon voidaan tuoda amylaasia koodaavia geenejä sisältäviä vektoreita yhdistelmä-DNA-menetelmiä käyttäen.

10 Suurin osa bakteerin geneettisestä materiaalista on jättiläismäisinä DNA-molekyyleinä, jotka esiintyvät solun kromosomina. Tietty määrä geneettistä materiaalia voi esiintyä myös pienempien, rengasmaisten DNA-molekyylien muodossa, jotka tunnetaan plasmideina. Tiettyyn perinnölliseen ominaisuuteen liittyvää DNA-molekyylin osaa kutsutaan geeniksi.

15 Geneettiseksi käsittelyksi kutsutuilla menetelmillä on mahdollista siirtää tietyn proteiinin tuotantoa koodaava geeni yhdestä mikro-organismista toiseen. Uuden geneettisen materiaalin vastaanottavaa mikro-organismia kutsutaan isännäksi. Lukuisat tutkijat ovat käyttäneet näitä menetelmiä mikro-organismien aikaansaamiseen, jotka ovat erinomaisia tiettyjen spesifisten proteiinien, kuten entsyymien, tuottajia.

20 On havaittu, että plasmidit, jotka sisältävät sarjan geenejä liittyneinä toisiinsa renkaan muotoon, voidaan poistaa mikro-organismin soluista ja sijoittaa toisen mikro-organismin soluihin suhteellisen helposti. Plasmideja voidaan myös käyttää vektoreina uuden geneettisen materiaalin viemiseksi isäntäorganismiin. Tämä tehdään katkaisemalla ensin plasmidi entsyymillä, joka tunnetaan restriktioendonukleasin nimellä ja joka avaa DNA-renkaan. Vieraan DNA:n fragmentti, joka sisältää halutun geenin, sijoitetaan kohtaan, josta DNA-rengas oli katkaistu. Rengas suljetaan takaisin käsittelemällä DNA-ligaasilla.

30 Yhdistelmäplasmidi, uusi rengasmainen DNA-molekyyli, si-

35

sältää alkuperäisen plasmidin geenit ja siihen sijoitetun DNA-palan mukana tulleen uuden geenin. Tämä plasmidi voidaan pakata isäntämikro-organismiin. Uuden geenin sisältävä plasmidi lisääntyy sitten isäntämikro-organismissa ja tulee osaksi sen geneettistä materiaalia.

5 Jotta isäntämikro-organismi olisi soveltuva yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettäväksi, sillä tulee olla kyky ottaa vastaan uusi DNA. Lisäksi tulee tuloksena olla elin-
kykyinen mikro-organismi, joka ilmentää siihen sijoitetun
10 geenin koodaamia ominaisuuksia. Jotta mikro-organismi tuottaisi käyttökelpoisia määriä proteiinia, tulee sen olla myös kasvatettavissa kaupallisessa mittakaavassa.

Uutta yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttävät kokeellisen työn tekijät ovat olleet huolissaan siitä, että uutta
15 geneettistä materiaalia sisältävät mikro-organismit voisivat tuottaa ihmiselle, eläimille tai kasveille haitallisia aineita. Tämän huolen takia the National Institute of Health (NIH) julkaisi vuonna 1978 ohjeet tutkimuksia varten, joissa käytetään yhdistelmä-DNA -molekyylejä ("Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules").
20 Nämä ohjeet edellyttävät erilaisia fysikaalisten varustusten tasoja laboratorioissa, joissa tehdään geenimanipulaatiokokeita. Ne vahvistivat myös biologisten varustusten tasot yhdistelmä-DNA:ta sisältäviä mikro-organismeja varten.
25

Biologiseen suojaukseen liittyy sellaisten isäntäsolujen ja vektoreiden käyttö, joilla on rajoitettu kyky pysyä hengissä, jos ne karkaavat laboratorioista luontoon. Itiöitä muodostamattomien mikro-organismien soluilla on
30 tällainen rajoitettu kyky säilyä hengissä.

