

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 844375 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **844375**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **05.03.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **07.11.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.11.1984**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **05.03.1984 PCT/US1984/000341**
Internationell ansökan - International
application

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

09.03.1983 US 473820

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Cetus Corporation, 1400 53rd Street, Emeryville, CA 94608, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Chang, Shing, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Signaaliptidimuunnoksia.

Modifierade signalpeptider.

Signaali-peptidimuunnoksia

Keksintö liittyy molekyylibiologiaan ja tarkemmin sanottuna yhdistelmä-DNA-tekniikkaan. Erityisesti keksintö koskee menetelmiä muunnettujen signaali-peptidien tuottamiseksi sekä muunnettuja signaali-peptidejä, jotka ovat hyödyllisiä haluttaessa lisätä transformoituneiden isäntien heterologisten geenituotteiden erittymistä. Lisäksi keksintö koskee menetelmää yhdistelmä-DNA-sekvenssien tuottamiseksi in vivo.

Vaikka proteiinisynteesi tapahtuukin solunsisäisesti, toimivat jotkut proteiinit solun ulkopuolella. Näitä ekstra-sellulaarisia proteiineja nimitetään erittyneiksi proteiineiksi. Monet erittyvät proteiinit ilmentyvät ensin solun sisällä prekursori- eli esiproteiinimuodossa. Näiden esiproteiinien aminopäässä on jatke, jota nimitetään signaali- tai johtosekvenssiksi (tai signaali-peptidiksi). Signaali-sekvenssillä on oleellinen osuus siihen liittyneen peptidin kuljettamisessa solua rajaviin kalvoihin ja/tai niiden läpi.

Signaali-sekvenssiä koodittava DNA voidaan sisällyttää ilmentämisvektori-yhdistelmiin. Tällaisten vektorien käyttö tekee mahdolliseksi sopivien isäntäorganismien transformoinnin niin, että ne kykenevät tuottamaan heterologisia geenituotteita. Isäntäorganismit ovat usein bakteereita, koska bakteerit kasvavat kemiallisesti määritellyillä kasvualustoilla suhteellisen helposti. Organismit kasvavat nopeasti ja suuret tuotensaannot ovat mahdollisia. Kun sopivat isäntäorganismit transformoidaan tuottamaan haluttuja geenituotteita, on tällaiset geenituotteet usein helpompi havaita ja puhdistaa, jos ne erittyvät periplasmiseen tilaan tai kasvualustaan. Kun haluttu geenituotteet erittyvät kasvualustaan, vältetään tarve rikkoa organismit tuotteen talteenottamista varten. Lisäksi joillakin heterologisilla geenituotteilla on myrkyllinen vaikutus isäntäorganismeihin. Kun tällaiset heterologiset

geenituotteet erittyvät eivätkä keräännä isännän sisälle, eivät ne niin helposti häiritse solun normaaleja toimintoja.

Joissakin tapauksissa signaalisekvenssi katkaistaan irti proteolyytisesti erittymisen aikana tai sen jälkeen niin, että saadaan kypsä proteiini, joka irtoaa solua rajoittavista kalvoista, joiden läpi se on kulkenut. Toisissa tapauksissa signaalisekvenssi kyllä lohkeaa irti, mutta kypsä proteiini jää kiinni solukalvoon muiden muunnoksien seurauksena, jotka johtavat lipidin kovalenttiseen liittymiseen kypsän proteiinin aminopäähän. *Escherichia coli* lipoproteiinit ovat esimerkkejä tällaisista kalvoon sitoutuneista proteiineista; *E. coli* beeta-laktamaasi on esimerkki proteiinista, joka irtoaa kalvosta signaalisekvenssin lohkeamisen jälkeen ja tämän seurauksena beeta-laktamaasi erittyy *E. coli* periplasmiseen tilaan. Tällaisia erittyviä proteiineja kutsutaan eksoproteiineiksi. Jotkut muut proteiinit, kuten *Bacillus licheniformis*in beeta-laktamaasi, josta tässä käytetään myös nimitystä penisillinaasi, voidaan muokata kahteen erilaiseen kypsään proteiinimuotoon, joista toinen on erittyvä eksoproteiinimuoto ja toinen on kalvoon sitoutunut lipoproteiinimuoto. Penisillinaasin lipoproteiinimuodossa ensimmäiset 26 signaalisekvenssin kaikkiaan 34 aminohaposta näyttävät toimivan signaaliptidin varsinaisena kuljettajaosana. Jotkut tai kaikki jäljellä olevat 8 aminohappoa näyttävät eräiden karboksipään aminohappojen ohella kuuluvan signaaliptidin kuljetusosaan lipoproteiinimuodon muodostamisessa.

Vaikka asiaa ei täysin ymmärretäkään, näyttää mekanismi, jolla kypsä proteiini (lipoproteiini) sitoutuu solukalvoon, sisältävän lipidisidoksen muodostumisen kohtaan, joka on lähellä signaaliptidiä tai sen sisällä. Lipidin kiinnittyminen näyttää ankkuroivan proteiinin solukalvoon. Tiettyjen aminohapposekvenssien, jotka sijaitsevat alueella, jossa signaali-sekvenssit liittyvät kalvoon sitoutumaan kykeneviin kypsiin proteiinimuotoihin, uskotaan toimivan tunnistuskohtina solun

reagensseille, jotka osallistuvat kemiallisiin muunnoksiin, jotka johtavat kalvoon sitoutuneiden lipoproteiinien muodostumiseen. Näiden erityisten kemiallisten muunnosten uskotaan sisältävän rasvahappojen kovalenttisen sitoutumisen signaali-sekvenssiryhmiin.

Lipoproteiininmuodostusta edesauttamaan kykenevien signaali-sekvenssien hyödyllisyys voisi joissakin tapauksissa parantua, jos tunnistuskohtia voitaisiin muuntaa siten, että sitoutumattoman, periplasmiseen tilaan tai kasvualustaan erittyvän eksoproteiinin määrä kasvaisi. Tällainen muunnettu signaali-sekvenssi voisi tietysti johtaa muodostuvan, kalvoon sitoutuvan lipoproteiinin määrän pienenemiseen.

Tämän keksinnön tarkoituksena on parantaa bakteeri-isäntien kykyä erittää eräitä tuottamiaan peptidejä, jotka ovat joko bakteeriproteiineja tai tavallisemmin heterologisia peptidejä, jotka syntetisoituvat yhdistelmä-DNA-sekvensseillä tapahtuneen transformoitumisen seurauksena. On ollut mahdollista muuntaa villityyppisiä sekvenssejä, jotka koodittavat signaaliptidejä, joiden on tarkoitus olla liittyneinä näihin haluttuihin proteiineihin, jolloin seurauksena on signaalin tehon parantuminen näiden proteiinien siirtämisessä soluliman kalvon läpi kasvualustaan (Gram-positiivisten bakteerien ollessa kyseessä) tai periplasmiseen tilaan ja joissakin tapauksissa kasvualustaan (Gram-negatiivisten bakteerien ollessa kyseessä). Tässä käytetään hyödyksi villityyppisiä signaali-sekvenssejä, jotka luonnostaan kykenevät kuljettamaan solun proteiinit kalvolle ja auttamaan liittyneen proteiinin sitoutumisessa tällaiseen kalvoon lipoproteiinina. Kun säilytetään kyky siirtää haluttu proteiini kalvolle, mutta vahingoitetaan kykyä auttaa kalvoon sitoutumisessa, saadaan signaalista tehokkaampi erittymisen aiheuttaja.

Näin ollen tämän keksinnön yksi toteutustapa koskee DNA-sekvenssiä, joka koodittaa parannettua, uutta "eksosignaali-peptidiä", jonka aminohapposekvenssissä on aminohappo X

vastaavan villityyppisen signaaliipeptidin kysteiinitähteen paikalla; ja mainittu villityyppinen signaaliipeptidi a) kykenee muodostamaan kalvoon sidottuja lipoproteiineja ja b) sisältää apualueen, jossa on yksi ainut kysteiini; ja X ei toiminnallaan saa aikaan kalvoon sitoutuneen lipoproteiinin muodostumista; ja X:n korvaama kysteiini on juuri se, joka sijaitsee apualueessa b).

Edelleen keksintö koskee DNA-sekvenssejä, jotka koodittavat yhteenliittyneitä peptidejä, joissa on haluttu proteiini toiminnallisesti liittyneenä eksosignaaliipeptidiin, ilmentämisvektoreita, jotka kykenevät saamaan aikaan näiden yhteenliittyneiden peptidien tuotannon, näillä vektoreilla transformoituneita soluja ja näitä transformoituneita soluja viljelemällä aikaansaatuja eksosignaaliipeptidejä ja yhteenliittyneitä peptidejä.

Keksintö koskee myös menetelmiä erittymisen parantamiseksi käyttämällä keksinnön mukaisia koodittavia sekvenssejä, vektoreita ja transformoituneita organismeja sekä uutta menetelmää DNA-sekvenssin muuntamiseksi in vivo-yhdistelemisellä.

Kuva 1 on kodonikaavio, joka esittää kysteiini₂₇ → seriini₂₇-mutaation aikaansaamista;

kuva 2 on nukleotidikaavio, joka esittää plasmidiperhettä, jossa on edulliset restriktioentsyymien tunnistuskohdat penP-promoterin ja signaaliisekvenssin vieressä;

Kuva 3 on kodonikaavio, joka kuvaa pSYC748:n rakentamista heterokahdenteen muodostamisella ja in vivo-yhdistelemisellä.

Kuva 4 esittää plasmidin pSYC709 oleellisia piirteitä.

Kuva 5 esittää keksinnön mukaisten vektorien vastaavia kodoni- ja aminohappojärjestyksiä, jotka sisältävät haluttuna proteiinina toimivaa kypsää penP-proteiinia (suuri eksopenisillinaasi) koodittavan sekvenssin.

Kuva 6 on keksinnön mukaisten vektorien vastaavia kodoni- ja aminohappojärjestyksiä, jotka sisältävät haluttuna proteiinina toimivaa kypsää hGH-proteiinia koodittavan sekvenssin.

Tässä selostuksessa käytetään termejä signaali-peptidi, johto-peptidi, signaalisekvenssi ja johtosekvenssi samassa merkityksessä. Näillä sanonnoilla tarkoitetaan proteiinien aminopään jatkeita, jotka aiheuttavat proteiinin kulkeutumisen solukalvoon tai sen läpi.

Yleisesti ottaen tällaisille sekvensseille on ominaista N-päässä oleva hydrofiilinen, joskus varauksen sisältävä aminopään sekvenssi, jota seuraa "hydrofobinen ydin", joka sisältää 10-25 suurimmaksi osaksi neutraalia ja hydrofobista aminohappoa, ja mahdollisesti karboksipäässä oleva lisäsekvenssi liittyyneenä proteiiniin, joka on tarkoitus erittää. Hydrofobisen ytimen C-pään lähellä ja hydrofobisen pään sisällä oleva lyhyt aminohapposarja näyttää auttavan lipoproteiinin kalvoon sitoutumista. Keksinnön mukaisissa "eksosignaali-peptideissä" korvattu kysteiinitähde on tässä "apusekvenssissä"; muita villityyppisen signaalisekvenssin kysteiinitähteitä ei tarvitse korvata tällä tavalla keksinnön mukaisissa "eksosignaali-peptideissä".

Halutun proteiinin erittyminen vaatii sen N-pään lähellä olevaa katkaisukohtaa. Yleensä uskotaan, että tällainen katkeaminen tapahtuu alaniinitähteen jälkeisessä kohdassa, ja että tosiasiassa katkeaminen edellyttää alaniinitähteen läsnäoloa. Tätä ei kuitenkaan ole todistettu, joten mikä tahansa halutun proteiinin N-pään lähellä oleva aminohapposekvenssi, joka sallii katkeamisen, on käyttökelpoinen keksinnön mukaisissa eksosignaali-peptideissä.

"Eksosignaali-peptidi" (tai eksosignaalisekvenssi) on signaali-peptidi, joka kykenee saamaan aikaan polypeptidin tai proteiinin erittymisen, joka proteiini on jatkeena signaali-peptidin C-päässä. Jokainen tämän keksinnön mukainen eksosignaali-peptidi on sukua vastaavalle villityyppiselle signaali-peptidille siten, että villityyppisen sekvenssin sisältämä kysteiinitähde on korvattu muulla aminohapolla. "Vastaavat villityyppiset" signaali-peptidit, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä,

ovat sellaisia, joita löytyy bakteerisysteemeistä, jotka kykenevät liittämään toimivasti sitoutuneen polypeptidin tai proteiinin kalvoon sitoutuneeksi lipoproteiiniksi. Tällainen vastaava villityyppinen signaalipeptidi on *B. licheniformis*-penisillinaasin johtosekvenssi.

On ymmärrettävää, että villityyppisissä sekvensseissä, joita tämän keksinnön eksosignaalsekvenssit vastaavat, on pieniä vaihteluita pituudessa ja aminohappokoostumuksessa, jotka johtuvat lajikohtaisista eroista, mutaatioista (tarkoituksella aikaansaadut ja spontaanit), luentavirheistä tms. Näin ollen "villityyppiset sekvenssit" eivät välttämättä rajoitu niihin tarkoin tiedettyihin aminohappojärjestyksiin, jotka on julkaistu eri bakteerikannoille, vaan ne kattavat kaikki mahdolliset samankaltaiset sekvenssit, joissa oleellisesti ottaen on jäljellä villityyppisen sekvenssin aktiivisuus.

Kuten edellä on mainittu, nämä villityyppiset sekvenssit sisältävät "apualueen", joka näyttää olevan yhteydessä liittyneen peptidin kalvoon sitoutumisen kanssa. Esimerkiksi *B. licheniformis*-penisillinaasisignaalisissa on aminohapposarja Leu-Ala-Gly-Cys signaloidun prekursorin asemassa 23-27 ja signaloidusta prekursorista johtuva kalvoon sitoutunut proteiini alkaa edeltävästä kysteiinistä (kun taas vastaava eksoproteiini alkaa asemasta 35). Tämä alue, joka on välittömästi vieressä ja osittain sisältää syntyneen kalvoon sitoutuneen proteiinin, näyttää auttavan kalvoon sitoutumista. Juuri tämän alueen kysteiinin korvaaminen on tarpeen, jotta saadaan keksinnön mukainen proteiini.

"Vastaavalla" tarkoitetaan oleellisesti ottaen analogista, mutta ei välttämättä identtistä. Keksinnön mukaisilla eksosignaali-peptideillä, joissa jokaisessa on "vastaavan" villityyppisen signaalipeptidin vastaavan kysteiinitähteen tilalla muu aminohappotähdde, on huomattava homologia villityyppisen signaalin kanssa (lukuunottamatta Cys-tähdettä), mutta ne voivat

olla hieman lyhempiä tai pitempiä tai sisältää muita muunnoksia, kunhan vain sopiva katkaisukohta halutun proteiinin irtoamista varten on läsnä.

Tässä selostuksessa kuvatut rakentamisratkaisut osoittavat, että keksinnön mukaisesti eksosignaaliptideihin voidaan tehdä lisämuunnoksia, jotka eivät tuhoa näiden peptidien käyttökelpoisuutta halutun proteiinin erittymisen aikaansaamisessa. Tällaisia peptidejä voidaan muuntaa esim. poistamalla aminohapot, jotka ovat analogisia vastaavan penP-sekvenssin aminohapoille 29-34; liittämällä Pro-Asp-dipeptidi niiden aminohapojen väliin, jotka ovat analogisia vastaavan penP-johtosekvenssin aminohapoille 23 ja 24; liittämällä Ala halutun proteiinin N-pään eteen; tai korvaamalla vastaavan penP-johtosekvenssin asemassa 28 oleva Ala-tähde Pro-tähteellä; tai aikaansaamalla jokin näiden yhdistelmä.

Tässä käytetyllä termillä "penP" tarkoitetaan *B. licheniformis* kannan 749/C prepenisillinaasigeeniä tai sen oleellista osaa, mikä yhteydestä käy selvästi ilmi. PenP:n nukleotidisekvenssi on esitetty julkaisussa Kroyer, J., ja Chang, C., *Gene* 15:343-347 (1981), ja Neugebauer, K., Sprengel, R., ja Schaller, H., *Nucleic Acids Research* 9:2577:2589 (1981).

Tässä tai liittyvässä asiayhteydessä käytetyllä termillä yhteenliitetty peptidi tai yhteenliitetty proteiini tarkoitetaan polypeptidiä tai proteiinia, jossa on signaalisekvenssi tai sen osa haluttuun proteiinisekvenssiin liittyneenä. Nimitystä yhteenliitetty peptidi tai yhteenliitetty proteiini käytetään samassa merkityksessä. Tässä käytetyllä termillä haluttu proteiini tarkoitetaan polypeptidiä tai proteiinia, jota prokaryoottinen isäntä tuottaa tultuaan transformoiduksi yhdistelmävektorilla, joka sisältää polypeptidiä tai proteiinia koodittavan DNA-sekvenssin. Tällainen proteiini saattaa olla tämän tai muun prokaryoottisen organismin muutenkin tuottama tai se saattaa olla heterologinen.

Tässä käytetyllä sanonnalla "kalvoon sitoutuminen" tarkoitetaan kiinnittymistä kalvolle tai kalvon sisälle.

Tässä käytetyllä merkinnällä "hGH" tarkoitetaan ihmisen kasvuhormonia; "IL-2" tarkoittaa mistä tahansa lähteestä peräisin olevaa interleukiini-2:ta.

"Johdannaisplasmideilla" tarkoitetaan yhdistelemisen aikana tuotettuja jälkeläisiä. Tällaisen yhdistelemisen seurauksena syntyneiden johdannaisplasmidien ei välttämättä tarvitse olla toiminnallisesti ekvivalentteja niiden muodostamisessa käytettyjen kantaplasmidien kanssa.

"Toimivasti liitettyllä" tarkoitetaan kyseisten sekvenssien asettamista rinnakkain niin, että niiden normaalit toiminnot säilyvät. Niinpä koodittaviin sekvensseihin toimivasti liitetyt promoterit tai ohjaussekvenssit saavat aikaan kodonien transkription ja luennan; haluttuihin proteiineihin toimivasti liitetyt signaalsekvenssit saavat aikaan haluttujen proteiinien erittymisen tai kalvoon kiinnittymisen. Haluttuihin peptideihin toimivasti liittyneet eksosignaalit saavat aikaan haluttujen peptidien erittymisen.

Tässä tarkoitetaan "kodonilla" yhtä hyvin (i) mRNA:n ribonukleotiditriplettiä, joka luetaan polypeptidin aminohapoksi, tai joka koodittaa luennan aloitusta tai lopetusta, tai (ii) geenin deoksiribonukleotiditriplettiä, jonka komplementaarinen tripletti transkriboidaan mRNA:n ribonukleotiditriplettiksi, joka puolestaan luetaan polypeptidin aminohapoksi, tai joka koodittaa luennan aloitusta tai lopettamista. Näin ollen esim. 5'-TCC-3' ja 5'-UCC-3' ovat kumpikin seriinin "kodoneja", kun termiä "kodoni" käytetään näin määritellysti.

Tässä käytetyillä sanonnoilla "nukleotidi", "deoksinukleotidi" ja "deoksiribonukleotidi" tarkoittavat kaikki deoksiribonukleotidiä.

dNTP tai NTP tarkoittaa mitä tahansa deoksiribonukleotiditri-fosfaattia eli ATP:tä, GTP:tä, CTP:tä tai TTP:tä.

"bp" tarkoittaa emäsparia ja "kbp" tarkoittaa kiloemäsparia.