Tässä kuvataan uutta itiötöntä B. subtilis B1-109 -mutanttia, joka on käyttökelpoinen isäntänä isäntavektori-systeemissä. Tämän isännän lisäetuna on se, että se on amylaasinegatiivinen mutantti. Tämä mutantti on erityisen
35 hyvin soveltuva isännäksi sellaisille yhdistelmäplasmii-

deille, jotka sisältävät spesifisten amylaasien, kuten lämpöstabiilien alfa-amylaasien, tuotantoa koodaavia geenejä. Nämä amylaasit ovat kaupallisesti tärkeitä, sillä niitä käytetään tärkkelyshydrolysaattien, glukoosin ja korkean fruktoosipitoisuuden sisältävien siirappien valmistusprosesseissa.

Tässä kuvattu mukainen mutantti ottaa helposti vastaan lämpöstabiilia alfa-amylaasia vastaavan geenin sisältäviä plasmideja. Tuloksena oleva mikro-organismi on paljon parempi lämpöstabiilin alfa-amylaasientsyymin tuottaja kuin isäntävektorisysteemit, jotka on valmistettu aiemmin kuvatuista B. subtilisin amylaasinegatiivisista kannoista, kuten ATCC 39 096:sta, jotka kuvataan julkaistussa EP-hakemuksessa n:o 092 235, joka on jätetty 26.10.1983.

Tässä kuvataan itiöttömän B. subtilis Bl-109:n viljelmää, joka on soveltuva käytettäväksi isäntäkomponenttina isäntä-vektorisysteemissä ja jolle on tunnusmerkillistä se, ettei se sisällä amylaasia koodaavaa geeniä ja että sen muuttumistiheys itiöitä muodostaviksi muodoiksi on pienempi kuin noin 10^{-7} kasvatettuna ilmastetuissa olosuhteissa ja että se sisältää seuraavat geneettiset markkerit: spoIIA12, amyE ja sacA321. B. subtilis -kanta, jolla on nämä ominaispiirteet, on talletettu the American Type Culture Collectioniin numerolla ATCC 39 701.

Lisäksi kuvataan amylaasinegatiivisen B. subtilis Bl-20:n viljelmää, joka kanta on soveltuva käytettäväksi isäntäkomponenttina isäntä-vektorisysteemissä ja käyttökelpoinen välivaiheena isäntä-vektorisysteemien amylaasinegatiivisten isäntäkomponenttien valmistukseen ja jolle on tunnusmerkillistä se, että se sisältää seuraavat geneettiset markkerit: metB5, amyE ja sacA321. B. subtilis -kanta, jolla on nämä luonteenpiirteet on talletettu the American Type Culture Collectioniin numerolla ATCC 39 706.

Keksintö koskee menetelmää B. subtilis -kannan Bl-20 (ATCC 39 706), jolla on geneettiset markkerit metB5,

amyE ja sacA321, valmistamiseksi, jossa menetelmässä transformoidaan B. subtilis -kannan 1A289 kompetentit solut B. subtilis -kannan 1A221 DNA:lla ja eristetään solut, jotka eivät tuota alfa-amylaasientsyymiä.

5 Keksintö koskee lisäksi menetelmää B. subtilis -kannan B1-109 (ATCC 39 701) valmistamiseksi, jolla on geneettiset markkerit spoIIA12, amyE ja sacA321, jossa menetelmässä transformoidaan B. subtilis -kannan B1-20 kompetentit solut B. subtilis -kannan 1S30 DNA:lla ja eristetään solut, jotka kasvavat ilman lisättyä metioniinia, 10 eivät tuota alfa-amylaasientsyymiä eivätkä muodosta itiötä lämpöshokin (90 °C, 10 min) jälkeen.

 Lisäksi kuvataan menetelmää B. subtilis -kantojen B1-109 ja B1-20 käyttämiseksi isäntinä isäntä-vektorisysteemeissä, jossa menetelmässä transformoidaan halutun geneettisen materiaalin sisältävällä plasmidilla yhden tai useamman B. subtilis -kannan kompetentit solut ja kasvatetaan näitä soluja olosuhteissa, joissa plasmidi pysyy solujen sisällä.