"Polypeptidi" tarkoittaa mitä tahansa peptidiä, jossa on kaksi tai useampia aminohappoja, proteiinit mukaanluettuina.

"Koodittava sekvenssi" tai "koodittava DNA-sekvenssi" tarkoittaa polypeptidiä koodittavaa DNA-sekvenssiä.

Tässä keksinnössä käytetyissä menetelmissä sovelletaan geenitekniikkaa ja molekyylikloonausta. Yleinen selostus geenitekniikasta ja molekyylikloonauksesta löytyy teoksista Maniatis, T., Fritsch, E.F., ja Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), ja *Methods in Enzymology*, Volume 68, *Recombinant DNA*, (Wu, R., editor), Academic Press, New York, 1979.

Näiden menetelmien käyttö tarjoaa keinon tuottaa muunnettuja (eksignaali) peptidisekvenssejä, jotka on johdettu villityyppisistä signaali-peptidisekvensseistä, jotka viimeksimainitut kykenevät muodostamaan kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja. Tässä käytetyllä sanonnalla johdettu tarkoitetaan myös mutatoituneita tai synteettisiä signaalsekvenssejä, jotka vastaavat villityyppisiä signaalsekvenssejä. Villityyppiset sekvenssit sisältävät apualueen, joka on lähellä hydrofobisen ydinalueen karboksipäätä, kuten edellä on selostettu. Tässä apualueessa on yksi kysteiiniryhmä, jonka läsnäolo on tarpeen kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostumiselle. Keksinnön mukaisissa, eksignaali-peptidejä koodittavissa DNA-sekvensseissä kysteiinin kodoni on korvattu muun aminohapon kuin kysteiinin kodonilla, joka aminohappo ei toimi kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostajana.

Tämä keksintö koskee tällaisia muunnettuja "eksignaali-peptidejä", jotka vastaavat villityyppisiä signaalsekvenssejä,

jotka villityyppiset signaalisekvenssit kykenevät muodostamaan kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja. Tällaisia villityyppisiä sekvenssejä ovat mm. luonnossa esiintyvien prokaryoottien kyseiset sekvenssit ja niiden toiminnalliset ekvivalentit. Kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja muodostavista villityyppisiä sekvenssejä ovat esim. *B. licheniformis*-penisillinaasin signaalisekvenssit, *E. coli*-lipoproteiinin (lpp-geenituote) signaalisekvenssit, *Bacillus cereus*-penisillinaasi III:n signaalisekvenssit ja *S. aureus*-penisillinaasin signaalisekvenssit. *B. licheniformis*-penisillinaasin signaalisekvenssit ovat erityisen edullisia keksinnön toteutuksessa tuotettaessa ekso-signaalipeptidisekvenssejä. Kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja muodostamaan kykenevien villityyppisten signaalipeptidien ja tämän keksinnön mukaisten vastaavien eksosignaali-peptidien uskotaan sisältävän apualueita tai -sekvenssejä. Esimerkiksi penP-proteiinin tällaisessa sekvenssissä on aminohapot Leu-Ala-Gly-Cys aminohappoasemissa 24-27. Tämä kysteiinitähteen ympärillä oleva apusekvenssi sallii kysteiinin ottaa osaa kovalenttisten sidosten muodostamiseen, jotka sitovat rasvahapot peptidiosaan. Tämä sama neljän aminohapon sekvenssi Leu-Ala-Gly-Cys löytyy useista signaalipeptideistä, jotka kykenevät muodostamaan kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja.

Keksinnön mukaiset eksosignaali-peptidit muodostetaan korvaamalla apuaminohapposekvenssin sisältämän kysteiinin kodoni muun aminohapon kuin kysteiinin kodonilla koodittavassa DNA-sekvenssissä niin, että mainittu muu aminohappo ei toimi kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostajana. Edullisia kodoneja ovat sellaiset, jotka koodittavat alle 3 hiiliatomia sisältäviä neutraaleja sivuketjuja kantavia aminohappoja. Erittäin edullista on korvata kysteiiniä koodittava kodoni seriinin kodonilla. DNA-nukleotidin korvaaminen voidaan suorittaa alan ammatti-ihmisten tuntemilla tavoilla. Tällaista menetelmää on selostettu mm. US-patenttijulkaisussa 4 351 901. Vielä edullisempi nukleotidinkorvausmenetelmä on priimerillä ohjattu mutatointi. Ks. Zoller, M. J., ja Smith, M., Nucleic

Acids Research, 10:6487-6500 (1982). Käytettäessä edullista priimerillä ohjattua mutatoitimenetelmää määritetään aminohappoketjua koodittava DNA-sekvenssi alueelta, joka ympäröi signaaliipeptidiä ja sisältää korvattavan kysteiinin, ja tämän sekvenssin perusteella syntetisoidaan noin 10-25 nukleotidia sisältävä palanen käyttämällä alan ammatti-ihmisten tuntemia menetelmiä. Näihin menetelmiin kuuluu fosfotriesterimenetelmä, jota on selostettu julkaisussa Narang, S.A., Hsiung, H.M., ja Brousseau, R., *Methods in Enzymology*, 68:90-98, (Wu, R., editor), Academic Press (1979); mutta vielä edullisempaa on käyttää menetelmää M. Matteucci ja M. Caruthers, *J. Amer. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981). Kaikkein edullisinta on suorittaa synteesi automaattisella syntetisaattorilla, jollainen on esim. Model Sam One, jota valmistaa Biosearch Inc., San Rafael, Kalifornia.

Synteettinen nukleotidijakso on parikki yhdelle signaaliipeptidiä koodittavalle DNA-sekvenssin säikeelle korvattavan kysteiinin alueella ja toimii priimerinä muunnettua signaaliipeptidiä koodittavan täyspitkän sekvenssin synteessissä. Tarkemmin sanottuna, eräässä toteutustavassa, jossa edullista penP-signaalisekvenssiä käytetään muunneltavana signaalisekvenssinä, synteettinen DNA-jakso vastaa 5 aminohappoa, jotka ovat asemassa 25-29, paitsi, että synteettisen priimerin keskimmäinen kodoni sisältää epäparisen nukleotidin, joka ei täydennä vastaavaa nukleotidia penP-templaattissa. Kun käytetään muita villityyppisiä signaalisekvenssejä kuin penP:tä, kuten *S. aureus*-penisillinaasin signaalisekvenssiä [McLaughlin et al., *J. Biol. Chem.* 256, 11283-11291 (1981)], synteettinen priimeri sisältää epäparisia nukleotideja, jotka eivät täydennä villityyppisiä nukleotideja kysteiinikodonin alueella, joka kodoni siis on tarkoitus muuntaa näitä signaalisekvenssejä koodittavassa DNA-sekvenssissä.

Villityyppisen penP-signaalisekvenssin DNA-sekvenssi sisältää kodonin (TGC), joka koodittaa kysteiiniä aminohappoasemassa 27.

Kun muunnettu penP-signaalisekvenssi sisältää seriinin amino-happoasemassa 27, sisältää synteettinen jakso TCC-sekvenssin vastaavassa asemassa, ja näin ollen se koodittaa seriiniä eikä kysteiiniä. Keksinnön käytännön toteutuksessa eristetään muunnettava villityyppinen signaalisekvenssi sen sisältävästä organismista tai plasmidista. Villityyppinen penP-signaali-sekvenssi voidaan eristää plasmidista kuten pOG2165:stä sopivia restriktioentsyymejä käyttämällä. Plasmidia pOG2165 on selostettu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa O 036 259. Vielä edullisempaa on eristää jakso plasmidista pSYC310-2. Ensin villityyppistä signaalisekvenssiä koodittavan ketjun sisältävä DNA-sekvenssi puhdistetaan ja sen jälkeen jakso liitetään yksisäikeisen DNA-faagin replikoituvaan muotoon (RF = replicative form), jollainen on esim. kolifaagi M13mp9. Ks. Zoller ja Smith (1982), supra, Viera, J., ja Messing, J., Gene, 19:259-268 (1982), ja Messing, J. ja Viera, J., Gene, 19:269-276 (1982). M13mp9 ja sille läheistä sukua oleva M13mp8 ovat saatavissa firmasta Bethesda Research Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland. E. coli JM101 tai E. coli JM103 transformoidaan yhdistelmäkolifaagi-DNA:lla, jonka jälkeen soluja viljeltäessä saadaan faagia, jossa on yksisäikeinen DNA. Yksisäikeinen DNA eristetään. Epäparista nukleotidia kantava synteettinen nukleotidijakso, joka on 5'-fosforyloitu käyttämällä ATP:tä ja T4-polynukleotidikinaasia (ks. Maniatis et al., supra, s. 123), liitetään pariaksi templaattina toimivaan yksisäikeiseen faagi-DNA:han, jossa on villityyppinen penP-johtosekvenssi. Sitten tätä pariaksi yhteenliitettyä synteettistä jaksoa käytetään priimerinä aloittamaan komplementaarisen DNA-säikeen synteesi in vitro. Komplementaariset (miinus) säikeet syntetisoidaan priimerinpidennysreaktiolla käyttämällä E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta faagi-DNA-templaattilla. T4 DNA-ligaasin ollessa läsnä tässä reaktiossa muunnetaan osa DNA-molekyyleistä kaksisäikeisiksi, kovalenttisesti suljetuiksi hölleiksi renkaiksi. Nämä molekyylit erotetaan muista molekyyleistä, jotka olivat joko polymeraasin epätäydellisesti pidentämiä tai eivät olleet liittyneet yhteen

priimerin epätäydellisestä kinaasireaktiosta johtuen. Molekyylit erotetaan agarosigeelielektroforeesilla tai alkalisella sakkarosigradienttisentrifugoinnilla [Zoller ja Smith (1982), *supra*]. Sitten *E. coli*-solut, mielellään *E. coli* JM103 transformoidaan puhdistetulla, kovalenttisesti sulkeutuneella, kaksisäikeisellä DNA:lla. Tunnistetaan ja eristetään transformantit, jotka kantavat faageja, joissa on muunnettuja signaalisekvenssejä sisältävää proteiinia koodittava geeni. Se, että kaksisäikeinen faagi-DNA sisältää halutun mutaation signaalisekvenssissä, voidaan varmistaa analysoimalla mutaatiosta aiheutuva lisää tullut tai menetetty restriktioendonukleasiin katkaisukohta, määrittämällä odotetun mutaation sisältävän alueen DNA-sekvenssi tai suorittamalla DNA-oligonukleotidi-hybridisaatio käyttämällä radioaktiivisesti merkatussa muodossa olevaa mutatoinnissa käytettyä synteettistä oligonukleotidipriimeriä koettimena. Ks. Zoller ja Smith, (1982) *supra*. Se faagin jakso, joka sisältää geenin, jossa on signaalisekvenssissä tapahtunut mutaatio kysteiinistä seriiniksi, leikataan irti mielellään siten, että faagi katkaistaan restriktioentsyymeillä. Puhdistuksen jälkeen jakso kloonataan sopivaan kloonausvektoriin siten, että tällä palalla korvataan jakso, joka aikaisemmin oli kloonattu tähän plasmidiin, ja joka sisälsi villityyppisen geenin ilman signaalisekvenssissä olevaa mutaatiota.

Ellei toisin ole ilmoitettu, suoritettiin kaikki DNA-jaksojen eristämiset "geelieluutiolla" akryyliamidigeeleillä käyttämällä oleellisesti ottaen menetelmää Maniatis et al. (1982) *supra*, s. 164, mutta korvaamalla agarosii akryyliamidilla.

Ellei toisin ole ilmoitettu, tarkoittaa "T4-ligaasi" T4 DNA-ligaasia.

Ellei toisin ole ilmoitettu suoritetaan kaikki *E. coli* transformoinnit menetelmällä Cohen et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 69, 2110 (1973) ja kaikki *B. subtilis*-kantojen transformoinnit

menetelmillä Anagnostopoulus ja Spizizen J. Bacteriol., 81, (1961).

Ellei toisin ole ilmoitettu on restriktioentsyymit ja muut mainitut entsyymit saatu firmoista New England Biolabs (Beverly, Massachusetts) tai Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, Maryland) ja niitä on käytetty tuottajan antamien ohjeiden mukaisesti.

Keksinnön mukaisella menetelmällä tuotetut eksosignaali-peptidit sisältävät aminohapon X eli muun aminohapon kuin kysteiinin apualueen sisältämän kysteiinin tilalla. Erityisen edullinen on muunnettu B. licheniformis-penisillinaasin (penP) signaali-sekvenssi, jossa on seriini signaali-peptidisekvenssin aminohappoasemassa 27. Aminohappoasemassa 27 oleva seriini korvaa kysteiinin, joka on alkuperäisessä villityyppisen B. licheniformis penP-signaali-sekvenssin apualueessa Leu-Ala-Gly-Cys, joka ulottuu aminohappoasemien 24-27 yli. Edullinen on myös sellainen muunnettu penP-signaali-sekvenssi, joka sisältää alaniinin aminohappoasemassa 27 korvaamassa kysteiinin, joka on tässä asemassa villityyppisessä B. licheniformis penP-signaali-sekvenssissä.

Lisäksi keksintö sisältää menetelmän DNA-emäsekvenssin heterokahdentamiseksi, jonka jälkeen seuraa yhdisteleminen in vivo. Kaksi kantaplasmidia, jotka ovat rakenteeltaan oleellisesti ottaen homologisia lukuunottamatta eräitä osia, muunnetaan suljetuista rengasrakenteista avoimiksi tylppäpäisiksi lineaarisiksi muodoiksi hajottamalla kumpikin restriktioentsyymillä, joka leikkaa käsiteltävän plasmidin vähintään 20 bp:n päästä toisen plasmidin katkaisukohdasta lukien, kun mitataan analogisista kohdista, ja tylpät päät tehdään 5'-nukleaasilla. Saatu tylppäpäinen, lineaarinen, kaksisäikeinen DNA erotetaan ja sen annetaan liittyä yhteen ja muodostaa uudestaan satunnaisesti renkaita niin, että syntyy heterokahdenteita, jotka voivat sisältää yksisäikeisiä DNA-sekvenssi-osia, jotka vastaavat kyseisten kahden kantaplasmidin eri

DNA-sekvenssiosia. Koska kantaplasmidien pilkkomisessa käytetyt entsyymit leikkaavat analogisten kohtien sivusta, on heterokahdenteissa näitä siirtymiä vastaavia lomittaisia päitä, ja näin ollen ne voivat muodostaa renkaita. Homokahdenteilla ei ole lomittaisia päitä ja näin ollen ne eivät voi muodostaa renkaita. Sitten nämä heterokahdenteet siirretään transformoitavissa oleviin isäntiin ja transformoitavissa olevien isäntien annetaan saada aikaan uudelleenrengastuneiden heterokahdenteiden DNA-sekvenssiosien yhdisteleminen *in vivo*, jolloin ne tuottavat johdannaisplasmideja, jotka sisältävät kyseisten kahden kantaplasmidin kantamien eri DNA-sekvenssiosien yhdistelmiä. Sitten yhdistelmäplasmidit seulotaan sellaisten johdannaisplasmidien suhteen, joissa on haluttuja yhdistelmiä, ja näillä transformoidaan tarkoitukseen sopivat isäntäorganismit.

Hieman tarkemmin sanottuna käytetään keksinnön tässä toteutustavassa kantaplasmidiparia. Kantaplasmidit ovat huomattavassa määrin rakenteeltaan homologisia toistensa kanssa, mutta kummassakin on analogisessa kohdassa hieman toisistaan poikkeava DNA-sekvenssi. Esimerkiksi kantaplasmidi (A) saattaa sisältää sekvenssin (y), joka koodittaa haluttua geenituotetta. Kantaplasmidin (A') sekvenssi on huomattavassa määrin homologinen kantaplasmidin (A) kanssa, mutta se sisältää eri sekvenssin (z), joka on analogisessa asemassa (y):hyn verrattuna. Plasmidit (A) ja (A') linearisoidaan kumpikin restriktioentsyymillä. Katkaisukohdat valitaan siten, että ne ovat vähintään 20 bp:n päässä analogisista kohdista kummassakin plasmidissa. Jos restriktioentsyymeillä suoritettu katkaisu jättää yksisäikeiset päät, tehdään päistä tylppiä yhden säikeen suhteen spesifisellä nukleaasilla, kuten S1:llä, tai suoritetaan korjausreaktio esim. käyttämällä *E. coli* DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta ja tarvittavia dNTP-substraatteja, jotta homokahdenteiden renkaanmuodostus vältetään. Sitten muodostetaan kahdennemolekyylit sulattamalla ja yhteenliittämällä. Homokahdennemolekyylit sisältävät DNA-säikeitä vain kantaplasmidista

(A) tai kantaplasmidista (A')). Heterokahdennemolekyylit sisältävät DNA-säikeen kantaplasmidista (A) ja DNA-säikeen kantaplasmidista (A') ja muodostavat renkaan, koska kyseisten kahden katkaisukohdan välillä on lomittaiset päät. Rengasmuodossa ne kykenevät transformoimaan isäntäsoluja tehokkaasti. Homokahdennemolekyylit eivät transformoi isäntäsoluja tehokkaasti, koska ne eivät kykene muodostamaan renkaita; niiden tylpät yhteenkuuluvat päät eivät liity yhteen. Erikoislaatuiset sekvenssit, kuten (y) ja (z), jotka ovat heterokahdentaiden kussakin kantasäikeessä (huonosti yhteensopivat säikeet), voidaan selektiivisesti sisällyttää tai poistaa johdannaisplasmideista transformoituneessa solussa in vivo tapahtuvan korjaustoiminnan tuloksena. Nämä in vivo-korjausprosessit poistavat roikkuvia häntiä, täyttävät aukkoja, poistavat silmukoi- ta ja korjaavat vääriä nukleotideja. Lisäksi kantaplasmidien välillä olevia vastingeenien eroista johtuvia epäparisia sekvenssejä voidaan sisällyttää johdannaisplasmideihin yhtä hyvin.

Tällä keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan tuottaa uusia yhdistelmäsekvenssejä plasmideissa in vivo tarvitsematta turvautua pelkästään restriktiopalasten suoraan yhteenliittämiseen in vitro. Keksinnön tämän toteutustavan edullisessa suorituksessa valitaan kantaplasמידiksi sellaiset, joissa on riittävä sekvenssihomologia, jotta toisen plasmidin yksisäikeiset DNA:t voivat liittyä toisen plasmidin yksisäikeisiin DNA-jaksoihin. Kumpikin kantaplasמידi sisältää ainutlaatuisia sekvenssejä, joita toisessa kantaplasמידissa ei ole. Kantaplasמיד-DNA:t eristetään alan ammatti-ihmisten tuntemilla menetelmillä. Tällaisia menetelmiä ovat mm. keesiumkloridi-gradientit ja pienimittakaavainen menetelmä, joka on esitetty julkaisussa Ish-Horowicz, D., ja Burke, J.R., *Nucleic Acids Research* 9:2989-2998 (1981). Kumpikin kantaplasמידi katkaistaan sopivalla restriktioentsyymillä. Alan ammatti-ihmiset tuntevat hyvin näiden entsyymien käytön. Tällaisia entsyymejä on saatavissa esim. firmoista New England Biolabs tai Bethesda Research Laboratories ja niitä käytetään tuottajan ohjeiden mukaisesti.