20 Keksinnön mukaiset B. subtilis -kannat valmistettiin sisällyttämällä niihin muiden B. subtilis -kantojen geneettistä materiaalia. Amylaasinegatiivinen B. subtilis -kanta 1A289 (ATCC 39711), joka sisälsi markkerit aroI906, metB5, sacA321 ja amyE, muutettiin kannaksi, joka ei enää 25 tarvitse aromaattisia aminohappoja, sisällyttämällä siihen osa B. subtilis -kannan 1A221 (ATCC 39086) DNA:sta.

 Kantaa 1A289 ovat kuvanneet Steinmetz et al. [Mol. Gen. Genet. 148 (1976) 281-285]. Se on saatavissa the American Type Culture Collectionista, Rockville, Maryland 30 numerolla ATCC 39711.

 Kantaa 1A221 ovat kuvanneet Dubnau ja Smith [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65 (1970) 96-103]. Se on saatavissa the American Type Culture Collectionista, Rockville, Maryland, numerolla ATCC 39 086.

35 Tuloksena oleva transformantti, josta käytetään merkintää B1-20, sisältää markkerit metB5, amyE ja

sacA321. Se on saatavissa the American Type Culture Collectionista numerolla ATCC 39706. Tämä amylaasinegatiivinen kanta on käyttökelpoinen välituote isäntä-vektorisysteemien amylaasinegatiivisten isäntäkomponenttien valmistukseen. Se voi myös itse toimia isäntänä olosuhteissa, joissa itiöitä muodostava isäntä on hyväksyttävissä.

Osa itiöttömän *B. subtilis* -kannan DNA:sta siirrettiin kantaan B1-20, jolloin saatiin uusi kanta B1-109. DNA:n luovuttajana käytetty itiötön kanta oli 1S30, jonka luovutti the Bacillus Genetic Stock Center, Dept. of Microbiology, Columbus, Ohio. Tätä kantaa, joka sisältää markkerin *spoIIA12*, ovat kuvanneet Ionesco ja Schaeffer [Ann. Inst. Pasteur, Paris 114 (1968) 114]. Se on saatavissa the American Type Culture Collectionista, Rocville, Maryland, numerolla ATCC 39 712.

Tässä kuvatun itiöitä muodostamattoman, amylaasinegatiivisen kannan B1-109 muuttumistiheys itiöitä muodostavaksi muodoksi on pienempi kuin noin 10^{-7} . Sitä voidaan kasvattaa teollisissa olosuhteissa, eikä se vaadi kalliita kasvua edistäviä lisäaineita. Sillä on alhainen hengissäsäilymiskyky luonnossa tai karanneena ja hyvin pieni taipumus siirtää plasmideja muihin organismeihin luonnollisen geneettisen siirron kautta. Tämä organismi soveltuu hyvin plasmidien vastaanottamiseen käytettäessä klassisia transformointimenetelmiä. Erinomaisia transformaatiotuloksia saavutettiin käyttämällä kompetenteille soluille tarkoitettuja transformointimenettelyjä. Se toimii hyvin isäntänä erilaisille plasmidivektoreille, mikä tekee siitä käyttökelpoisen isäntäkomponentin *B. subtilis* -isäntä-vektorisysteemiin. Koska se on amylaasinegatiivinen, se on erityisen hyvin soveltuva käytettäväksi isäntänä yhdistelmäplasmideille, jotka sisältävät amylaasien tuotantoa koodaavia geenejä.

B. subtilis -kromosomin yksityiskohtaisen geenikartan ovat julkaisseet Henner ja Hoch [Microbiological Reviews 44 (1980) 57-82]. Seuraavassa on lyhyt kuvaus ge-

neettisistä markkereista, jotka mainitaan tämän keksinnön yhteydessä:

5 (1) spoIIA12: Tämä on deletiomutaatio, joka salpaa itiöiden muodostuksen varhaisimpia vaiheita. Tämä mutaatio tuhoaa Bacillusten kyvyn muodostaa itiöitä, jossa muodossa se normaalisti säilyy hengissä luonnossa joutuessaan alttiiksi lämmölle, UV-säteilylle, kemikaaleille ja kuivumiselle.