Heterokahdenteiden valmistamiseksi käsitellään linearisoitu plasmidi-DNA, jos se sisältää yksisäikeisiä, ulostyöntyviä päitä, entsyymillä, kuten S1-nukleasilla sopivassa puskurissa, jotta saadaan hajotetuiksi yksisäikeiset hännät, jotka saattavat johtua restriktioentsyymeillä tapahtuneesta katkaisusta, ja näin saadaan homokahdenteiden uudelleentapahtuva renkaanmuodostus vältetyksi. S1-nukleasikäsittelyn jälkeen plasmidi-DNA uutetaan ja saostetaan. Sitten plasmidi-DNA suspendoidaan uudestaan sopivaan liittämispuskuriin. Kanta-DNA-laatuja sisältävää liuosta kuumennetaan aika, joka riittää erottamaan DNA-säikeet toisistaan. Sitten kuumennetun liuoksen annetaan hitaasti jäähtyä huoneen lämpötilaan, jotta erottuneet DNA-säikeet voivat liittyä yhteen toistensa kanssa ja muodostaa renkaita. Säikeiden erottamisessa ja yhteenliittämisessä voidaan käyttää muitakin menetelmiä kuin kuumennusta ja jäähdytystä, kuten pH:n alentamista ja nostamista ja pH:n palauttamista sen jälkeen neutraaliksi. Yhteenliittämisen ja renkaanmuodostuksen jälkeen käytetään DNA:ta transformointikelpoisen isännän transformointiin. Vain renkaitamuodostavat heterokahdenteet pystyvät transformoimaan merkittäväällä taajuudella. Heterokahdennemolekyyleissä olevat roikkuvat päät (joita syntyy lomittaisten päiden ei-homologisista jatkeista) ja yksisäikeiset aukot poistuvat tai korjautuvat transformoituneissa soluissa in vivo. Tämä in vivo-yhdisteleminen johtaa uusien yhdistelmäplasmidijohdannaisten muodostumiseen. Vastin-geenien eroista johtuvia kantaplasmidien välisiä epäparisia sekvenssejä voidaan myös sisällyttää yhdistelmäplasmidijohdannaisiin suurella taajuudella, kun käytetään tämän keksinnön mukaista heterokahdennetransformointimenetelmää. Haluttuja yhdistelmäplasmidijohdannaista kantavat klooneit eristetään. Yhdistelmäplasmidijohdannaiset eristetään ja niillä transformoidaan transformointikelpoiset isännät.

Seuraavissa esimerkeissä esitetään tämän keksinnön yksityiskohtaisia toteutustapoja. (Nämä esimerkit on tarkoitettu vain selventäviksi, eivätkä ne rajoita liitteessä olevien patenttivaatimusten kattamaa alaa millään tavalla.)

Pois

Esimerkki 1

Poistumamutaation aikaansaaminen aminohappoasemiin 23-27

B. licheniformis 749/C-penisillinaasin signaalisekvenssissä

B. licheniformis-penisillinaasin (penP) geenin DNA-sekvenssi tunnetaan. Ks. Kroyer, J., ja Chang, S., Gene 15:343-347 (1981) ja Neugebauer, K., Sprengel, R., ja Schaller, H., Nucleic Acids Research 9:2577-2589 (1981). DNA-sekvenssistä ilmenee, että penP-geenissä on vain kaksi HhaI-tunnistukohtaa (GCGC), jotka ovat 23. aminohapon kodonissa (yhdessä 24. aminohapon ensimmäisen nukleotidin kanssa) sekä 27. aminohapon kaksi viimeistä nukleotidia yhdessä 28. aminohapon kahden ensimmäisen nukleotidin kanssa. Nämä kaksi penP-geenin HhaI-kohtaa ovat asemassa 24-27 olevan Leu-Ala-Gly-Cys-sekvenssin vieressä, jossa asemassa 27 olevan Cys:n rikki on muunnettu glyseridillä entsyymin kalvoon sidotussa muodossa. Tämä sama leu-ala-gly-cys-sekvenssi, jossa Cys on muunnettu glyseridillä kalvoon sidotussa muodossa, löytyy useiden lipoproteiinien signaalipeptideistä. S. aureus PC1:llä on samanlainen Leu-Ser-Ala-Cys-sekvenssi, jossa Cys on glyseridillä muunnettu kalvoon sidotussa muodossa, ks. Nielsen ja Lampen, J. Biol. Chem., 257, 4490-4495 (1982).

Tietämättä, olisivatko sellaiset solut eläviä, jotka ilmentävät mutatoitunutta penP-geeniä, jossa on tämän sekvenssin kattava mutaatio, päätettiin aluksi saada aikaan tämä poistumamutaatio promoterittomaan penP-geeniin. Tämä oli mahdollista käyttämällä plasmidia pSYC423, joka replikoituu sekä E. coli-että B. subtilis-soluissa. Plasmidin pSYC423 rakentaminen plasmidista pSYC310-2 on selostettu julkaisussa McLaughlin et al., Nucl. Acids Research, 10, 3905-3918 (1982). Plasmidissa pSYC423 on täydellinen B. licheniformis penP:tä koodittava sekvenssi, mutta siitä puuttuu tämän promoteri. penP-sekvenssi sijaitsee plasmidissa pSYC423 siten, että jakson päissä on EcoRI- ja BamHI-kohta. Tämä plasmidi pSYC423, joka sisältää monia muita HhaI-kohtia EcoRI:hin ja BamHI:hin rajoittuvan jakson ulkopuolella, pilkottiin ensin HhaI-entsyymillä ja

ulospäin työntyvät 3'-päätt tehtiin tylpiksi käyttämällä *E. coli* DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta neljän deoksiribonukleotiditrifosfaatin läsnäollessa. Nämä menetelmät ovat ennestään tunnettuja alan ammatti-ihmisille ja niitä on selostettu esim. teoksessa Maniatis, T., Fritsch, E.F., ja Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Plasmidista pSYC423 saadut tylppäpäiset HhaI-palaset pilkottiin vielä entsyymeillä EcoRI ja BamHI. Nämä entsyymit saatiin New England Biolabs-firmasta (Beverly, Massachusetts) ja niitä käytettiin tuottajan ohjeiden mukaan. EcoRI-HhaI-palanen, joka sisälsi penP-geenin 5'-pään (337 nukleotidia), puhdistettiin eluoimalla akryyliamidigeelistä noudattamalla menetelmää Maniatis et al., (1982), supra, ss. 163-164, mutta käyttämällä akryyliamidia agarosin tilalla. HhaI-BamHI-palanen (1 kb) puhdistettiin geelieluutiolla samalla tavalla. Erillisessä kokeessa puhdistettiin pSYC423:n suuri EcoRI-BamHI-palanen ja liitettiin se näihin kahteen penP:stä johdettuun palaseen. Näin saatu plasmidi, jolle annettiin nimi plasmidi pSYC562, sisältää poistuman, joka kattaa sekvenssin, joka koodittaa ketjua Ala-Leu-Ala-Gly-Cys (asemat 23-27 villityyppisessä *B. licheniformis* penP-geenissä). Koska villityypisen sekvenssin asemassa 28 on myös Ala, voidaan tämä poistuma katsoa samaksi kuin poistuma asemista 24-28. pSYC562:n jäljellejäänyt alue on sama kuin plasmidin pSYC423 vastaava alue. Käyttämällä hyväksi läheistä PstI-kohtaa, joka sijaitsee 27 nukleotidia poistumasta ylävirtaan päin, pilkottiin plasmidi pSYC562 PstI:llä, sen pää merkattiin ja sen jälkeen sen sekvenssi analysoitiin. Ks. Gilbert, W., ja Maxam, A., *Methods in Enzymology* 65:499-560 (Grossman, L., ja Moldave, K.J. editors, Academic Press (1980)). Tulokset varmistivat, että sekvenssi sisälsi nukleotidipoistuman, joka kattoi asemissa 23-27 olevia aminohappoja koodittavan alueen. Tälle mutaatiolle annettiin nimitys penP delta 2428.

Jotta voitaisiin tutkia penP delta 2428-mutaation fenotyyppiä, villityyppinen penP-promoteri lisättiin takaisin plasmidiin

pSYC562. Tämä 313 emäsparin (bp) EcoRI-PstI-palanen, joka sisälsi promoterin ja osan koodittavaa sekvenssiä penP delta 2428-mutaation edessä, puhdistettiin plasmidista pSYC310-2 (pSYC423:n kantaplasmidi). Plasmidia pSYC310-2 on selostettu julkaisussa McLaughlin, J.R., Chang, S-Y., ja Chang, S., Nucleic Acids Research 10:3905-3919 (1982). Sitten palanen liitettiin pienen EcoRI-PstI-palasan tilalle plasmidin pSYC562 DNA:han, joka oli pilkottu EcoRI:llä ja PstI:llä. Ampisillini-ille vastustuskykyiset E. coli-transformantit valittiin ja joukkoa edustavaa plasmidia pSYC617 tutkittiin edelleen. Kun suoritettiin eri endonukleaaseilla saatujen palasten analyysi, voitiin havaita, että plasmidi pSYC617 oli identtinen plasmidin pSYC310-2 kanssa lukuunottamatta 15 emäsparin poistumaa penP delta 2428:ssa, kuten oli odotettavissa palanvaihtokokeen perusteella. Osa pSYC617:n penP delta 2428-geenistä on kuvattu kuvassa 5.

Kun plasmidia pSYC617 käytettiin transformointikelpoisten E. coli CS412- tai E. coli K-12/MM294-solujen transformointiin, lähes kaikki kypsä penisillinaasi pysyi solun sisällä tai soluliman kalvoon kiinnittyneenä. Vain hyvin pieniä eksopenisillinaasimääriä voitiin havaita periplasmisessa tilassa (so. osmoottisen iskun vapauttamina). Näin voitiin vetää se johtopäätös, että poistettaessa B. licheniformis-signaalsekvenssistä alkuperäinen säilynyt sekvenssi, jossa on kysteiini aminohappoasemassa 27, eksoentsyymin tuotanto häiriintyy. Samanlaisia tuloksia saatiin B. subtilis BD224-kannalla, joka oli transformoitu plasmidilla pSYC617. Ks. esimerkki XIII.

Esimerkki II

Kysteiinin muuttaminen seriiniksi B. licheniformis-penisillinaasin signaalsekvenssin aminohappoasemassa 27 ja plasmidin pSYC660 aikaansaaminen, jossa on penP S₂₇-geeni

B. licheniformis-penisillinaasigeenin (penP) sekvenssi on määritetty. Ks. Kroyer, J., ja Chang, S., (1981), supra, ja Neugebauer, K., et al. (1981), supra. Signaalsekvenssi

sisältää kodonin TGC, joka koodittaa kysteiiniä aminohappo-
 asemassa 27. Asemassa 27 oleva kysteiinitähde muuntuu osana
 tapahtumaketjua, joka johtaa penisillinaasin kalvoon kiinnitty-
 neen muodon syntymiseen. Ks. Nielsen, J.B.K., Caulfield, M.P.,
 ja Lampen, J.O., Proceedings National Academy of Sciences,
 (USA) 78:3511-3515 (1981), ja Lai, J.S., Sarvas, M., Brammar,
 W.J., Neugebauer, K., ja Wu, H.C., Proceedings National
 Academy Science, (USA) 78:3506-3510 (1981). Jotta tämä bio-
 synteettinen tapahtuma saataisiin muutetuksi ja enemmän pro-
 teiinia ohjatuksi solusta erittyvään eksomuotoon (Gram-
 positiivisten bakteerien, kuten *B. subtilis*, ollessa kyseessä)
 tai periplasmiseen tilaan joutuvaan muotoon (Gram-negatiivisten
 bakteerien, kuten *E. coli*, ollessa kyseessä), on tarpeen saa-
 da aikaan mutaatio penisillinaasin signaalsekvenssigeenissä
 asemassa, joka koodittaa kysteiiniä.

Yksinkertaisuuden ja tehokkuuden vuoksi käytettiin priimerillä
 ohjattua mutatoointia rakennettaessa kysteiinistä seriiniksi
 tapahtuvaa mutaatiota (ks. Zoller, M.J., ja Smith, M.,
 Nucleic Acids Research 10:6487-6500 (1982). Villityyppisen
 penisillinaasisekvenssin (penP) sisältävä DNA-jakso eristettiin.
 Tarkemmin sanottuna plasmidista pSYC310-2 leikattiin irti pala-
 nen, joka on HindIII- ja BamHI-kohtien välissä. Ks. McLaughlin
 et al. (1982), supra. Plasmidi pSYC310-2 on bifunktionaalinen
 plasmidi, joka kykenee replikoitumaan sekä *B. subtilis*ssä
 että *E. coli*ssa. Se kantaa HindIII-BamHI-palasessa *B.*
licheniformis 749/C:n villityyppistä penP-geeniä. Alan ammatti-
 ihmiset ymmärtävät, että villityyppinen penP-geeni olisi voitu
 leikata irti myös muusta sitä kantavasta yhdistelmäplasmi-
 dista. Yksi tällainen plasmidi on *B. subtilis*plasmidi pOG2165.
 pSYC310-2:sta irti leikattu HindIII-BamHI-DNA-palanen puhdis-
 tetaan akryyliamidigeelieluutiolla ja liitetään sen jälkeen
 kolifaagi-M13mp9:n DNA:n replikoituvaan muotoon (RF). Ks.
 Viera, J., ja Messing, J., Gene 19:259-268 (1982) ja Messing,
 J., ja Viera, J., Gene 19:269-276 (1982).

Tarkemmin sanottuna toimitettiin niin, että pSYC310-2:sta saatu puhdistettu HindIII-BamHI-palanen liitettiin M13mp9:ään, joka oli saatu firmasta Bethesda Research Laboratories, Inc., P.O. Box 577, Gaithersburg, MD., ja joka oli sitä ennen pilkottu restriktioentsyymeillä HindIII ja BamHI. E. coli JM103 transformoitiin tällä kaksisäikeisellä faagi-DNA:lla ja soluja viljeltiin. Kloonit, joka oli transformoitunut penP-geeniä kantavalla yhdistelmäfaagilla eli yhdistelmäfaagi M13-CM1:llä, tunnistettiin ja tästä kloonista valmistettiin yksisäikeinen faagi-DNA. Tässä käytettyjä menetelmiä on selostettu julkaisussa Zoller, M.J., ja Smith, M., Nucleic Acids Research 10:6487-6500 (1982).

15 nukleotidia sisältävä synteettinen jakso 5'-GTTAGCGGATCCTGC-3' valmistettiin fosfotriesterimenetelmällä, jota on selostettu julkaisussa Narang, S.A., Hsiung, H.M., ja Brousseau, R., Methods in Enzymology 68:90-97 (R. Wu, editor) Academic Press (1979), ja se fosforyloitiin ensin 5'-päästään ATP:llä ja T4 polynukleotidikinaasilla, jonka jälkeen sitä käytettiin priimerinä aloittamaan komplementaarisen säikeen synteesi in vitro, kun 5' fosforyloitu priimeri oli ensin liitetty templaatti-M13-CM1-DNA:han. Priimeriä jatkettiin käyttämällä DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta sekä kaikkia neljää dNTP-laatua T4-ligaasin läsnäollessa. Tämä priimeri muodostaa penP-signaalisekvenssi-geenijakson parikkisäikeen ja vastaa viiden aminohapon kodoneja asemassa 25-29, paitsi, että synteettisessä priimerissä on keskimääräinen nukleotidi epäparinen, josta syystä se ei täydennä villityyppisen penP-geenitemplaatin vastaavaa nukleotidia G. Epäparisen sekvenssin sisällyttäminen penP-geeniin, saa aikaan kysteiinin (TGC-kodoni) muuttumisen seriiniksi (TCC) asemassa 27. Kuvassa 1 on esitetty menetelmä, jolla saadaan aikaan Cys₂₇ → Ser₂₇-mutaatio.

Kooditetussa peptidissä tapahtuu oleellisesti ottaen se, että kysteiini₂₇:n -SH-ryhmä muuttuu seriini₂₇:n -OH-ryhmäksi. Nukleotiditasolla mutantti saa BamHI-kohdan (GGATCC) ja menettää HhaI-kohdan (GCGC) mutaatiokohdassa. Uuden BamHI-kohdan

lÄsnÄolo oli se fenotyyppi, jota kÄytettiin "G → C"-mutaatioita kantavien mutanttien tunnistamisessa.

Kysteiini → seriini-mutaatiota rakennettaessa syntetisoitiin komplementaariset (miinus) säikeet priimerinpidennysreaktiolla käyttÄmällä E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta M13-CM1-faagi-DNA-templaattilla. Ks. Zoller, M.J., ja Smith, M., Nucleic Acids Research 10:6487-6500 (1982). Kun T4-DNA-ligaasi oli lÄsnÄ tässä reaktiossa, osa DNA-molekyyleistä muuttui kaksisÄikeiseksi, kovalenttisesti suljetuiksi, hÖlliksi renkaiksi. NÄmÄ molekyylit erotettiin muista molekyyleistä, jotka olivat joko polymeraasin epÄtÄydellisesti pidentÄmiÄ tai eivÄt liittyneet yhteen priimerin epÄtÄydellisestä kinaasireaktiosta johtuen. Erottaminen suoritettiin agarosigeelielektroforeesilla. TÄmÄ tehtiin lisÄÄmällä reaktioseos 0,8-prosenttiseen agarosigeeliin etidiumbromidin (2 mikrogrammaa/ml) lÄsnÄollessa. Kovalenttisesti sidotun rengasmaisen DNA:n sisÄltävä kaista leikattiin ja DNA otettiin talteen.

Transformointikelpoiset E. coli JM103-solut transformoitiin puhdistetulla, kovalenttisesti suljetulla, kaksisÄikeisellä DNA:lla kÄyttÄmällä tavallisia M13-faagi-DNA:lla suoritettavan transformoinnin menetelmiÄ. JM103-solut saatiin firmasta Bethesda Research Laboratories, Inc., P.O. Box 577, Gaithersburg, MD. Ks. myÖs yleisesti Viera, J., ja Messing, M., Gene 19:259-268 (1982) ja Messing, J., ja Viera, J., Gene 19:269-276 (1982). Eristettiin kaikkiaan 36 faagitÄplÄÄ ja faageja tuottavista soluista eristettiin RF-DNA:t kÄyttÄmällä Ish-Horowiczin ja Burken nopeata plasmidienseulontamenetelmÄÄ. Ks. Ish-Horowicz, D.I., ja Burke, J.F., Nucleic Acids Research 9:2989-2998, (1981). Kun oli suoritettu pilkkominen BamHI-restriktioendonukleasilla, yksi 36 DNA-valmisteesta (nimeltÄän M13penPS₂₇) antoi elektroforeesin jÄlkeen kaksi palasta, mikÄ osoitti, ettÄ tuon kloonin (M13penPS₂₇) geenisekvenssi sisÄlsi "G → C"-mutaation. Lopuissa valmisteista tapahtui yksi ainut katkeaminen BamHI-endonukleasilla, mikÄ merkitsi, ettei kanta-M13-CM1-DNA ollut mutatoitunut tÄstä kohdasta. Kun mutantin M13penPS₂₇

DNA analysoitiin tarkemmin käyttämällä HhaI- ja BamHI-endonukleaaseja, löytyivät odotetut muutokset. Tämän mutaation suora sekvenssianalyysi lisäksi varmisti tämän sekvenssinmuutoksen.

Ml3penPS₂₇:n sisältämä kysteiini →seriini-mutaatio sijaitsee penP-geenin PstI-kohdan ja BglII-kohdan välissä. Ks. McLaughlin et al. (1982) supra näiden kohtien sijainnista. Tämä DNA:n restriktiojakso eristettiin Ml3penPS₂₇:n RF DNA:sta. Tämä "restriktiopalamutantti" voitiin kloonata mihin tahansa plasmidiin, joka sisälsi penP-geenin, kuten bifunktionaalisiin plasmideihin pOG2165 tai pSYC310-2, vastaavan villityyppisen penP-palasen tilalle.

Kun PstI-BglII-mutanttipalanen eristettiin Ml3penPS₂₇:n RF DNA:sta ja kloonattiin plasmidiin pSYC310-2 vastaavan villityyppisen PstI-BglII-palasen tilalle tavallisia menetelmiä käyttämällä, saatiin aikaan plasmidi pSYC660.

Plasmidi pSYC660 sisältää penPS₂₇-geenin, jossa on kysteiini →seriini-mutaatio penP-signaalisekvenssin aminohappoasemassa 27, kuten kuvassa 5 on esitetty.

Esimerkki III

Kysteiinin muuttaminen alaniiniksi B. licheniformis-penisilliinaasin signaalisekvenssin aminohappoasemassa 27 ja plasmidin pSYC660A aikaansaaminen, jossa on penPA₂₇-geeni

Esimerkissä II kuvattuja menettelytapoja noudattaen on mahdollista saada aikaan kysteiini → alaniinimutaatio aminohappoasemassa 27. Villityyppinen penP-sekvenssi sisältää kodonin TGC, joka koodittaa kysteiiniä aminohappoasemassa 27. Seriiniksi₂₇ muunnettu signaalipeptidiä koodittava sekvenssi sisältää kodonin TCC, joka koodittaa seriiniä aminohappoasemassa 27. Kun muunnetaan penPS₂₇-kodoni TCC kodoniksi GCT, on saatu aikaan alaniinia koodittava kodoni.

DNA-sekvenssi, joka koodittaa seriiniksi₂₇ muunnettua penP-signaalisekvenssiä, sijaitsee M13penPS₂₇-faagissa. Ks. esimerkiksi II edellä. Valmistetaan synteettinen priimeri, jonka sekvenssi on 5'-TGTTAGCAGCTCCTGCAA-3'. Tämän synteettisen priimerin valmistus suoritetaan menetelmällä Matteucci and Caruthers (1981), supra, käyttämällä automaattista oligonukleotidisyntetisaattoria (Model Sam One, Biosearch Inc., San Rafael, Calif.). Priimeriä käytetään komplementaarisen säikeen syntetisoitiin in vitro, kun priimeri on ensin 5'-fosforyloitu ja kiinnitetty M13penPS₂₇-DNA-templaattiin. Tämä priimeri muodostaa muunnetun (Ser₂₇) signaalisekvenssin parikkisäikeen ja vastaa asemassa 25-29 olevia viittä aminohappoa, paitsi, että 5'-päästä lukien asemassa 10 oleva nukleotidi ja 5'-päästä lukien asemassa 8 oleva A ovat synteettisessä priimerissä epäparisia nukleotideja, jotka eivät täydennä vastaavia nukleotideja penPS₂₇-geenitemplaatissa. Kun penPS₂₇-geeniin sisällytetään väärä sekvenssi, saadaan aikaan seriinin (TCC-kodoni) muuttuminen alaniiniksi (GCT-kodoni) asemassa 27, ja näin tulee faagiin M13penPA₂₇ mutatoitunut geeni, jonka nimi on penPA₂₇. Faagi M13penPA₂₇ voidaan tunnistaa uuden AluI-restriktiokohdan (AGCT) perusteella ja mutaatio on poistanut BamHI-kohdan. Kun pSYC310-2:n PstI-BglII-palanen korvataan penPA₂₇-geenin PstI-BglII-palasella, saadaan aikaan plasmidi pSYC660A, jonka penPA₂₇-geenin osa on esitetty kuvassa 5.

Suurempi prosentuaalinen määrä pSYC660A:n penPA₂₇:stä ilmentynyttä penisillinaasia erittyisi sekä E. colissa että B. subtiliksessa kuin vastaava prosentuaalinen määrä, joka erittyy pSYC310-2:n penP:stä E. colissa ja B. subtiliksessa ilmentyneestä penisillinaasista.

Polypeptidi, joka on liittynyt alaniinin taakse penPA₂₇-signaalipeptidin Ala-27:n alapuolella, erittyisi suuremmalla teholla kuin sama polypeptidi asemassa 34 olevan alaniinin takana villityyppisessä penP-signaalipeptidissä.

Esimerkki IV

Sellaisen plasmidisarjan rakentaminen, jossa on edullisia restriktiokohtia B. licheniformis-penisillinaasin penP-promoterin ja signaalipeptidiä koodittavien DNA-sekvenssien ohessa, ja plasmidi pDH5508

B. licheniformisin penisillinaasi-penP-geenin sekvenssi on määritetty. Sekvenssitiedoista ilmeni 446 emäsparin pituinen HpaII-jakso (ks. Kroyer, J., ja Chang, S., (1981) *supra*, ja Gray, O., ja Chang, S., *Journal Bacteriology* 145:422-428 (1981), jossa oli penP-promoteri ja 72 ensimmäistä aminohappoa koodittava sekvenssi, signaalipeptidin 34 aminohappoa mukaanlukien.

PenP-geenissä on AvaI-kohta (CTCGGG, ks. Kroyer, J., ja Chang, S., (1981), *supra*. Myös pBR322:ssa on AvaI-kohta asemassa 1425 /ks. Sutcliffe, J.G., *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology* 43:77-90 (1979)]. Kun liitettiin yhteen penP:stä saatu HpaII-AvaI-jakso (saatu esim. pSYC310-2:sta, pOG2165:stä tai pTB2:sta [Kroyer ja Chang (1981), *supra*] ja pBR322:sta saatu suuri ClaI-AvaI-jakso, transformoitiin E.coli K-12/CS412 näin saaduilla plasmideilla ja valittiin ampicilliinin suhteen vastustuskykyiset transformantit, saatiin aikaan plasmidi pOG2254.

Kuten kuvasta 2 ilmenee, plasmidi pOG2254 sisältää penP-geenistä johdettuja sekvenssejä, joiden päissä HpaII-kohta ja AvaI-kohta. Loput pOG2254:n sekvenssistä, joka sisältää alueen AvaI-kohdasta ClaI-kohtaan, on johdettu pBR322:sta. Plasmidi pOG2254 linearisoitiin ainoasta AvaI-kohdasta. Linearisoitua DNA:ta käsiteltiin ExoIII-entsyymillä eripituisia aikoja olosuhteissa, jotka on selostettu julkaisussa Guo, L.H., ja Wu, R., *Nucleic Acids Research*, 10:2065-2084, (1982). ExoIII-entsyymi muuntaa kaksisäikeisen DNA:n päiden alueet yksisäikeisiksi päiksi. Reaktioseoksista otettiin näytteitä ja ExoIII-nukleaasi-aktiivisuus sammutettiin eri aikoina ja näytteet kerättiin yhteen. Sitten nämä DNA-valmisteet käsiteltiin yhden säikeen

suhteen spesifisellä S1-nukleaasilla (saatu firmasta Bethesda Research Laboratories, Inc. ja käytettiin tuottajan ohjeiden mukaan). S1-nukleaasikäsittely poistaa nukleotideja spesifisesti yksisäikeisen DNA:n päistä näin synnyttäen tylppäpäisiä molekyylejä.

ExoIII- ja S1-nukleaasilla käsitelty DNA pilkottiin sen jälkeen EcoRI-entsyymillä. EcoRI-kohta sijaitsee 5':ssä penP-promoteriin asti. EcoRI:llä tapahtuva pilkkominen irrottaa pienen palasen näistä ExoIII:lla ja S1:llä käsitellyistä DNA-jaksoista, jotka sisältävät penisillinaasigeenin promoterin sekä eri pituisia pätkiä penisillinaasin aminopäätä koodittavasta alueesta. Nämä DNA-palat fraktioitiin geelillä. Geelistä eluoitiin noin 300-400 emäsparin pituisia DNA-jaksoja, jotka käytettiin kloonaukskoikeissa.

Jokaisessa näistä lyhyistä DNA-jaksoista, noin 300-400 emäsparia, on EcoRI:n synnyttämä pää toisessa päässä ja tylppä pää toisessa päässä. Näiden DNA-palasten kloonaukseksi plasmidi pBR322 pilkottiin ClaI-entsyymillä /asema 23, joka sijaitsee tetrasykliininvastustuskykygeenin promoterialueella, ks. Sutcliffe, J.G., Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology 43:77-90 (1979)7. ClaI-päät korjattiin E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella. Sitten näin käsitelty DNA pilkottiin EcoRI:llä, jolloin syntyi suuri pala, jossa oli EcoRI-pää ja tylppä pää. Tämä pBR322:n suuri palanen puhdistettiin geelistä ja sekoitettiin pienten, noin 300-400 emäsparia sisältävien palasten kanssa, jotka oli saatu edellä kuvatulla tavalla pOG2254:stä lähtöisin olevasta penisillinaasigeenistä. DNA-laadut liitettiin yhteen ja niillä transformoitiin E. coli K12/CS412. Levyiltä valittiin tetrasykliinille vastustuskykyiset transformantit; niiden kantamat yhdistelmäplasmidit eristettiin ja tunnistettiin pilkkomalla EcoRI- ja HindIII-entsyymeillä, jolloin ilmeni, että ne sisälsivät penisillinaasigeenistä johdettuja liitännäisiä, joiden koko oli odotetusti alueella 300-400 emäsparia.

Useita plasmidi-DNA-laatuja valmistettiin eri klooneista ja nukleotidisekvenssit analysoitiin penP-sekvenssien ja pBR322-sekvenssien liittymäkohdista menetelmällä Maxam ja Gilbert. Ks. Gilbert, W., ja Maxam, H., *Methods in Enzymology* 65:499-560 (Grossman, L., ja Moldave, K.J., editors) Academic Press (1980). Yhden plasmidin, jolle annettiin nimi pDH5452, sekvenssi oli sellainen, että siinä oli ExoIII:lla ja S1-nukleasilla syntyneet poistumat, jotka ulottuivat nukleotidiin T, joka vastaa penP:n 35. aminohapon TCG-kodonia, joka on Ser ja samalla proteiinin suuren eksomuodon N-pään aminohappo. Signaali-sekvenssin karboksipään aminohappo villityyppisessä penisilliinaasissa on Ala asemassa 34. Tämä T liitetään pBR322:sta peräisin olevaan korjattuun ClaI-kohtaan, jonka sekvenssi on CGA. Liitoskohdan sekvenssi TCGA vastaa restriktioentsyymien TaqI tunnistuskohtaa. Plasmidi pDH5452 on esitetty kuvassa 2. Restriktioentsyymillä TaqI tapahtuva katkaisu synnyttää ulostyöntyviä CG-päitä. Plasmidin pDH 5452 DNA pilkottiin TaqI-entsyymillä ja ulospäin työntyvät 5'-päät täytettiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella ja dCTP:llä sekä dGTP:llä käyttämällä standardiolosuhteita ja sen jälkeen suoritettiin uudelleen pilkkominen EcoRI-entsyymillä. Palanen, joka ulottuu EcoRI:stä korjattuun TaqI:een ja sisältää penP:n promoterin ja signaali-sekvenssin, puhdistettiin tästä valmisteesta eluoimalla geelistä ja kloonattiin pBR322:een. Vektorin pBR322 DNA oli pilkottu HindIII-entsyymillä ja sen jälkeen korjattu DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella dNTP-laatujen läsnäollessa standardiolosuhteissa. Tämä pBR322-palanen pilkottiin EcoRI:llä ja liitettiin pDH5452:sta saatuun edulliseen penP-palaseen ja E.coli K-12/CS412 transformoitiin saadulla liitännäisellä. Eristettiin yksi transformantti, joka oli fenotyyppisesti vastustuskykyinen ampisilliinille ja tetrasykliinille. Tästä transformantista valmistettiin plasmidi-DNA ja se analysoitiin. Tälle plasmidille annettiin nimi pDH5501. Korjattu TaqI-kohta liitettiin korjattuun HindIII-kohtaan ja saadulla uudella liitoskohdalla oli seuraava sekvenssi: CTCGAG. Tässä sekvenssissä oli CTCG johdettu pDH5452:sta ja AG-tähteet oli johdettu

pBR322:n korjatusta HindIII-kohdasta. Restriktioentsyymi XhoI tunnistaa tämän heksanukleotidisekvenssin CTCGAG ja keskimmäiset neljä nukleotidia TCGA muodostavat restriktioentsyymien TaqI tunnistuskohdan. Plasmidi pDH5501 on esitetty kuvassa 2.

Jotta saataisiin syntymään lisää restriktioentsyymien tunnistuskohtia penP-signaalisekvenssin päähän, rakennettiin plasmidi pDH5508. Tuon plasmidin aikaansaamiseksi pDH5501:n plasmidi-DNA pilkottiin NaeI-entsyymillä, joka tunnistaa pBR322:sta johdetun alueen neljässä kohdassa: 403, 770, 930 ja 1284 / $\overline{\text{ks}}$. Sutcliffe, J.G., Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology 43:77-90 (1979) $\overline{7}$. NaeI tunnistaa sekvenssin GCCGGC. Tällä entsyymillä suoritettu pilkkominen jättää tylppäpäiset sekvenssit GCC-3' ja 5'-GGC. NaeI:llä pilkottu pDH5501-DNA pilkottiin vielä XhoI-entsyymillä. Sitten suoritettiin käsittely yhden säikeen suhteen spesifisellä S1-nukleaasilla, joka synnyttää tylppäpäiset palat XhoI-kohtaan poistamalla ulostyöntyvät päät. Tämä jättää sekvenssin GCC, joka vastaa 34. aminohapon nukleotidia penP-signaalisekvenssissä. Sitten NaeI:llä, XhoI:llä ja S1-nukleaasilla käsitelty DNA (DNA-väkevyys 10 mikrogrammaa/ml) liitettiin yhteen T4-ligaasilla ja E. coli K-12/CS412 transformoitiin näin saadulla plasmidilla. Saatiin ampisilliinille vastustuskykyinen, tetrasykliinille herkkä transformantti, jossa on plasmidi pDH5508. pDH5508:n restriktioanalyysi osoitti, että siinä oli kaksi NaeI-kohtaa, alavirrassa oleva (myötäpäivään EcoRI-kohdasta) vastasi NaeI-kohtaa, joka oli alunperin pBR322:ssa asemassa 1284. Ylävirrassa oleva NaeI-kohta vastaa liitossekvenssiä, joka on syntynyt S1:llä käsitelystä XhoI-kohdasta, joka liitettiin alunperin pBR322:ssa asemassa 930 olleeseen NaeI-kohtaan. Sekvenssi, joka on pDH5508:n ainoan EcoRI-kohdan ja siitä alavirtaan olevan ensimmäisen NaeI-kohdan välissä, on pDH5501:stä johdettu sekvenssi, joka sisältää penP-promoterin ja penisillinaasin signaalisekvenssin. NaeI-kohdan sekvenssi on GCCGGC, joka voidaan katkaista sekä NaeI-entsyymillä että HpaII-entsyymeillä. Plasmidi pDH5508 on esitetty kuvassa 2.

Näin ollen rakennettiin plasmidisarja, jonka plasmideissa oli edullisia tunnistuskohtia penP-promoterin ja signaali-sekvenssin vieressä. Plasmidissa pDH5452 on TaqI-restriktio-kohta sekä HindIII-restriktiokohta signaalipeptidiä koodittavan sekvenssin jäljessä. Plasmidissa pDH5501 on XhoI-kohta ja TaqI-kohta signaali-sekvenssin jäljessä ja plasmidissa pDH5508 on NaeI-kohta ja HpaII-kohta penisillinaasin signaali-sekvenssin jäljessä. Ks. kuva 2.

Esimerkki V

Ihmisen kasvuhormonin (hGH) cDNA:n kloonauksen ja plasmidin pSYC709 rakentaminen

Ihmisen aivolisäketä käytettiin ihmisen kasvuhormonin mRNA:n lähteenä. mRNA:n eristämisessä käytettiin menetelmää Maniatis, T., Fritsch, E.F., ja Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 6. luku, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). cDNA valmistettiin julkaistua menetelmää käyttäen ja kloonattiin plasmidiin pBR322 käyttämällä menetelmiä, joita on selostettu kappaleessa 7 julkaisussa Maniatis, T., Fritsch, E.F., ja Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). Sitten plasmidin pBR322 DNA pilkottiin PstI-entsyymillä. Sitten tähän vektori-DNA:han tehtiin hännät terminaalilla transferaasilla dGTP:n läsnäollessa. GTP-häntäinen DNA liitettiin kaksisäikeiseen cDNA:han, johon oli tehty hännät dCTP:llä. E. coli K-12/MM294 transformoitiin yhteenliitetyllä DNA:lla. Yksi tetrasyklinille vastustuskykyinen ja ampisilliinille herkkä transformantti tunnistettiin (nimeksi annettiin klooni 2OC4), joka kantaa hGH-cDNA-sekvenssiä plasmidissa (nimettiin p2OC4:ksi). Plasmidi p2OC4 sisältää hGH-geeniliitännäisen, joka voidaan pilkkoa restriktio-entsyymeillä BamHI ja SmaI. Nämä kaksi entsyymiä synnyttävät 688 emäsparin palasen, joka on sama kuin osa julkaistusta palasesta: Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D., ja Goodman, H.M., Science 205:602-607, (1979). Koska löydettiin sisäisiä tunnistuskohtia, esim. PstI, PvuII, jotka myös ovat yhtäpitäviä julkaisun Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D.,

ja Goodman, H.M., Science 205:602-607, (1979) kanssa, tehtiin se johtopäätös, että 20C4 kantaa p20C4:ssä cDNA:ta, joka koodittaa ihmisen kasvuhormonia.

Plasmidit eristettiin kloonista 20C4. Plasmidi-DNA pilkottiin BamHI-entsyymillä, joka leikkaa plasmidin kahdesta kohdasta. Yksi BamHI-kohta katkaisee tetrasykliinigeenin (tet) pBR322:sta johdetussa sekvenssissä ja toinen katkaisee cDNA-sekvenssin. Pilkottu DNA sekoitettiin synteettisen oligonukleotidin kanssa, joka oli valmistettu fosfotriesterimenetelmällä [Narang et al. (1979), supra], ja jonka sekvenssi oli seuraava: 5'-TTCCCAACCATT-3'. Tämä 12-meeri sopii yhteen hGH:ta koodittavan sekvenssin kanssa. Se vastaa kypsän hGH-proteiiniketjun ensimmäisiä neljää aminohappoa [ks. Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D., ja Goodman, H.M., Science 205:602-607, (1979)], jotka ovat fenyylialaniini-proliini-treoniini-isoleusiini (Phe-Pro-Thr-Ile). 12-meerinen priimeri sekoitettiin BamHI:llä pilkotun p20C4:n plasmidi-DNA:n kanssa, jotta ihmisen kasvuhormonia koodittava DNA-sekvenssi saatiin rakenteeltaan edullisemmaksi jatkokesittelyä varten.

Tässä muuntamisessa käytettiin menetelmiä Goeddel, D.V., Shepard, H.M., Yelverton, E., Leung, D., ja Crea, R., Nucleic Acids Research 8:4057-4074 (1980). Oleellisesti ottaen priimeriä käytettiin mukauttamaan ihmisen kasvuhormonin geeni uuden sekvenssin kanssa kuten Goeddel, D.V., Shepard, H.M., Yelverton, E., Leung, D., ja Crea, R., Nucleic Acids Research 8:4057-4074 (1980), olivat tehneet mukauttaessaan interferonin geenin. Priimerin ja plasmidi-DNA:n sisältävä seos denaturoitiin kuumuudella ja käsiteltiin sen jälkeen E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella ja dNTP-laaduilla kuten Goeddel et al. (1980), supra, ovat kuvanneet. Sitten DNA pilkottiin SmaI-entsyymillä. SmaI leikkaa hGH-geenin geenin 3'-päästä [ks. Martial et al (1979), supra]. Geelistä puhdistettiin noin 572 emäsparin palanen. Tämän palasen nukleotidisekvenssi alkaa ihmisen kypsän kasvuhormonin ensimmäisestä eli fenyylialaniinin kodonista ja loppuu 3'-päässä hieman hGH-geeniä koodittavan sekvenssin jälkeen [ks. Martial et al. (1979), supra].