10 (2) aroI906: Tämä on mutaatio, joka saa mutantit tarvitsemaan fenyylialaniinia, tyrosiinia ja tryptofaania. Näiden aminohappojen puuttuessa mutantin sisältävä kanta lakkaa kasvamasta.

15 (3) amyE: Tämä markkeri liittyy puutteellisuuteen alfa-amylaasin tuotantoa koodaavassa rakennegeenissä. Sille on luonteenomaista hyvin pieni muuttumistiheys.

(4) lin2: Tämän geneettisen markkerin sisältävät kannat kasvavat, kun vähimmäisalustaa sisältävät maljat täydennetään sopivilla aminohapoilla ja ne sisältävät linkomysiiniä pitoisuutena 100 µg/ml. Markkeria sisältämättömät kannat eivät kasva tällaisilla maljoilla.

20 (5) metB5: Tämä mutaatio saa mutantit tarvitsemaan metioniinia. Tämän aminohapon puutteessa lakkaavat tämän mutantin sisältävät kannat kasvamasta.

25 (6) sacA321: Tämä on mutaatio, joka estää mikro-organismin sakkaroosimetabolialle välttämättömän entsyymin muodostuksen. Tämä estää isäntää kasvamasta alustalla, joka sisältää sakkaroosia hiililähteenä.

30 Seuraava esimerkki valaisee tämän keksinnön tiettyjä suoritusmuotoja. Ellei toisin mainita, kaikki osuudet ja prosenttiosuudet ovat painon mukaan laskettuja. Kaikki kannat, joille on annettu ATCC-numero, ovat saatavissa the American Type Culture Collectionista, Rockville, Maryland. Nämä kannat on talletettu Budapestin sopimuksen sääntöjen, jotka koskevat mikro-organismien talletusta patenttitar-

35 koituksiin, mukaisesti. Kaikki Difco-nimellä merkityt rea-

genssit ovat saatavissa yhtiöstä Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

Esimerkki

5 B. subtilis -kannan 1A289 (ATCC 39 711) muuttaminen kannaksi, joka ei enää tarvitse täydentäviä aromaattisia aminohappoja kasvaakseen, tehtiin sisällyttämällä siihen B. subtilis -kannan 1A221 (ATCC 39 086) DNA:ta seuraavasti.

10 B. subtilis -kannan 1A289 (ATCC 39 711) soluja kasvatettiin yön yli maljoilla, jotka sisälsivät tryptooseiveriagaralustaa (Tryptose Blood Agar Base, Difco). Näiltä maljoilta eristetyillä soluilla inokuloitiin Penassay Broth -alusta (Difco) ja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa ravistellen kierrosluvulla 200 rpm. Solut erotettiin 15 sentrifugoimalla ja suspendoitiin 5-kertaiseen tilavuuteen kasvualustaa, joka sisälsi 0,5 % glukoosia, 0,6 % KH_2PO_4 , 1,4 % K_2HPO_4 , 0,1 % natriumsitraattia, 0,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ja 0,07 % MgSO_4 täydennettynä leusiinilla, isoleusiinilla ja metioniinilla (50 µg/ml) ja histidiinillä, tryptofaanilla, 20 arginiinilla, valiinilla, lysiinillä, treoniinilla, glysiinillä ja asparagiinihapolla (25 µg/ml). Viljelmän optisen tiheyden kasvua seurattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 620 nm. Kun viljelmät saavuttivat siirtymävaiheen logaritmisien ja stationäärisien kasvun välillä (optisen tiheyden muutos alle 5 % 15 min:ssa), ne käytettiin 25 transformointiin DNA:lla.

Transformoiva DNA saatiin B. subtilis -kannasta 1A221 (ATCC 39 086) seuraavasti.