Vektori-DNA, johon tämä palanen kloonattiin, oli pLP1201. Plasmidi pLP1201 johdettiin plasmidista pDH5060, joka vuorostaan oli pBR322:sta ja *Bacillus*-plasmidista pOG1196 johdettu yhdistelmäplasmidi, jotka kumpikin oli pilkottu pvuII:lla ja sen jälkeen liitetty yhteen. Oleellisesti ottaen plasmidi pDH5060 on sama kuin pLP1201 paitsi, että pDH5060:sta on poistettu yksi HindIII-kohta. Poistettu HindIII-kohta on se, joka sijaitsee pOG1196:sta johdetussa pDH5060:n osassa. pDH5060 pilkottiin osittain HindIII:lla. Lomittaiset päät täytettiin ja liitettiin yhteen. *E. coli* K-12/CS412 transformoitiin näin saaduilla plasmideilla. Transformantit valittiin ampisilliini- ja tetrasykliinivastustuskyvyn suhteen. Valittiin sellaiset solut, joissa oli plasmidi pLP1201, jossa oli yksi ainut HindIII-kohta, joka oli johdettu pDH5060:n pBR322-palasta. Plasmidi pLP1201 pilkottiin HindIII- ja NruI-entsyymillä, jotka kumpikin leikkaavat pBR322:sta johdetun sekvenssin. Tämä lineaarisoitu DNA käsiteltiin vielä DNA-polymeraasi I:n Klenow-palalla neljän dNTP-laadun läsnäollessa niin, että saatiin aikaan tylpät päät. Näin käsitelty pLP-1201-DNA:n suuri palanen puhdistettiin geelillä ja liitettiin sen jälkeen ihmisen edellä kuvatulla tavalla käsitellyn kasvuhormonisekvenssin kanssa yhteen käyttämällä tylppäpäistä yhteenliittämistä, jota on selostettu julkaisussa Maniatis et al. (1982), supra. Näin saadulla plasmidilla transformoitiin *E. coli* K-12-kanta CS412. Ne transformantit, jotka olivat fenotyyppisesti ampisilliinille vastustuskykyisiä ja tetrasykliinille herkkiä, tutkittiin tarkemmin restriktioanalyysillä. Yksi kloonisi sisälsi plasmidin pSYC709, joka on esitetty kuvassa 4. pSYC709:ssä on yksi ainut HindIII-kohta seurauksena kloonauksesta, jossa hGH-geeni liitettiin vektori-DNA:han. Tässä plasmidissa on myös yksi ainut EcoRI-kohta. Sekä EcoRI-kohta että HindIII-kohta voidaan katkaista ja liittää uusia palasia, jotka sijoittuvat ihmisen kasvuhormonia koodittavan sekvenssin yläpuolelle. Tämä rakenne auttaa ilmentämistyön jatkamista.

Esimerkki VI

Sellaisten plasmidien rakentaminen, joissa on liitettyjä geenejä penisillinaasisignaaliptidiä koodittavan DNA-sekvenssin ja kypsän hGH:n geenin välissä. Plasmidit pSYC728 ja pSYC744

Esimerkissä V on kuvattu plasmidin pSYC709 rakentaminen, joka sisältää kypsää hGH:ta koodittavan sekvenssin. Tämä plasmidi replikoituu sekä B. subtiliksessa että E. colissa. hGH-geenin yläpuolella on kaksi ainutta katkaisukohtaa, so. EcoRI-kohta ja HindIII-kohta. Plasmidi pSYC709 pilkottiin HindIII-entsyymillä. Sitten puolet näytteestä käsiteltiin E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella dNTP-laatujen läsnäollessa päiden täyttämiseksi; toinen puoli valmisteesta pilkottiin S1-nukleasilla, jotta yksisäikeiset ulospäintyöntyvät päät saatiin poistetuiksi. Kumpikin valmiste pilkottiin vielä restriktioentsyymillä EcoRI. Näissä käsittelyissä syntyneet suuret DNA-palaset fraktioitiin 0,8-prosenttisella agarosigeelillä ja puhdistettiin elektroforeesin jälkeen. Näillä menetelmillä puhdistetut kaksi valmistetta olivat: (A) suuri pSYC709-palanen, joka sisältää EcoRI:llä aikaansaadun pään ja HindIII:lla aikaansaadun pään, joka oli täytetty; ja (B) pSYC709:n suuri palanen sisältää EcoRI:llä aikaansaadun pään ja S1:llä käsitellyn HindIII:lla aikaansaadun pään.

Erillisessä kokeessa valmistettiin DNA-palasia, joissa on penP-promoteri ja signaaliptidiä koodittava sekvenssi. Esimerkissä IV kuvattu plasmidi pDH5508 pilkottiin yhdessä kokeessa NaeI:llä. Toisessa kokeessa se pilkottiin HpaII:lla ja HpaII:lla pilkottu valmiste käsiteltiin S1-nukleasilla, jotta saatiin aikaan tylpät päät poistamalla ulospäintyöntyvät päät. Sitten nämä DNA-valmisteet pilkottiin vielä restriktioentsyymillä EcoRI. Palanen, joka sisältää penisillinaasi-promoterin ja signaaliptidiä koodittavan DNA-sekvenssin, puhdistettiin kummastakin kahdesta pDH5508:n hajoamistuotteesta, kun oli ensin suoritettu fraktiointi geeleillä. penP-palasta, joka syntyi EcoRI- ja NaeI-pilkkomisessa, käytettiin plasmidin

pSYC744 rakentamisessa. Palasta, joka syntyi EcoRI- ja HpaII-entsyymillä käsiteltäessä (suoritettiin vielä S1-käsittely), käytettiin plasmidin pSYC728 rakentamisessa.

Plasmidin pSYC728 rakentamisessa käytettiin A-palasta (pSYC709:n suuri palanen, joka oli valmistettu edellä kuvatulla tavalla) ja pDH5508:sta saatua EcoRI-HpaII-penP-palasta. Palaset liitettiin yhteen ja E. coli K-12/CS412-solut transformoitiin näin saaduilla plasmideilla. pDH5508:sta saatua EcoRI-NaeI-penP-palasta ja B-palasta (joka oli valmistettu pSYC709:stä edellä kuvatulla tavalla) käytettiin samoin. Nämä palaset liitettiin yhteen ja näin saaduilla plasmideilla transformoitiin E. coli K-12/CS412-solut. Näissä kokeissa valittiin ampisilliinille vastustuskykyiset transformantit ja DNA-laadut analysoitiin puhdistuksen jälkeen. Yksi ensimmäisessä kokeessa syntynyt klooni sisälsi plasmidin pSYC728 ja yksi toisessa kokeessa saatu klooni sisälsi plasmidin pSYC744. Niillä on oleellisesti ottaen sama rakenne kuin plasmidilla pSYC709 kuvassa 4 paitsi, että alue 5':sta hGH-geeniin asti on muuttunut. pSYC709:n alkuperäinen EcoRI-HindIII-alue oli kummassakin plasmidissa korvattu palasella, joka sisälsi penisillinaasi-promoterin sekvenssin ja signaalipeptidin. Plasmidissa pSYC728 (kuten kuvassa 6 on esitetty) on penP-hGH-liitoksen sekvenssi GCAGCTTTC. GCA vastaa signaalsekvenssin viimeisen aminohapon (34.) kodonia. Korjatusta HindIII-kohdasta johdettu GCT koodittaa alaniinia (Ala). TTC koodittaa ihmisen kypsän hGH:n N-pään aminohappoa Phe. Koska Fnu4H1-restriktioentsyymi tunnistaa sekvenssin GCAGC, plasmidi pSYC728 pilkottiin Fnu4H1-entsyymillä. Tämän entsyymin tunnistuskohdan läsnäolo odotetussa kohdassa signaalipeptidiä koodittavassa sekvenssissä tunnistettiin. Tämä osoitti, että penP-hGH-geenissä on pSYC:ssä odotettu liitossekvenssi, kuten edellä ja kuvassa 6 on esitetty.

Plasmidissa SYC744 käytettiin eri menetelmää sekvenssin oikeaksi osoittamiseksi. Sillä on odotettu sekvenssi GAATGCCTTC penP-hGH-geeniliitoskohdassa, joka vastaa signaalsekvenssin 32.

kodonin viimeistä nukleotidia, koko 33. nukleotidia ja koko 34. nukleotidia sekä ihmisen kypsän hGH-proteiinin sekvenssin ensimmäistä kodonia. Koska restriktioentsyymi XmnI tunnistaa sekvenssin GAANNNTTC, plasmidi pSYC744 pilkottiin XmnI-entsyymillä. Tämä tunnistuskohta löydettiin odotetusta paikasta. Tämä todisti plasmidin pSYC744 sekvenssin, kuten edellä ja kuvassa 6 on esitetty.

Esimerkki VII

Plasmidin pSYC720 rakentaminen, joka kantaa muunnettua penP-signaali-peptidin sekvenssiä liitettynä hGH:tä koodittavaan sekvenssiin

Plasmidi pSYC660 (esimerkki II) pilkottiin BamHI-entsyymillä, joka suorittaa katkaisun kohdasta, joka vastaa signaali-peptidin 26. ja 27. aminohapon kodoneja. DNA-päät korjattiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella dNTP-laatujen läsnäollessa ja sen jälkeen pilkottiin vielä EcoRI-entsyymillä. Puhdistettiin palanen, joka sisältää penP-promoterin ja osan signaali-peptidin sekvenssistä, käyttämällä geelieluutiota ja saatu palanen liitettiin pSYC709:stä (esimerkki V) saatuun palaseen, joka oli tehty pilkkomalla pSYC709 HindIII-entsyymillä ja sitten päät oli tehty tylpiksi täyttämällä Klenow-palasella dNTP-laatujen läsnäollessa ja lopuksi oli pilkottu EcoRI:llä. pSYC660:sta johdettu palanen, joka ulottui EcoRI-kohdasta korjattuun BamHI-kohtaan ja sisälsi penPS₂₇:n, liitettiin suureen pSYC709:n palaseen, joka ulottui EcoRI:stä korjattuun HindIII:een, T4-ligaasin avulla ja saadulla seoksella transformoitiin transformointikelpoiset E. coli CS412-solut. Yksi ampisilliinin suhteen vastustuskykyinen transformantti, joka kantoi plasmidia pSYC720, tutkittiin tarkemmin. Se kantaa penP-promoteria ja penPS₂₇-geenistä johdetun, muunnetun signaali-peptidin ensimmäisten 28 aminohapon kodoneja, joita seuraavat ihmisen kypsästä kasvuhormonista löytyvän Phe-Pro----sekvenssin kodonit. pSYC720:ssa oleva signaali-sekvenssin ja hGH:n liitosalue on esitetty kuvassa 6.

Esimerkki VIII

In vivo-yhdistelemisen käyttö selllaisten yhteenliitettettyjen geenien aikaansaamiseksi, joissa on muunnetun penP-signaali-peptidin DNA-sekvenssi liittyneenä ihmisen kypsää hGH:ta koodittavaan sekvenssiin. Plasmidit pSYC748 ja pSYC778 koodittavaan sekvenssiin.

Jotta yhteenliitettyihin geeneihin saataisiin syntymään kysteiini₂₇ → seriini₂₇-mutaatio, käytettiin menetelmää, jossa heterokahdenne-DNA, joka oli tehty kahdesta kantaplasmidista saadun yksisäikeisen DNA:n välille, transformoitiin niin, että saatiin yhdistelmiä in vivo.

Esimerkissä VI on selostettu plasmidien pSYC728 ja pSYC744 rakentaminen, joissa on penP:n villityypistä signaalsekvenssiä koodittava geeni liitettynä hGH-proteiinin sekvenssiin. Samanlaisia rakenteita on tehty käyttämällä muunnetun penP:n signaali-peptidiä koodittavaa sekvenssiä, jossa on Ser₂₇-mutaatio. Nämä ovat plasmidit pSYC778 ja pSYC748, jotka on johdettu plasmideista pSYC728 ja pSYC744 vastaavasti. Nämä plasmidit on esitetty kuvassa 6. Näitä plasmideja rakennettaessa käytettiin menetelmää, jossa heterokahdentuneet plasmidit voivat muodostaa geneettisiä yhdistelmiä in vivo. Tämän saavuttamiseksi tehtiin plasmidit pSYC716 ja pSYC742.

Plasmidi pSYC716 rakennettiin kloonamalla plasmidista pSYC660 saatu, muunnetun penP-signaalsekvenssin (Ser₂₇-mutaatio) sisältävä palanen plasmidiin pBR322. pBR322-vektori pilkottiin ensin ClaI- ja EcoRI-entsyymeillä ja sitten tämä DNA korjattiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella neljän dNTP-laadun läsnäollessa niin, että saatiin aikaan tylppäpäiset DNA-palaset. Erillisessä kokeessa plasmidi pSYC660, joka on identtinen plasmidin pSYC310-2 kanssa, ks. McLaughlin, et al. (1982), supra, paitsi että tähän plasmidiin sisältyy Cys₂₇ → Ser₂₇-mutaatio penP₂₇:ssä, pilkottiin AluI- ja AvaI-entsyymillä. AluI tunnistaa useita kohtia plasmidissa, kuten HindIII-kohdan, kuten julkaisussa McLaughlin et al. (1982), supra, on selostettu.

AvaI sijaitsee sekvenssissä, joka vastaa 61. ja 62. aminohapon kodoneja penP-geenissä [ks. Kroyer, J. ja Chang, S. (1981) (supra)]. Sitten pilkotut DNA-palaset korjattiin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palaselalla niin, että kaikkiin palasiin tuli tylpät päät. penP-promoterin ja ensimmäisiä 62 aminohappoa koodittava sekvenssi eristettiin, kun oli ensin suoritettu fraktiointi geelillä (käyttämällä geelieluutiota). Tämä puhdistettu AluI-AvaI-palanen (jossa AluI-pää on pSYC660:n HindIII-kohdasta) liitettiin pBR322-DNA:han, joka oli sitä ennen pilkottu EcoRI- ja ClaI-entsyymillä ja tehty tylppäpäiseksi DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasan ja dNTP-laatuojen avulla, kuten edellä on selostettu. E. coli K-12/CS412 transformoitiin näin saaduilla plasmideilla ja ampisilliinille sekä tetrasykliinille vastustuskykyinen transformantti eristettiin, josta tunnistettiin plasmidi pSYC716. Se sisältää pBR322-sekvenssin paitsi, että (korjatun) EcoRI-kohdan ja (korjatun) ClaI-kohdan välissä oleva alue on korvattu pSYC660:n AluI-AvaI-palaselalla, joka sisältää osan penPS₂₇-sekvenssistä. penPS₂₇:n sisältävän sekvenssin vieressä pSYC716:ssa on nyt EcoRI-kohta, 5' penPS₂₇-geenin 5'-päästä, ja HindIII-kohta.

Plasmidin pSYC742 rakentamiseksi plasmidi pSYC716 pilkottiin EcoRI- ja HindIII-entsyymeillä. Pieni palanen, joka sisältää penP-promoterin ja Ser-27-penisillinaasin 62 ensimmäistä aminohappoa koodittavan sekvenssin, puhdistettiin. Plasmidi pSYC709 pilkottiin EcoRI- ja HindIII-entsyymillä ja pilkottu DNA liitettiin pSYC716:sta saatuihin, puhdistettuihin EcoRI- ja HindIII-palasiin. Kun oli suoritettu yhteenliittäminen ja transformointikelpoisten CS412-solujen transformointi, oli yhdestä ampisilliinille vastustuskykyisestä transformantista puhdistetulla plasmidi-DNA:lla (plasmidi pSYC742) odotettu rakenne. Lyhyt sekvenssi, joka sijaitsee EcoRI- ja HindIII-kohdan välissä pSYC742:ssa, sisältää pSYC716:sta johdetun penPS₂₇-sekvenssin, ja suuri EcoRI-HindIII-palanen on johdettu pSYC709:stä.

Kantaplasmidi pSYC742 pilkottiin täydellisesti HindIII-entsyymillä ja päät tehtiin tylpiksi Sl-nukleaasilla poistamalla ulospäintyöntyvät päät.

Erillisessä kokeessa toinen kantaplasmidi pSYC744 pilkottiin EcoRI-entsyymillä ja tehtiin tylppäpäiseksi Sl-nukleaasikäsittelyllä. Nämä kaksi tylppäpäistä, linearisoitua DNA-laatua sekoitettiin keskenään suunnilleen ekvimolaarisessa suhteessa (DNA-väkevyys noin 10 mikrogrammaa per ml) ja kuumennettiin sijoittamalla DNA-liuoksen sisältävä koeputki 2 minuutiksi kiehuvaan veteen ja jäädytettiin hitaasti (usean tunnin kuluessa huoneen lämpötilaan), jotta homokahdenteet ja heterokahdenteet saattoivat muodostua kuumennuksessa muodostuneiden yksittäisten säikeiden liittyessä pareiksi. Homokahdenteet sisältävät kaksisäikeistä DNA:ta, jonka molemmat säikeet on johdettu samasta kantaplasmidista so. AA tai A'A'. Tylppäpäisyyden vuoksi homokahdenteet eivät voi muodostaa renkaita. Heterokahdenteissa on kaksisäikeinen DNA, jonka kumpikin säie on peräisin eri kantaplasmidista, so. AA' tai A'A. pSYC742:n ja pSYC744:n väliset heterokahdenteet muodostavat renkaita. Yksi heterokahdennemuoto on esitetty kuvassa 3. Kuvasta voidaan havaita, että kahdenteessa on roikkuvia häntiä, yksisäikeisiä aukkoja ja epäparinen keskimäinen nukleotidi aminohapon 27 kodonissa.

E. coli K-12/CS412-solut transformoitiin homokahdenteen ja rengasmaisen heterokahdenteen seoksella, mutta lineaariset homokahdenteet transformoivat taajuudella, joka on alle noin 0,01-kertainen heterokahdennenrenkaiden vastaavasta. Ampisilliinille vastustuskykyiset transformantit valittiin levyiltä ja yksi transformantti tunnistettiin. Tästä transformantista saatu plasmidi pSYC748 on esitetty kuvassa 3 ja sen rakenne on samanlainen kuin plasmidin pSYC744 rakenne, kun roikkuvat hännät ovat poistuneet, yksisäikeiset aukot ovat täyttyneet ja epäparinen nukleotidi on korjattu in vivo. Kun asemassa 27 oleva epäparinen nukleotidi on korjattu, on pSYC748 saanut BamHI-kohdan, joka osoittaa Ser₂₇-mutaation läsnäoloa tässä geenissä. Ser₂₇-mutaatio on seurausta heterokahdenne-DNA:lla tapahtuneesta

transformoitumisesta, jossa DNA:ssa oli yhteensopimaton emäspari tässä kohdassa villityyppistä emäsparia vastaavassa sekvenssissä. Plasmidissa pSYC742 on seriinin TCC-kodoni tässä kohdassa, kun taas plasmidissa pSYC744 on TGC-kodoni, joka koodittaa kysteiiniä. DNA:n in vivo-korjausprosessi korjaa väärän nukleotidin heterokahdenteessa läsnäolevan jomman kumman DNA-säikeen sekvenssin mukaisesti. Ser₂₇-mutaation sisältävä plasmidi (pSYC748) tunnistettiin uuden BamHI-kohdan läsnäolon perusteella.

Vastaavalla tavalla suoritettiin heterokahdenneyhdistely plasmidin pSYC742 ja plasmidin pSYC728 välille. pSYC728 linearisoitiin EcoRI:llä ja tehtiin tylppäpäiseksi S1-käsittelyllä. pSYC742 linearisoitiin HindIII:lla ja tehtiin tylppäpäiseksi S1-nukleaasikäsittelyllä. Sitten suoritettiin heterokahdenneyhdistely näin saaduilla lineaarisilla palasilla samoin kuin edellä on kuvattu pSYC742:n ja pSYC744:n kohdalla. Transformoinnissa ja valinnassa käytettiin E. coli K-12/CS412:sta ja ampisilliinivastustuskykyä. Jälleen roikkuvat päät poistettiin, yksisäikeiset aukot täytettiin ja epäparinen nukleotidi korjattiin (asemassa 27) in vivo. Plasmidi pSYC778 eristettiin ampisilliinille vastustuskykyisestä transformantista. Plasmidilla pSYC778 on samanlainen sekvenssi kuin pSYC728:lla, mutta pSYC778 on saanut Ser₂₇-mutaation. Näin ollen tätä in vivo-yhdistelymenetelmää käyttämällä rakennettiin kaksi yhdistelmäplasmidijohdannaista, joissa kummassakin on yhdistelmägeeni, joka koostuu penPS₂₇:n signaalipeptidistä ja kypsää hGH:ta koodittavasta sekvenssistä. Plasmidissa pSYC778 on yhteenliittyneessä geenissä penPS₂₇-signaalipeptidin 34 aminohapon DNA-sekvenssi, sitten alaniinin sekvenssi ja sitten fenyylialaniinin sekvenssi ja loput hGH-sekvenssistä. Plasmidissa pSYC748 on yhteenliittyneellä geenillä penPS₂₇-signaalipeptidin 34 aminohapon DNA-sekvenssi ja sen jälkeen täydellinen, ihmisen kypsän hGH-proteiinin sekvenssi. Osa pSYC748:ssa ja pSYC778:ssa olevista yhteenliittyneistä geeneistä on esitetty kuvassa 6.

Esimerkki IXLisää nukleotidejä priimerillä ohjattuun mutatointiin

Seuraavat oligonukleotidit valmistettiin menetelmällä M. Matteucci ja M. Carruthers, J. Am. Chemical Soc., 103, 3185-3991 (1981) käyttämällä automaattista syntetisaattoria (Model Sam One, Biosearch, Inc., San Rafael, California):

3'-GTCCTAGAGGATTGTT-5', nimeltään oligonukleotidi $S_{27}P_{28}$; ja
3'-GCAGCGCGGTCTAGAACGTCCT-5', nimeltään oligonukleotidi PD_{24} .

Lisäksi valmistettiin seuraava oligonukleotidi samalla tavalla kuin oligonukleotidit $S_{27}P_{28}$ ja PD_{24} :

3'-AACGTCCCCGCGGATTGT-5', nimeltään oligonukleotidi $A_{27}P_{28}$.

Esimerkki X

Muita B. licheniformis 749/C-penisillinaasigeenejä, joissa on mutaatioita signaaliptidiä koodittavassa DNA-sekvenssissä, ja mutatoituneita geenejä sisältäviä sekvenssejä

A. Mutantti, jossa on seriini asemassa 27 ja proliini asemassa 28 (pSYC947)

Priimerillä ohjattu mutatointi suoritettiin noudattamalla esimerkin II mukaisia menetelmiä (oleellisesti ottaen julkaisun Zoller ja Smith (1981), supra, mukaisesti) käyttämällä E. coli JM103:a, faagia M13penPS₂₇ ja RF-DNA:ta ja näistä valmistettua yksisäikeistä DNA:ta ja priimerinä esimerkissä IX valmistettua oligonukleotidia $S_{27}P_{28}$, joka oli 5'-fosforyloitu. Eristettiin M13 RF-DNA, jossa sekvenssi 5'-TCCGCT-3' penisillinaasin kodoneissa 27 ja 28 (so. kodonit, jotka vastaavat aminohappoja 27 (Ser) ja 28 (Ala) Ser₂₇-penisillinaasin signaalsekvenssissä) oli muunnettu 5'-TCTCCT-3':ksi, Ser ja Pro. Tällaisen mutantin seulonta suoritettiin käyttämällä DNA-oligonukleotidi-hybridisaatiokoetusta, jota on selostettu julkaisussa Zoller ja Smith (1981), supra, ss. 6492, 6493 ja 6496, ja käyttämällä radioaktiivisesti merkittyä oligonukleotidia $S_{27}P_{28}$ koettimena. Yksisäikeinen DNA eristettiin E. coli JM103:n viljelmien emäliuoksista, kun bakteeri oli transformoitu mutatoituneella,

kovalenttisesti suljetulla, rengasmaisella, kaksisäikeisellä RF-DNA:lla. Varmuus siitä, että seulonnalla eristetty faagi oli haluttu faagi, jossa oli penPS₂₇^P₂₈, saatiin suorittamalla restriktioanalyysi eristetyn faagin RF-DNA:lle. Analyysissä paljastui BamHI-kohdan menetys, kuten oli odotettu. Aminohappojen 26 ja 27 kodonit penPS₂₇:ssä ovat 5'-GGATCC-3'. Tämä sekvenssi on BamHI:n tunnistuskohda. Koska penPS₂₇^P₂₈:ssa seriinin kodoni on muuttunut TCT:ksi, on BamHI-kohta menetetty. Näin saadun faagin nimi on M13penPS₂₇^P₂₈.

Edellä esimerkissä II kuvattu plasmidi pSYC660 pilkottiin osittain BamHI:llä käyttämällä tätä restriktioentsyymiä tavallisissa täyden pilkkomisen olosuhteissa, mutta antamalla reaktion edetä alle puolet siitä ajasta, joka tarvitaan täydelliseen pilkkoutumiseen, ja osittain pilkkoutuneiden plasmidien lomittaiset päät korjattiin käyttämällä E. coli DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasta ja tarvittavia dNTP-laatuja. Näin saadut tylppäpäiset, linearisoidut plasmidit liitettiin yhteen käyttämällä T4 DNA-ligaasia. E. coli K-12/CS412-solut transformoitiin näin saaduilla plasmideilla. Transformantit valittiin ampisilliinin vastustuskyvyn suhteen ja sitten seulottiin esiin plasmidi, jossa oli yksi BamHI-kohta.

pSYC660:ssa on kaksi BamHI-kohtaa: yksi seriini₂₇:n kodonissa penPS₂₇-geenissä (ks. esimerkkiä II, edellä) ja toinen noin 1,32 kbp:n (kiloemäspari) HindIII-BamHI-palasan toisessa päässä, joka palanen sisältää penPS₂₇-geenin. Plasmidit, jotka oli katkaistu osittaisella BamHI-katkaisulla penPS₂₇:n seriini₂₇-kodonin BamHI-kohdasta, eivät olisi olleet ampisilliinille vastustuskykyisiä, koska tällaisen vastustuskyvyn saa aikaan penisillinaasigeeni, joka ei olisi ilmentynyt sen jälkeen, kun geeni oli katkaistu ja sitten uudestaan liitetty (korjatuin, tylpennetyin päin), kuten edellä on kuvattu. Näin ollen valinta ampisilliinin vastustuskyvyn suhteen jätti jäljelle vain sellaiset transformantit, joiden plasmideissa oli ehjä BamHI-kohta seriini₂₇-asemassa penPS₂₇:ssä. Jotkut valituista

transformanteista kantoivat plasmideja, jotka olivat menettäneet toisen BamHI-kohdan pSYC660:ssa, so. BamHI-kohdan, joka oli noin 1320 emäsparin HindIII-BamHI-palasen toisessa päässä. Kun seulottiin transformantit sellaisten plasmidien suhteen, joissa oli yksi ainut BamHI-kohta, löydettiin plasmidi pSYC667.

Plasmidi pSYC667 on sama kuin pSYC660, mutta erona on se, että pSYC667:ssä on sekvenssi 5'-GGATCGATCC-3' siinä, missä pSYC660:ssa on BamHI-tunnistussekvenssi (5'-GGATCC-3') noin 1320 emäsparin HindIII-BamHI-palasen päässä.

Plasmidi pSYC667 on säilyttänyt plasmidin pSYC660 PstI- ja BglII-tunnistuskohdat (ks. esimerkki II edellä). Samoin penPS₂₇P₂₈-geenin sisältävässä M13penPS₂₇P₂₈:n HindIII-BamHI-palasessa on PstI-kohta ja BglII-kohta samoissa paikoissa kuin PstI-kohta ja BglII-kohta vastaavasti siinä pSYC667:n palasessa, joka sisältää HindIII-BamHI-penPS₂₇:n.

pSYC667 pilkottiin PstI:llä ja BglII:lla ja suuri palanen eristettiin geelieluutiolla.

M13penPS₂₇P₂₈ pilkottiin PstI:llä ja BglII:lla ja pieni palanen, joka sisälsi penPS₂₇P₂₈:n, eristettiin geelieluutiolla.

pSYC667:stä saatu suuri PstI-BglII-palanen ja M13penPS₂₇P₂₈:sta saatu pieni PstI-BglII-palanen liitettiin yhteen käyttämällä T4-DNA-ligaasia ja E.coli K-12/CS412 transformoitiin näin saaduilla plasmideilla. Yksi jatkotutkimukseen valittu transformantti sisälsi plasmidin pSYC947, kuten oli odotettu, ja siinä oli penPS₂₇P₂₈-geeni, mutta ei BamHI-katkaisukohtaa. pSYC947 on identtinen pSYC667:n kanssa, mutta pSYC667:n penPS₂₇-geeni on korvattu penPS₂₇P₂₈:lla pSYC947:ssä.

Osa pSYC947:n penPS₂₇P₂₈-geenistä on esitetty kuvassa 5. Kodoni TCG, jonka yläpuolella on rengastettu "I" pSYC947:n sekvenssissä, koodittaa B. licheniformisin suuren eksopenisilli-

naasin N-pään seriiniä. pSYC947:n kuvassa olevat vaakasuorat viivat, jotka sijaitsevat TCTCCT:stä vasemmalle, CCT:n ja TCG:n välissä ja TCG:stä oikealle, tarkoittavat nukleotidisekvenssejä, jotka ovat identtisiä villityyppisessä geenissä samoissa paikoissa olevien kanssa, jotka on esitetty kuvassa 5 plasmidille pSYC310-2.

B. Mutantti, jossa on alaniini asemassa 27 ja proliini asemassa 28 (pSYC947A)

Esimerkin X(A) menetelmiä käyttämällä suoritetaan priimerillä ohjattu mutatointi M13-faagin nimeltään M13penPA₂₇P₂₈ valmistamiseksi, jossa on B. licheniformis 749C:n penisillinaasigeeni mutatoituneena seuraavalla tavalla: glysiinin kodoni 26 GGA muuttunut glysiinin kodoniksi GGG, kysteiinin kodoni 27 TCG muuttunut alaniinin kodoniksi GCG ja alaniinin kodoni 28 GCT muuttunut proliinin kodoniksi CCT. Toimenpide suoritetaan käyttämällä esimerkistä IX saatua 5'-fosforyloitua oligonukleotidiä A₂₇P₂₈ ja faagin M13penPA₂₇ DNA:ta (esimerkki III). Faagista M13penPA₂₇P₂₈ saadussa RF-DNA:ssa on noin 650 emäsparin AluI-restriktiopalanen pituudeltaan noin 310 bp:n ja 340 pb:n AluI-restriktiopalasten tilalla, jotka ovat faagissa M13penPA₂₇. Lisäksi faagin M13penPA₂₇ RF-DNA sisältää NarI-restriktiokohdan, jota faagin M13penPA₂₇ RF-DNA:ssa ei ole. Nämä restriktiokohtien erot ilmenevät verrattaessa toisiinsa aminohappojen 26, 27 ja 28 kodonien sekvenssejä penPA₂₇:ssä (5'-GGAGCTGCT-3') ja penPA₂₇P₂₈:ssä (5'-GGGGCGCCT-3'). Näitä restriktiokohtien eroja käytetään sellaisten faagien tunnistamisessa, jotka ovat saaneet A₂₇P₂₈-mutaation.

Plasmidi pSYC310-2 pilkotaan HindIII:lla ja BamHI:llä ja suuri palanen eristetään geelieluutiolla.

M13penPA₂₇P₂₈ RF-DNA pilkotaan HindIII:lla ja BamHI:llä ja penPA₂₇P₂₈ sisältävä 1320 emäsparin palanen eristetään geielieluutiolla.

pSYC310-2:sta saatu suuri HindIII-BamHI-palanen ja M13penPA₂₇P₂₈:sta saatu noin 1320 bp:n HindIII-BamHI-palanen liitetään yhteen käyttämällä T4 DNA-ligaasia ja E. coli K-12/CS412 transformoidaan näin saaduilla plasmideilla. Transformantit valitaan ampisilliininvastustuskyvyn suhteen. Yksi ampisilliinille vastustuskykyinen transformantti valittiin jatkotutkimuksiin ja siitä löytyi plasmidi pSYC947A, jossa oli noin 1050 bp:n pituinen NarI-restriktiopalanen, jota ei löytynyt pilkottaessa plasmidi pSYC660A NarI:llä, kuten onkin odotettua, sillä pSYC947A:n penPA₂₇P₂₈-geenissä on NarI-kohta.

Osa pSYC947A:n penPA₂₇P₂₈-geenistä on esitetty kuvassa 5.

Polypeptidi, joka on liitetty pSYC947A:n penPA₂₇P₂₈-signaali-sekvenssissä asemassa 34 olevan alaniinin taakse ja transformoitu E. coliin tai B. subtilikseen, erittyy suuremmalla teholla kuin sama polypeptidi liitettynä B. licheniformisin villityyppisen signaali-sekvenssin asemassa 34 olevan alaniinin taakse. Se pSYC947A:n penPA₂₇P₂₈:n ilmentämän penisillinaasin osuus, jonka tällä plasmidilla transformoituneet E. coli ja B. subtilis erittävät on suurempi kuin se villityyppisen penP-geenin ilmentämän penisillinaasin osuus, jonka vastaavat plasmidilla (esim. pSYC310-2, jossa on villityyppinen geeni) transformoituneet bakteerit erittävät.

C. Mutantti, jossa on dipeptidi NH₂-Pro-Asp-CO₂OH sijoitettuna asemassa 23 olevan alaniinin ja asemassa 24 olevan leusiinin väliin, ja jossa on seriini mieluummin kuin kysteiini asemassa 27 (pSYC957)

Esimerkin X(A), supra, mukaisesti suoritettiin priimerillä ohjattu mutatointi M13-faagin M13penPS₂₇:PD₂₄ valmistamiseksi, jossa oli B. licheniformis 749/C:n penisillinaasigeeni, joka sisälsi seuraavat mutaatiot: proliinin ja asparagiinihapon kaksi kodonia (5'-CCAGAT-3') sisältävä liitännäinen alaniinin kodonin 23 (GCG) ja leusiinin kodonin 24 (CTT) välissä sekä kodoni 27 (kodoni 29 mutatoituneessa geenissä) on muuttunut TCG:stä (kysteiini) TCC:ksi (seriini).

Toimenpide suoritettiin käyttämällä esimerkin IX mukaista 5'-fosforyloitua oligonukleotidia PD₂₇ ja faagin M13penPS₂₇ DNA:ta (esimerkki II).

M13-faagin RF-DNA, jossa on haluttu penPS₂₇::PD₂₇-mutantti-geeni, on säilyttänyt kodonit 26 ja 27 penPS₂₇:ssä (kodonit 28 ja 29 penPS₂₇::PD₂₄:ssä) ja siinä on BglIII-kohta kodoneissa 24, 25 ja 26 (5'-CCAGATCTT-3'). Haluttua mutanttigeeniä kantaavan faagin seulonta suoritettiin käyttämällä hybridisaatio-koetustekniikkaa [Zoller ja Smith (1981), supra⁷], kuten esimerkiksi X(A), ja radioaktiivisesti merkittyä oligonukleotidia PD₂₄. Varmuus siitä, että seulomalla löydetty faagi oli haluttu M13penPS₂₇::PD₂₄-faagi, saatiin suorittamalla faagin RF-DNA:lle restriktioanalyysi, ja se osoitti, että läsnä oli odotettu BglIII-lisäkohta verrattuna M13penPS₂₇:n tai M13-CM1:n RF-DNA:han.

Esimerkin X(A) plasmidi pSYC667 pilkottiin BamHI:llä ja osittain HindIII:lla ja suuri palanen eristettiin geelielutiolla. (Osittainen pilkkominen suoritettiin standardiolosuhteissa, mutta aika rajoitettiin puoleen siitä, mikä tarvitaan täydelliseen pilkkomiseen.)

Faagin M13penPS₂₇::PD₂₄ RF-DNA pilkottiin BamHI:llä ja HindIII:lla ja pieni, noin 320 emäsparin palanen, jossa oli penP-promoteri ja penPS₂₇::PD₂₄-signaalipeptidin ensimmäisiä 28 aminohappoa koodittava sekvenssi, eristettiin geelielutiolla.

pSYC667:n suuri HindIII-BamHI-palanen ja M13penPS₂₇::PD₂₄ RF-DNA:n pieni BamHI-HindIII-palanen, jota on selostettu edellisessä kappaleessa, liitettiin yhteen käyttämällä T4-ligaasia. E. coli K-12/CS412-solut transformoitiin näin saaduilla plasmideilla ja transformantit seulottiin ampisilliinivastustuskyvyn ja kloramfenikolivastustuskyvyn suhteen. Jatkotutkimuksiin valittiin yksi ampisilliinille ja kloramfenikolille vastustuskykyinen transformantti ja sen havaittiin sisältävän plasmidin

pSYC957, joka on identtinen plasmidin pSYC667 kanssa paitsi, että pSYC667:n penPS₂₇-geeni on korvattu penPS₂₇::PD₂₄-geenillä pSYC957:ssä.

Osa plasmidin pSYC957 penPS₂₇::PD₂₄-geenistä on esitetty kuvassa 5.

Esimerkki XI

Muita yhteenliitettyjä geenejä, joissa on muunnettuja B. licheniformis 749/C-signaaliptidejä koodittavia sekvenssejä ja ihmisen kasvuhormonia koodittava sekvenssi, sekä näitä yhteenliitettyjä geenejä sisältäviä plasmideja

A. Plasmidi, jossa on penPS₂₇::PD₂₄:n koodittamien N-pään 30 aminohapon sekvenssi liittyneenä ihmisen kasvuhormonia koodittavaan sekvenssiin (pSYC970)

Plasmidi pSYC957, jossa oli penPS₂₇::PD₂₄ /esimerkki X(C)7, pilkottiin BamHI:llä sen sisältämästä yhdestä ainoasta tällaisesta kohdasta, joka sijaitse plasmidissa kodoneissa 28 ja 29 penPS₂₇::PD₂₄:ssä. Syntyneet lomittaiset päät korjattiin E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella ja neljällä dNTP-laadulla. Sitten näin saadut tylppäpäiset, linearisoidut plasmidit katkaistiin EcoRI:llä, jolla on myös yksi ainut kohta plasmidissa, ja joka kohta vastaa ainutta EcoRI-kohtaa plasmidissa pSYC310-2 /McLaughlin et al. (1982), supra, joka on sukua pSYC957:lle pSYC667:n ja pSYC660:n kautta (ks. esimerkkiä II ja esimerkkiä X(C)7. Sitten pieni palanen, joka ulottui EcoRI:stä tylpäksi tehtyyn BamHI-päähän, eristettiin geeli-eluutiolla.