30 Kantaa 1A221 kasvatettiin 100 ml:ssa Penassay Broth -alustaa (Difco). Seosta kasvatettiin 37 °C:ssa, kunnes seoksen optinen tiheys aallonpituudella 660 nm mitattuna oli 0,6. Solut kerättiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 1 ml:aan liuosta, joka sisälsi 0,005 mol/l etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA) ja 0,05 mol/l NaCl:a ja 35 ja 2 mg lysotsyymiä. Kun solut alkoivat hajota, ne pakas-

tettiin upottamalla astia hiilihapojääasetonihauteeseen. Sitten jäätyneisiin soluihin lisättiin 5 ml puskuriliuosta, joka sisälsi 0,03 mol/l tris(hydroksimetyyli)aminome-
taania (pH 8,0) ja 0,005 mol/l EDTA:a, ja seos jäädytettiin ja sulatettiin kahdesti. Lisättiin yhtä suuri tilavuus fenolia ja seosta ravisteltiin 70 min 40 °C:ssa. Saostunut proteiini poistettiin sentrifugoimalla. DNA saostettiin kirkkaasta supernatantista lisäämällä 0,12 ml 3 M natriumasetaattia (pH 8,0) ja 0,64 ml isopropanolia yhtä millilitraa kohden liuosta. Saostunut DNA kerättiin kietomalla se lasisauvalle ja pestiin isopropanolilla. DNA liuotettiin takaisin liuokseen, joka sisälsi 0,015 mol/l natriumkloridia ja 0,0015 mol/l natriumasetaattia (pH 7) ja säilytettiin 4 °C:ssa, kunnes ne käytettiin formointiin.

Edellä kuvatulla tavalla preparoidut kompetentit B. subtilis 1A289 -solut (1,0 ml) sekoitettiin DNA:han, jonka pitoisuus lopullisessa seoksessa oli 10 µg/ml, ja viljelmää ravisteltiin varovasti (100 rpm) 30 min 37 °C:ssa. Sitten viljelmä laimennettiin 2 ml:lla Penassay Broth -alustaa (Difco) ja inkuboitiin vielä 90 min 37 °C:ssa. Solut kerättiin sentrifugoimalla, pestiin kerran tislattulla vedellä, suspendoitiin uudelleen alkuperäiseen tilavuuteen alustaa ja levitettiin maljoille, jotka sisälsivät Spizizenin vähimmäisalusta-agaria täydennettynä metioninilla (5 µg/ml). Spizizenin vähimmäisalusta on liuos, joka sisältää (a) 0,2 % ammoniumsulfaattia; (b) 1,4 % kaksiemäksistä kaliumfosfaattia; (c) 0,6 % yksiemäksistä kaliumfosfaattia; (d) 0,1 % natriumsitraattia; ja (e) 0,02 % magnesiumsulfaattia ja jonka pH on säädetty arvoon 7,4. Niistä kahdesta pesäkkeestä, jotka kasvoivat, kun lisättiin 0,5 ml solususpensiota, toinen ei tuottanut amylaasia. Se valittiin sillä perusteella, että sillä oli kyky kasvaa lisättyjen aromaattisten aminohappojen puuttuessa, ja sille annettiin merkintä B1-20. Se sisälsi markkerit metB5, amyE ja sacA321. Tämän kannan biologises-

ti puhdas viljelmä on talletettuna the American Type Culture Collectionissa numerolla ATCC 39 706.

5 Kanta B1-20 (metB5, amyE, sacA321) muutettiin itiöitä tuottamattomaksi kannaksi B1-109 transformoimalla se donorikannan 1S30 (ATCC 39 712) DNA:lla. Transformointi tehtiin käyttämällä kompetentteja B1-20 soluja.