Plasmidi pSYC709 (esimerkki V) katkaistiin HindIII:lla, jolla on yksi ainut kohta plasmidissa (ks. kuva 4). Saadut lomittaiset päät korjattiin E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella ja neljällä dNTP-laadulla. Sitten tylppäpäinen, linearisoitu plasmidi katkaistiin EcoRI:llä tästä ainoasta kohdasta (ks. kuva 4).

pSYC957:stä saatu pieni palanen, joka ulottui EcoRI:stä tylppään BamHI-päähän, ja pSYC709:stä saadut palaset, jotka ulottuivat EcoRI:stä tylppään HindIII-päähän, sekoitettiin keskenään ja liitettiin yhteen käyttämällä T4 DNA-ligaasia tylppien päiden liittämiseen sopivissa olosuhteissa. Näin saadulla seoksella transformoitiin *E. coli* K-12/CS412 ja transformantit valittiin ampisilliininvastustuskyvyn suhteen. Yksi ampisilliinille vastustuskykyinen transformantti valittiin jatkotutkimuksiin ja sen havaittiin kantavan plasmidia pSYC970.

Plasmidi pSYC970 on esitetty kuvassa 6. Se on sama kuin pSYC720 paitsi, että pSYC720:n koodittamassa penisillinaasi-signaalisekvenssimutantissa on kaksi lisäaminohappoa, proliini asemassa 24 ja asparagiinihappo asemassa 25, kuin pSYC720:n koodittamassa penisillinaasisignaalisekvenssimutantissa.

Se pSYC970:n sekvenssi, jossa on signaalipeptidi liittyneenä ihmisen kasvuhormonin sekvenssiin, koodittaa penPS₂₇::PD₂₄:n mukaisesti signaalipeptidin N-pään 30 ensimmäistä aminohappoa.

pSYC970:lla transformoituneen *E. coli*n ja *B. subtilis*en erittämä ihmisen kasvuhormoni on ihmisen kypsä kasvuhormoni, jonka N-päässä on Phe.

B. Plasmidi pSYC962, jossa on penPS₂₇P₂₈:n sisältämä signaalipeptidin sekvenssi ja lisäksi alaniini mainitun signaalipeptidisekvenssin karboksipäässä, ja tämä sekvenssi on liittynyt ihmisen kasvuhormonia koodittavaan sekvenssiin

Plasmidi pSYC947 (esimerkki X) pilkottiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja MspI. Plasmidissa on yksi ainut EcoRI-kohta, joka vastaa plasmidin pSYC310-2 ainutta EcoRI-kohtaa. Plasmidissa on myös MspI-kohta (myös HpaII-kohta) kodoneissa, jotka vastaavat aminohappoja 71 ja 72 penisillinaasissa [ks. J. Kroyer ja S. Chang (1981), *supra*]. Noin 450 emäsparin EcoRI-MspI-palanen eristettiin geelieluutiolla.

Plasmidi pSYC709 (esimerkki V) katkaistiin ainoasta EcoRI-kohdastaan (ks. kuva 4) ja sen jälkeen suoritettiin katkaisu ainoasta ClaI-kohdasta, joka on EcoRI-kohdan ja HindIII-kohdan välissä kuvassa 4. pSYC947:stä saatu 450 emäsparin EcoRI-MspI-palanen liitettiin EcoRI-ClaI-katkaistuun pSYC709:ään ja liittämisen suoritettiin käyttämällä T4 DNA-ligaasia. *E. coli* K-12/CS412 transformoitiin näin syntyneillä plasmideilla ja transformantit valittiin ampisilliininvastustuskyvyn suhteen. Yksi ampisilliinille vastustuskykyinen transformantti tutkittiin tarkemmin ja sen havaittiin sisältävän plasmidin pSYC956, jossa oli odotettu liitännäinen pSYC709:n EcoRI- ja ClaI-kohdan välissä.

pSYC956:ssa on sama sekvenssi ainoan EcoRI-kohdan ja sen pSYC709:stä johdetun HindIII-kohdan välissä kuin pSYC778:lla on ainoan EcoRI-kohtansa ja asemassa 35 olevan alaniinikodonin GCT välissä plasmidia pSYC778 esittävässä kuvassa 6 paitsi, että (i) pSYC956:n signaalipeptidi on penPS_{27P28}:n (ks. pSYC947 kuvassa 5) koodittama, kun taas pSYC778:ssa on penPS₂₇:n koodittama signaalipeptidisekvenssi (ks. pSYC660 kuvassa 2); tämä ero merkitsee pSYC956:n signaalsekvenssikoodin kodonien 27 ja 28 TCTCCT muuttumista TCCGCT:ksi samoissa asemassa olevissa kodoneissa pSYC778:ssa; (ii) pSYC956:ssa on 117 emäsparia muunnetun signaalsekvenssin asemassa 34 olevan alaniinikodonin sekä alaniinikodonin GCT välissä, joka on välittömästi ihmisen kypsän kasvuhormonin N-pään kodonin TCC edessä sekä pSYC956:ssa että pSYC778:ssa, kun taas pSYC778:sta puuttuvat nämä 117 emäsparia (jotka koodittavat ensimmäisiä 38 aminopään aminohappoa *B. licheniformis* 749/C:n suuressa eksopenisillinaasissa /ks. Kroyer ja Chang (1981), *supra*7, ja 3'-päässä on luennanlopetussignaali (UAA); ja (iii) pSYC956:ssa on noin 30 emäsparia sen EcoRI-kohdan ja sen pSYC947:stä johdetun HindIII-kohdan C:n välissä, jotka eivät sijaitse välittömästi pSYC778:n EcoRI-kohdan T:n takana, joka on lähinnä penP-promoteria plasmidissa.

Plasmidi pSYC956 linearisoitiin EcoRI:llä ja saadut ulostyöntyvät päät poistettiin käsittelemällä DNA:ta (50 mikrogrammaa/ml) 30 minuuttia 22°C:ssa Sl-nukleaasilla (220 U/ml) puskurissa (pH 4,6), jossa oli 300 mM NaCl, 60 mM ZnSO₄ ja 50 mM Na-asetaattia. Ks. Maniatis et al. (1982), s. 140. 30 minuutin jakson jälkeen DNA uutettiin fenolilla ja saostettiin etanolilla.

Plasmidi pSYC778 linearisoitiin BamI:llä (hGH:ta koodittavassa sekvenssissä olevassa kohdassa) ja syntyneet ulostyöntyvät päät poistettiin Sl-nukleaasilla samalla tavalla kuin ulostyöntyvät päät poistettiin EcoRI:lla katkaistusta pSYC956:sta. Sl-käsittelyn jälkeen DNA uutettiin fenolilla ja saostettiin etanolilla.

pSYC956:sta ja pSYC778:sta saadut DNA-pelletit suspendoitiin yhdessä, 25 mikrogrammaa/ml kutakin, liittämispuskuriin, pH 7,5, jossa oli 20 mM Tris, 100 mM NaCl ja 0,05 mM EDTA. Liuosta, joka oli 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa, kuumennettiin 1 minuutti kiehuvaan vesihauteeseen ja sen jälkeen sitä pidettiin vielä 1-3 minuuttia 90°C:een hauteella ja sen jälkeen jäähdytettiin hitaasti 4 tunnin kuluessa 30°C:een. Tämän käsittelyn seurauksena muodostui rengasmaisia heterokahdenne-DNA-molekyylejä (sekä homokahdenteita, jotka linearisoitujen plasmidien tylpentämisen vuoksi eivät kyenneet muodostamaan renkaita uudelleen).

Heterokahdennerenkaita sisältävällä DNA-seoksella transformoitiin E. coli K-12/CS412, jossa muodostui yhdistelmäplasmideja heterokahdenteiden in vivo-korjauksen tuloksena. Transformantit valittiin ampisilliininvastustuskyvyn suhteen. Jatkotutkimukseen valittiin useita ampisilliinille vastustuskykyisiä transformantteja. Yksi sisälsi plasmidin pSYC962, joka on identtinen plasmidin pSYC778 kanssa paitsi, että pSYC778:n muunnetussa penP-geenissä olevat 27. ja 28. aminohappoa koodittavat kodonit TCC GCT (Ser-Ala) on korvattu

kodoneilla TCT CCT (Ser-Pro) pSYC962:n muunnetussa penP-geenissä. Ks. kuva 6.

•

Plasmidi pSYC962 voidaan myös muodostaa edellä kuvatulla heterokahdentamismenetelmällä käyttämällä pSYC956:tta, joka katkaistaan EcoRI:llä ja sen jälkeen päät tylpennetään E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-palasella neljän dNTP-laadun läsnäollessa eikä S1-nukleaasilla, sekä pSYC778:aa, joka katkaistaan BglII:lla ja tehdään myös tylopäksi käyttämällä Klenow-palasta ja ATP:tä sekä TTP:tä S1-nukleaasilla tapahtuvan hajoituksen sijasta.

C. Jakautumiskykyinen plasmidi, jossa on penPS₂₇:n sisältämä signaalipeptidin sekvenssi N-pään 28 aminohapon osalta liittyneenä ihmisen kasvuhormonia koodittavaan sekvenssiin (pSYC852)

Jotta plasmidi säilyisi stabiilina soluviljelmän soluissa, pitää sen olla joko "jakautumiskykyinen" siten, että jakautuvan solun kumpikin tytär solu saa vähintään yhden plasmidikopion, tai sen täytyy antaa sellainen fenotyyppi, joka viljelmän soluilla täytyy olla pysyäkseen elossa viljelyolosuhteissa.

Tavallisesti geenitekniikalla aikaansaatu plasmidi sisältää antibiootinvastustuskyvyn antavan geenin tai geenejä, jotka antibiootit olisivat letaalisia soluille, elleivät transformoituneet solut kantaisi antibiootinvastustuskykygeeniä (geenejä). Plasmidia pidetään yllä kasvavien solujen viljelmissä sisällyttämällä kasvualustaan antibiootti (jonka suhteen plasmidin sisältämä geeni antaa vastustuskyvyn). Vain plasmidin sisältävät solut pysyvät elossa. Jos antibiootti jätetään pois kasvualustasta, plasmidia kantavien solujen määrä viljelmässä vähenee nopeasti tyypillisesti saavuttaen nollan vähemmän kuin 25 kahdentumisen kuluessa, mutta nopeudet vaihtelevat suuresti, ellei plasmidi sitten ole "jakaantumiskykyinen".

Koska antibiootit ovat kalliita ja hankaloittavat geenitekniikalla aikaansaaduilla plasmideilla transformoitujen solujen tuotteiden (esim. ravinto- tai hoitokäyttöön tarkoitettut proteiinit) puhdistamista, on edullista käyttää "jakaantumiskykyisiä" plasmideja, jotka näin ollen säilyvät stabiileina soluviljelmissä tarvitsematta antibioottia kasvualustaan.

Jakaantumiskyky *E. coli*ssa saadaan aikaan plasmideille lyhyellä DNA-jaksolla, jonka Meacock ja Cohen, *Cell* 20, 529-542 (1980), ovat tunnistaneet.

Gram-positiivisissa bakteereissa, *B. subtilis* mukaanluettuna, antaa plasmideille jakaantumiskyvyn lyhyt DNA-jakso (jota tässä nimitetään "par"-jaksoksi), joka sijaitsee plasmidissa pOG2381 noin 350 emäsparin HindIII-HaeIII-palasen sisällä, kuten on selostettu julkaistussa eurooppalaisessa patenttihakemuksessa O 095 947, joka perustuu US-patenttihakemukseen 470 576, jätetty virastoon 28. helmikuuta 1983, joka puolestaan on nyt esillä olevan patentin hakijan nimissä ja sisällytetään tähän viitteeksi.

Seuraavalla tavalla saatiin par-jakso, jonka sekvenssi rajoittuu edullisesti HindIII-kohtiin:

Plasmidi pOG2326 pilkottiin BamHI:llä ja linearisoidun plasmidin lomittaiset päät tehtiin tylpiksi *E. coli*in polymeraasi I:n Klenow-palasella neljän dNTP:n läsnäollessa. Sitten tylppäpäinen, lineaarinen palanen katkaistiin HindIII:lla ainoasta HindIII-kohdastaan. Näin saatu lineaaristen palasten seos yhdistettiin sekvenssiin, jossa oli noin 350 emäsparin HaeIII-HindIII-par-jakso, joka oli eristetty geelieluutiolla pOG2381:n palasista, jotka oli saatu suorittamalla pilkkominen HindIII:lla ja HaeIII:lla. Seos, jossa oli 350 emäsparin HaeIII-HindIII-par-jakson sisältävä sekvenssi ja kaksi pOG2326:sta saatua jaksoa, jotka ulottuivat HindIII:sta tylppäpäiseen BamHI:hin, liitettiin yhteen T4 DNA-ligaasilla tylppäpäiseen yhteenliittämiseen soveltuvissa olosuhteissa. *E. coli* K-12/CS412 trans-

formoitiin näin saaduilla plasmideilla ja transformantit seulottiin sen suhteen, oliko niissä HindIII-BamHI-palanen, jonka koko oli lähes sama kuin HaeIII-HindIII-par-sekvenssin sisältävällä jaksolla. (Kun HaeIII:lla leikattu pää liitetään tylppäpäiseen BamHI:llä leikattuun päähän, saadaan uudestaan aikaan BamHI-kohta.) Tällainen transformantti löytyi ja sille annettiin nimi pSYC676.

pSYC676:ssa on ClaI-kohta muutaman emäsparin päässä HindIII-kohdasta, mutta se on par-sekvenssin sisältävän HindIII-BamHI-palasan ulkopuolella.

pSYC676 linearisoitiin BamHI:llä ja ulostyöntyvät päät täytettiin *E. coli* polymeraasi I:n Klenow-palaselä ja neljällä dNTP:llä ja päät liitettiin yhteen käyttämällä T4 DNA-ligaasia tylppien päiden yhteenliittämisolosuhteissa. Tämän toimenpiteen tuloksena BamHI-kohta (GGATCC) muuttui ClaI-kohdaksi (alleiviivattu) (GGATCGATCC). Näin saatu plasmidi pSYC676CLA pilkotaan ClaI:llä ja noin 360 emäsparin mittainen, par-jakson sisältävä sekvenssi eristetään geelieluutiolla ja yhdistetään pBR322:een, joka on katkaistu ClaI:lla ainoasta ClaI-kohdastaan. Palaset liitetään yhteen T4 DNA-ligaasilla ja syntyneillä plasmideilla kloonataan *E. coli* K-12/CS412. Plasmidi pSYC756BR eristetään ampisilliinille vastustuskykyisestä transformantista ja restriktioanalyysillä löydetään seuraava par-jakson sisältävän alueen vieressä olevien ClaI- ja HindIII-kohtien ryhmittely: ClaI - HindIII -- par -- ClaI - HindIII.

Sellaisen plasmidin, kuten pSYC756BR, jossa on ClaI-HindIII--par-ClaI-HindIII-jakso, rakentamisessa voidaan käyttää pBR322:n tilalla mitä tahansa plasmidia, jossa on yksi ainut ClaI-kohta ja HindIII-kohta, joka mielellään on ainut ja sijaitsee noin 10 emäsparin sisällä ClaI-kohdasta lukien. Yksi tällainen vaihtoehtoinen plasmidi on pJH101, jota on selostettu julkaisussa *Jour. Bacteriol.* 154, 1513-1515 (1983).

pJH101:tä, joka oli katkaistu ainoasta ClaI-kohdastaan, käytetään plasmidin pSYC756 rakentamisessa ClaI:llä katkaistun pSYC676CLA:n kanssa samalla tavalla kuin edellä on selostettu pBR322:n käyttöä pSYC756BR:n rakentamisessa. pSYC756:ssa on noin 350 emäsparin pituinen ClaI-HindIII--par--ClaI-HindIII-palanen, joka on identtinen pSYC756BR:n vastaavan jakson kanssa.

pSYC756:sta saatu HindIII-kohtiin rajoittuva, par-sekvenssin sisältävä palanen eristettiin geelieluutiolla HindIII:lla pilkotun plasmidin palasista ja sekoitettiin pSYC720:n (esimerkki VII) kanssa, joka oli linearisoitu HindIII:lla ainoasta HindIII-kohdastaan. Seos liitettiin yhteen T4 DNA-ligaasilla ja *E. coli* K-12/CS412 transformoitiin näin saaduilla plasmideilla. Transformantit valittiin ampisilliinivastustuskyvyn suhteen ja niistä seulottiin plasmidi, jossa oli par-sekvenssin sisältävä jakso sijoittuneena kahden HindIII-kohdan väliin. Tällainen transformantti löytyi ja sen sisältämälle plasmidille annettiin nimeksi pSYC852.

pSYC852 on esitetty kuvassa 6. Se on sekvenssiltään identtinen pSYC720:n kanssa lukuunottamatta par-jaksoa, joka on sijoitettu pSYC720:een HindIII-kohtaan, joka on penP-promoterin yläpuolella. HindIII-kohdan sijainti penP-promoterin sijainnin suhteen pSYC720:ssa on sama kuin HindIII-kohdan sijainti penP-promoterin sijainnin suhteen pSYC310-2:ssa. Ks. McLaughlin et al. (1982), supra.

pSYC852 on jakaantumiskykyinen.

Kun pSYC852:lla transformoitunutta *B. subtilis* BD224:ää viljellään kasvualustaessa, jossa ei ole antibioottia, se tuottaa yhtä paljon ihmisen kasvuhormonia kuin pSYC720:lla transformoitunut *B. subtilis* SCR667 viljeltäessä sitä kloramfenikolipitoisessa kasvualustassa. (pSYC720:ssa on kloramfenikolinvastustuskykygeeni, joka on johdettu pSYC310-2:sta.) pSYC720 menetetään nopeasti *B. subtilis*-viljelmistä, joissa ei ole antibioot-

tia; näin ollen ihmisen kasvuhormonin tuotanto solua kohti laskee tällaisissa viljelmissä kasvun jatkuessa.

Esimerkki XII

Yhteenliitetty geeni, joka sisältää seriini₂₇:llä muunnettua *B. licheniformis*-signaaliipeptidiä koodittavan sekvenssin ja seriini₁₂₅-interleukiini-2-polypeptidiä koodittavan sekvenssin

Interleukiini-2 (IL-2), jota nimitetään myös T-solujen kasvutekijäksi, on lesitiinillä tai antigeenillä aktivoituneiden T-solujen tuottama lymfokiini. Kuten interferonit, myös IL-2 auttaa luontaisten tappajasolujen aktiivisuutta ja se on hyödyllinen kasvainsairauksien hoidossa. IL-2:lla on myös lukuisia muita terapeuttisia ja diagnostisia sovellutuksia. Ks. D. Mark et al., eurooppalainen patenttihakemus 83306221.9.

Ihmisen IL-2:ta koodittavan geenin nukleotidisekvenssi ja sellaisen ilmentämisvektorin valmistus, joka tuottaa biologisen IL-2-aktiivisuuden omaavaa ihmisen IL-2-polypeptidiä bakteereissa, on selostettu julkaisuissa Taniguchi et al., *Nature*, 302, 305-310 (1983) ja Mark et al., euroopan patenttihakemus 83306221.9, supra.