10 Donori-DNA saatiin B. subtilis -kannasta 1S30 (ATCC 39 712) seuraavasti. Soluja kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa 100 ml:ssa glukoosia sisältävää trypsiinipilkottu soijalustaa (Tryptic Soy with glukose, TSG, Difco). Sitten lisättiin 40 mg lysotsyymiä ja seosta inkuboitiin 30 min 60 °C:ssa. Sferoplastit erotettiin sentrifugoimalla 10 min nopeudella 4500 rpm ja suspendoitiin 40 ml:aan liuosta, joka sisälsi 0,15 mol/l NaCl:a ja 0,1 mol/l EDTA:a (pH 15 10,2). Lisättiin 3 ml 25-%:ista natriumdodekyyli-sulfaattiliuosta ja inkuboitiin 70 °C:ssa 1 h. Proteiini saostettiin kahdesti lisäämällä liuosta, joka sisälsi 0,03 mol/l NaCl:a ja 0,003 mol/l natriumsitraattia (pH 7) ja oli kylmäinen fenolin suhteen. Supernatanttiin lisättiin 5 ml 3 M 20 natriumasetaattiliuosta. Liuoksen päälle lisättiin isopropanolikerros. Faasien rajalle muodostunut DNA kiedottiin lasisauvalle. Sauvalla oleva DNA pestiin kahdesti kylmällä isopropanolilla ja liuotettiin liuokseen, joka sisälsi 0,03 mol/l NaCl:a ja 0,003 mol/l natriumsitraattia (pH 7). 25 Saatua liuosta dialysoitiin suurta tilavuutta vastaan liuosta, joka sisälsi 0,015 mol/l NaCl:a ja 0,0015 mol/l natriumsitraattia (pH 7), vaihtaen liuos tuoreeseen kolmesti 24 h:n aikana, minkä jälkeen tuote käytettiin transformointiin.

30 B. subtilis -kannan B1-20 soluja kasvatettiin 37 °C:ssa yön yli maljoilla, jotka sisälsivät tryptoosi-veri-agaralustaa (Tryptose Blood Agar Base, Difco). Maljoilta eristetyt solut suspendoitiin sitten pieneen määrään kasvualustaa, ja seoksella inokuloitiin 60 ml kasvu- 35 alustaan 500 ml:n erlenmeyerpulloissa. Seosta kasvatettiin

33-37 °C:ssa ravistellen. Kasvualusta sisälsi seuraavat aineosat: 0,5 % glukoosia, 0,6 % KH_2PO_4 , 1,4 % K_2HPO_4 , 0,1 % natriumsitraattia, 0,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % MgSO_4 , 0,02 % kasaminohappoja (Difco), 0,1 % hiivauutetta (Difco) ja 0,02 % L-tryptofaania. Kasvua seurattiin mittaamalla optista tiheyttä aallonpituudella 620 nm. Kun viljelmät saavuttivat siirtymävaiheen logaritmisien ja stationääri kasvun välillä (optisen tiheyden muuttuminen alle 5 % 15 min:ssa), ne käytettiin transformointiin DNA:lla. Solususpensio laimennettiin kaksinkertaisella tilavuudella transformointiväliainetta, jolla oli muuten sama koostumus kuin kasvualustalla, mutta se sisälsi lisäksi 2 % 0,1 M MgCl_2 ja 1 % 0,05 M CaCl_2 . Laimennus tehtiin esilämmitettyyn transformointiväliaineeseen lämpötilassa 33-37 °C. Seosta inkuboitiin tässä lämpötilassa 90 min ravistellen kierrosnopeudella 300 rpm. 5 min ennen inkubointijakson loppua lisättiin steriiliä 20 mM etyleeniglykoli-bis(beta-aminoetyylieetteri)-N,N,N',N'-tetraetikkahappoa loppupitoisuudeksi 1 mmol/l.

Transformointi tehtiin sekoittamalla 2 µl kannasta IS30 edellä kuvatulla tavalla eristettyä DNA:ta 0,5 ml:aan kannan B1-20 edellä kuvattuja kompetentteja soluja. Seosta inkuboitiin 30-37 °C:ssa 90 min ravistellen nopeudella 250 rpm. Viljelmät siirrostettiin agarmaljoille steriilillä vedellä laimentamisen jälkeen. Solut, joilla oli metioniinipositiiviset, amylaasinegatiiviset ominaisuudet, valikoitiin kasvattamalla viljelmiä agarmaljoilla, jotka sisälsivät Spizizenin vähimmäisalustaa täydennettynä tryptofaanilla (5 mg/ml) ja 1 %:lla Lintner-tärkkelystä. 600 pesäkkeestä tutkittiin itiöttömyysominaisuudet shokkikäsittelemällä ne lämmöllä (10 min, 90 °C). Yksi pesäke, B1-109, oli itiöitä muodostamaton. Sillä oli geneettiset markerit spoIIA12, amyE ja sacA321. Tämän kannan biologisesti puhdas viljelmä on tallennettuna the American Type

Kanta B1-109 vaatii kasvaakseen mineraalisuoloja, jotka sisältävät ammonium-, kalium-, fosfaatti- ja natriumioneja. Se käyttää hyväkseen erilaisia hiililähteitä glukoosi mukaan luettuna. Kanta ei muutu takaisin itiöitä muodostaviksi muodoiksi, kuten seuraava testi osoittaa. Soluja kasvatettiin agarmaljoilla, jotka sisälsivät DSM-alustaa (Difco), 37 °C:ssa. Solut suspendoitiin 24 h:n kulu-
5 luttua trypsiinipilkottuun soija-alustaan, joka sisälsi 0,1 % glukoosia, ja pidettiin 90 °C:ssa 10 min. Sitten solut laskettiin maljoilla, jotka sisälsivät tryptoosi-veri-
10 agaralustaa (Tryptose Blood Agar Base, Difco). Elävien solujen kokonaismäärä määritettiin näillä maljoilla olevien pesäkkeitä muodostavien yksiköiden perusteella. Vertailukohtana käytettiin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden
15 lukumäärää millilitrassa, kun laskenta tehtiin kuumentamattomille näytteille. Kuumentamattomat näytteet sisälsivät $1,27 \times 10^8$ pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitras-
sa, kun taas kuumennetut solut sisälsivät vain 5 pesäkkeitä muodostavaa yksikköä millilitrassa. Tämä osoittaa,
20 että kannan muuttumistiheys itiöitä muodostaviksi muodoiksi on alle noin 10^{-7} kasvatettuna ilmastusolosuhteissa.

Sekä kannalla B1-20 että B1-109 on hyvä yhteensopivuus plasmidien kanssa klassisissa transformaatioreaktioissa. Plasmidivektorit pysyvät isäntäsoluissaan, vaikka
25 isäntäsoluja vektoreineen kasvatetaan jopa niin korkeassa lämpötilassa kuin 45 °C.

Kaikki tässä kuvatut tutkimukset tehtiin noudattaen NIH:n ohjeissa määritettyjä fysikaalisia ja biologisia vaatimuksia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä *Bacillus subtilis* -kannan B1-20 (ATTC 39 706), jolla on geneettiset markkerit metB5, amyE ja
5 sacA321, valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että transformoidaan *B. subtilis* -kannan 1A289 kompetentit solut *B. subtilis* -kannan 1A221 DNA:lla ja eristetään solut, jotka eivät tuota alfa-amylaasientsyymiä.

2. Menetelmä *Bacillus subtilis* -kannan B1-109 (ATTC
10 39 701), jolla on geneettiset markkerit spoIIA12, amyE ja sacA321, valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että transformoidaan patenttivaatimuksen 1 mukaisesti valmistetun *B. subtilis* -kannan B1-20 kompetentit solut *B. subtilis* -kannan 1S30 DNA:lla ja eristetään solut, jotka kasvavat ilman lisättyä metioniinia, eivät tuota alfa-amylaasientsyymiä, eivätkä muodosta itiöitä lämpötilassa 90 °C 10
15 min kestäneen lämpöshokkikäsittelyn jälkeen.

Patentkrav

5 1. Förfarande för framställning av *Bacillus subtilis*-stammen B1-20 (ATCC 39 706) med de genetiska markörerna metB5, amyE och sacA321, k ä n n e t e c k n a t därav, att man transformerar kompetenta celler av *B. subtilis*-stammen 1A289 med DNA från *B. subtilis*-stammen 1A221 och isolerar celler som inte producerar enzymet alfa-amylas.

10 2. Förfarande för framställning av *Bacillus subtilis*-stammen B1-109 (ATCC 39 701) med de genetiska markörerna spoIIA12, amyE och sacA321, k ä n n e t e c k n a t därav, att man transformerar kompetenta celler av den enligt patentkravet 1 framställda *B. subtilis*-stammen B1-20
15 med DNA från *B. subtilis*-stammen 1S30 och isolerar celler som växer utan tillsats av metionin, inte producerar enzymet alfa-amylas och inte bildar sporer efter en värmechockbehandling vid temperaturen 90 °C i 10 min.