Käyttämällä vastaavia menetelmiä kuin mitä tässä selostuksessa on käytetty liitetään ihmisen IL-2-polypeptidiä koodittava sekvenssi toimivasti tämän keksinnön mukaista muunnettua signaaliipeptidiä koodittavaan sekvenssiin, kuten pSYC720 tai pSYC778, ja isäntävä toimiva *E. coli* (esim. *E. coli* K-12/MM294 tai *E. coli* K-12/CS412) tai *B. subtilis* (esim. *B. subtilis* BD224), jossa yhteenliitettyä geeniä kantava plasmidi kykenee replikoitumaan, transformoidaan plasmidilla, jonka jälkeen ihmisen IL-2-polypeptidiä ilmentyy ja erittyy kypsässä muodossa.

Esimerkki XIII

Muunnettujen signaalisekvenssien analyysi *E. coli* ja *B. subtilis* erittämistapahtumassa

A. *E. coli* transformointi

Kaikki *E. coli* transformoinnit tässä esimerkissä käytetyillä plasmideilla sekä muualla tässä hakemuksessa selostetut transformoinnit suoritettiin menetelmällä Cohen, Chang ja Hsu, Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.) 69, 2110 (1973). Ks. myös Maniatis et al. (1982), supra ss. 249-255.

B. *B. subtilis* transformointi

Kaikki *B. subtilis* transformoinnit tässä esimerkissä käytetyillä plasmideilla sekä muualla tässä hakemuksessa selostetut transformoinnit suoritettiin menetelmällä, joka vastasi julkaisussa Anagnostopoulos ja Spizizen, J. Bacteriol., 741-746 (1961) selostettua menetelmää.

10 x Spizizen I-minimiliuos valmistettiin sekoittamalla tislattua veden avulla aikaansaatuun 1 litran kokonaistilavuuteen 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140 g K_2HPO_4 , 60 g KH_2PO_4 ja 10 g Na-sitraattia.

Spizizen I-kasvualusta valmistettiin sekoittamalla 2,05 ml 1M MgSO_4 ; 6 ml 50-prosenttista (paino-osina) glukoosia; 5 ml 10-prosenttista (paino-osina) hiivauutetta; 5 ml 2-prosenttista (paino-osina) kaseiinihydrolysaattia; 2,5 ml 1-prosenttisena (paino-osina) liuoksena kutakin kannan transformoitumiseen tarvittavaa aminohappoa; 50 ml 10 x Spizizen I-minimiliuosta; ja niin paljon tislattua vettä, että liuoksen kokonaistilavuudeksi tulee 500 ml. *B. subtilis* BD224:lle ja *B. subtilis* BD170:lle ovat tarvittavat aminohapot treoniini ja tryptofaani. *B. subtilis* SCR667 on auksotrofi eikä tarvitse mitään aminohappoja Spizizen I-liuoksessa.

Spizizen II-kasvualusta valmistettiin lisäämällä 0,25 ml 1M CaCl_2 ja 1 ml 1M MgCl_2 500 ml:aan Spizizen I-kasvualustaa.

30 ml:aan Spizizen I-kasvualustaa siirrostettiin transformoitavaa *B. subtilis*-kanta pesäkkeenä tai itiöinä ja kasvatettiin yön yli (16-20 tuntia) 37°C:ssa.

Sitten 15 ml yön yli kasvanutta viljelmää siirrostettiin 135 ml:aan Spizizen I-kasvualustaa 2800 ml:n kolvissa ja kasvatettiin 37°C:ssa. Viljelmän optinen tiheys (O.D.) mitattiin 600 nm:ssä 1,5-2 tunnin kuluttua ja sen jälkeen joka 15 minuutin kuluttua, kunnes viljelmän havaittiin olevan myöhäisessä log-vaiheessa perustuen siihen, että O.D.-lukemat kohosivat alle 5 % 15 minuutin kuluessa.

Sitten 50 ml myöhäisen log-vaiheen viljelmää siirrostettiin 450 ml:aan Spizizen II-kasvualustaa 2800 ml:n kolvissa ja kasvatettiin 37°C:ssa 1,5 tuntia. 1,5 tunnin kasvun jälkeen solut sentrifugoitiin pohjaan nopeudella 5000 kierr./min 10 min kuluessa 4°C:ssa.

Sitten sentrifugoinnissa saatu pelletti suspendoitiin uudestaan 45 ml:aan emäliuosta, johon sen jälkeen lisättiin 6 ml 80-prosenttista (tilavuusosina) steriiliä glyserolia juuri ennen kuin viljelämä jäädytettiin kuivajää-etanolihauteessa (-70°C). Jäädytetyssä viljelmässä olevat solut ovat kelpoisia transformoitaviksi halutulla plasmidilla seuraavalla tavalla:

0,5-0,6 ml jäädytettyä, transformointikelpoisia soluja sisältävää viljelmää sulatettiin jään päällä.

Sulatettuun viljelmään lisättiin 10-50 mikrolitraa liuosta, joka sisälsi plasmidia, jolla solut oli tarkoitus transformoida. Saatua seosta sekoitettiin ravistelemalla 37°C:ssa 2 tuntia, jona aikana transformoituminen plasmideilla ja niiden geenien ilmentyminen tapahtui.

Lopuksi siirrettiin valintaa varten pienet erät, kuten noin 5 - noin 200 mikrolitraa levyille, joissa oli haluttua antibioottia tai antibiootteja valintaa varten.

Plasmidilla transformoituneet *B. subtilis*-solut, joista on esitetty tuloksia tässä esimerkissä, valittiin käyttämällä kloramfenikolia, jota oli läsnä levyillä 5 mikrogrammaa/ml.

C. *B. subtilis* -kannasta tapahtuvan erittymisen mittaaminen
Mielenkiinnon kohteena olevalla plasmidilla transformoituneita *B. subtilis*-soluja kasvatettiin L.B.-kasvualustalla [ks. Maniatis et al. (1982), supra, s. 4407, jossa oli kloramfenikolia 5 mikrogrammaa/litra, ja kasvatus suoritettiin ravistelemalla voimakkaasti 37°C:ssa, kunnes viljelmän O.D. (optinen tiheys 600 nm:ssä) saavutti arvon 1,0. Sitten viljelmästä otettiin näyte tutkittavan signaalisekvenssigeenin ilmentämän kokonaisproteiinin (so. erittynyt ja erittymätön) määrittämiseksi. Viljelmän loput solut pelletoitettiin sentrifugoimalla (käyttämällä Eppendorf-mikrofugia 20 sekuntia huoneen lämpötilassa). Käytetyissä olosuhteissa ei ollut havaittavissa solujen lyysiä, kun verrattiin toisiinsa geelejä, jotka oli valmistettu emäliuoksen ja pelletin proteiineista, ja tätä tuki myös se, ettei kasvualustasta löytynyt havaittavia määriä useita eri proteiineja, joiden tiedetään olevan intrasellulaarisia.

Näytteistä analysoitiin hGH ja penisillinaasi tämän esimerkin E-kohdassa kuvatuilla menetelmillä. Halutun proteiinin (hGH tai penisillinaasi) määrä emäliuoksessa on erittyneen proteiinin määrä.

Halutun proteiinin kokonaismäärä määritettiin mittaamalla hGH tai penisillinaasi (noudattamalla tämän esimerkin E-kohdassa kuvattuja menetelmiä) viljelmänäytteistä, jotka oli otettu ennen pelletointia. Sen varmistamiseksi, että tämä kokonaisproteiinin määritysmenetelmä oli tarkka, näytteet sonikoitiin

ensin, kalvot ja muut solupartikkelit sentrifugoitiin alas ja näin saadusta emäliuoksesta mitattiin proteiini.

Penisillinaasin kohdalla kokonaisproteiinin määrittäminen suoritettiin myös ilman tällaista sonikointia. Lukuunottamatta penP delta 2428-signaalisekvenssiä antoivat penisillinaasimäärittäykset oleellisesti ottaen samat tulokset sonikaation kanssa ja ilman sitä, mikä osoitti, että penisillinaasi erittyi solunulko-puoliseen tilaan tai oli sitoutuneena solujen pintaan (ulko-puolelle) sillä tavalla, että se voitiin havaita mittaussmenetelmällä. penP delta 2428-signaalisekvenssillä huomattava osuus penisillinaasista pysyi solun sisällä tai sitoutuneena solukalvoon siten, että sitä ei voitu määrittää ilman solujen sonikaatiota.

D. E. colista tapahtuvan erittymisen mittaaminen

E. coli-soluja, jotka olivat transformoituneet mielenkiinnon kohteena olevalla plasmidilla, kasvatettiin voimakkaasti ravistellen 37°C:ssa L.B.-kasvualustalla, jossa oli ampisilliiniä 50 mikrogrammaa/ml, kunnes viljelmän O.D. saavutti arvon 1,0 600 nm:ssä.

Näytteistä mitattiin haluttu proteiini (penisillinaasi tai hGH) käyttämällä tämän esimerkin kohdassa E selostettuja menetelmiä.

Se halutun proteiinin määrä, joka löydetään solujen periplasmi-deista tilasta (so. operationaalisesti, solujen osmoottisen shokin tuote), on erittynyt proteiini. Osmoottisen shokin tuote valmistettiin oleellisesti ottaen menetelmällä Nosel ja Heppel, J.Biol.Chem., 241, 3055-3062 (1966). Viljelmänäyttees-tä, jonka O.D. oli 1,0, saadut solut pelletoitettiin sentrifugoi-malla ja suspendoitiin uudestaan tilavuuteen, joka oli yksi kymmenesosa näytteen tilavuudesta, käyttämällä puskuria (pH 7,4), jossa oli 50 mM Tris, 2,5 mM EDTA ja 2 % (paino/tilavuus) sakkaroosia. Kun oli pidetty 10 minuuttia 23°C:ssa, solut

pellettoitiin sentrifugoimalla ja sen jälkeen suspendoitiin uudestaan ylösalaisin kääntelemällä yhtä suureen tilavuuteen kylmää (noin 2°C) deionoitua vettä, ja sen jälkeen liuoksen annettiin seisoa 10 minuuttia 4°C:ssa. Lopuksi solut pellettoitiin ja emäliuos, joka sisälsi osmoottisen shokin tuotteen, analysoitiin haluttujen proteiinien suhteen.

Vaihtoehtoisesti käytettiin osmoottisen shokin tuotteen aikaansaamiseksi muunnettua Lunn-Pigiet-menetelmää. Lunn ja Pigiet, *J. Biol. Chem.*, 257, 11424-11430 (1982).

Halutun proteiinin (penisillinaasi tai hGH) kokonaismäärän määrittämiseksi, joka ilmentyi *E. coli*ssa mielenkiinnon kohteena olevan signaalipeptidiä koodittavan geenin tuotteena, määritettiin mittaamalla proteiini siitä solumateriaalista, joka oli pellettoitu osmoottisen shokin tuotteen viimeisessä valmistusvaiheessa. Pellettoitu materiaali suspendoitiin uudestaan puskuriin (pH 7,4, 50 mM Tris, 2 % (paino/tilavuus) sakkarosia ja 2,5 mM EDTA, kuten edellä), jonka tilavuus oli yksi kymmenesosa viljelmänäytteen tilavuudesta, joka alunperin oletettiin osmoottisen shokin tuotteen valmistamiseen. Näin saatua liuosta sonikoitiin ensin ja sen jälkeen määritettiin haluttu proteiini.

Halutun proteiinin kokonaismäärä on se proteiinimäärä, joka löytyy osmoottisen shokin tuotteesta ja uudelleensuspendoidusta solumateriaalista, joka oli pellettoitu osmoottisen shokin tuotteen valmistuksen viimeisessä vaiheessa.

E. Ihmisen kasvuhormonin ja penisillinaasin analyysimenetelmät

*E. coli*n ja *B. subtilis*ksen ilmentämä ja erittämä ihmisen kasvuhormonimäärä mitattiin immunoradiometrisellä menetelmällä (RIA) käyttämällä hGH-RIA-pakkauksia, joita on saatavissa firmasta Cambridge Medical Diagnostics Inc., Billerica, Massachusetts.

E. colin ja B. subtiliksen ilmentämä ja erittämä penisilli-naasimäärä mitattiin joko menetelmällä Schinder ja Huber, Enzyme Inhibitors, U. Brodbeck, editor, Verlas Chemie, Weinheim, W. Germany, ss. 169-176 (1980) PADAC (7-(tienyyli-2-asetamido)-3(2(4-N,N-dimetyyliamino-fenyyliatso)pyridinium-metyyli)-3-kefem-4-karboksyylihappo) toimittaja Calbiochem Inc., La Jolla, California, tai menetelmällä O'Callaghan et al., Antimicrob.Ag.Chemother., 1, 283-288 (1972), ja mittaus suoritettiin 21°C:ssa mieluummin kuin 37°C:ssa ja käyttämällä nitrokefiniä (kromogeeninen kefalosporiini 87/312), jonka toimittaja oli Glaxo Research Ltd., Greenford, U.K.

F. Tulokset - Ihmisen kasvuhormoni

Taulukko I

Ihmisen kasvuhormoni, joka ilmentyi ja erittyi B. subtiliksesta, joka oli transformoitunut eri plasmideilla

Plasmidi	Kokonais-hGH (nanogrammaa hGH/O.D.-yksikkö	Erittynyt hGH (600 nm)	Erittynyt osuus soluja)
pSYC709 ^{a)}	<5	<5	-
pSYC720 ^{a)}	107	53	0,49
pSYC970 ^{b)}	496	86	0,17
pSYC744 ^{a)}	716	26	0,04
pSYC748 ^{a)}	1266	66	0,05
pSYC728 ^{a)}	380	20	0,05
pSYC778 ^{a)}	608	118	0,19
pSYC962 ^{b)}	282	49	0,17
pSYC852 ^{c)}	112	46	0,42

a: Vähintään kolmen määrittelyn keskiarvot. Transformoitunut kanta oli B. subtilis SCR667.

b: Vähintään kahden määrittelyn keskiarvot. Transformoitunut kanta oli B. subtilis SCR667.

c: Transformoitunut kanta oli B. subtilis BD224, jota kasvatettiin ilman kasvualustan sisältämää antibioottia.

Taulukko II

Ihmisen kasvuhormoni, joka ilmentyi ja erittyi E. coli K-12/CS412:sta, joka oli transformoitunut eri plasmideilla

Plasmidi	Kokonais-hGH (nanogrammaa hGH/O.D.-yksikkö (600 nm)	Erittynyt hGH (600 nm)	Erittynyt osuus soluja)
pSYC709 ^{a)}	<5	<5	-
pSYC720 ^{a)}	1128	883	0,78
pSYC970 ^{b)}	690	400	0,58
pSYC744 ^{a)}	674	64	0,09
pSYC748 ^{a)}	792	680	0,86
pSYC728 ^{a)}	625	51	0,08
pSYC778 ^{a)}	504	400	0,79
pSYC962 ^{b)}	1380	120	0,09

a: Vähintään 3 määrittelyn keskiarvot.

b: Yksi ainut määrittely.

pSYC720:lla transformoitunutta E. coli K-12/CS412-kantaa kasvatettiin tritioitua fenyylialaniinia sisältävässä kasvualustassa ja ihmisen kasvuhormoni eristettiin osmoottisen shokin tuotteesta ja N-pään aminohappojärjestys määritettiin. Radioaktiivinen fenyylialaniini löytyi asemista 1 ja 10, kuten luonnossa esiintyvän ihmisen kypsän kasvuhormonin perusteella oli odotettavissa.

G. Tulokset - B. licheniformis-penisillinaasi

Taulukko III

B. licheniformis-penisillinaasi, joka ilmentyi ja erittyi B. subtilis BD224:ssä, joka oli transformoitunut eri plasmideilla

Plasmidit	Kokonaispe- nisillinaasia ^{a)}	Erittynyt peni- sillinaasi	Erittynyt osuus ^{b)}
	(yksikköä penisillinaasiaktiivisuutta/ O.D.-yksikkö (600 nm) soluja)		
pSYC310-2	8,7 (8,0)	6,8	0,78
pSYC617	1,5 (0,7)	0,6 ^{c)}	0,4 ^{c)}
pSYC660	8,3 (7,9)	7,5	0,90
pSYC947			noin 0,9 ^{d)}
pSYC957			noin 0,1 ^{d)}

- a: Suluissa ilmoitettu määrä on saatu ilman sonikaatiota.
 b: Erittynyt määrä jaettuna kokonaismäärällä.
 c: Solujen kalvot näyttivät heikentyneen pSYC617:n kantaman penP delta 2428-geenin vuoksi ja erittynyt penisillinaasi-määrä sisältää luultavasti ainakin osittain proteiinia, joka on peräisin lysoituneista soluista.
 d: Erittyneestä proteiinista ja kokonaisproteiinimäärästä ei ole saatavissa kvantitatiivisia tietoja. Numerot perustuvat vertailevaan analyysiin, jossa on tarkasteltu emäliuoksen (erittynyt proteiini) ja viljelmän (kokonaisproteiini) penisillinaasikaistojen intensiteettejä geeleillä.

Taulukko IV

B. licheniformis-penisillinaasi, joka ilmentyi ja erittyi E.colista, joka oli transformoitunut eri plasmideilla

Plasmidi	Kokonaispeni-sillinaasi	Erittynyt peni-sillinaasi	Erittynyt osuus
pSYC310-2 ^{a)}	1,7	0	0,00
pSYC617 ^{a)}	5,5	0	0,00
pSYC660 ^{a)}	5,4	4,3	0,80

a: Transformoitu joko E. coli K-12/MM294:ään tai E. coli K-12/CS412:een. Tulokset eivät eroa oleellisesti toisistaan näiden kantojen välillä.

Plasmidien ja mikro-organismien saatavuus

Seuraavat mikro-organismit ovat saatavissa eri lähteistä, mukaanlukien the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (ATCC). Ne on taltioitu ATCC-kokoelmiin seuraavilla numeroilla:

B. licheniformis 749/C, ATCC n:o 25972;

E. coli JM101, ATCC n:o 33876;

E. coli JM103, ATCC n:o 39463;

E. coli K-12/MM294, ATCC 33625;

pBR322, ATCC n:o 37017; ja

B. subtilis BD170, jota voitiin käyttää B. subtilis BD224:n ja B. subtilis SCR667:n tilalla tämän keksinnön mukaisten plasmidien kanssa, jotka replikoituvat kannassa B.subtilis, ATCC n:o 33608.

E. coli JM103 on myös saatavissa firmasta P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee, Wisconsin.

B. subtilis BD170 on myös saatavissa laitoksesta Bacillus Genetic Stock Center, Department of Microbiology, Ohio, State University, Columbus, Ohio (BGSC) numerolla BGSC n:o IA42.

Seuraavat plasmidit on taltioitu ATCC-kokoelmiin Budapestin sopimuksen mukaisesti, joka koskee mikro-organismien taltiointia patentointia varten:

pOG1196 kannassa *B. subtilis* BD224, ATCC n:o 31776;
pOG2165 kannassa *B. subtilis* BD224, ATCC n:o 31777;
pOG2381 kannassa *E. coli* K-12/CS412, ATCC n:o 39038;
pOG2326 kannassa *E. coli* K-12/CS412, ATCC n:o 39600;
pSYC310-2 kannassa *B. subtilis* BD224, ATCC n:o 39603;
pSYC709 kannassa *E. coli* K-12/CS412, ATCC n:o 39602;
pSYC756 kannassa *E. coli* K-12/CS412, ATCC n:o 39599;
pDH5452 kannassa *E. coli* K-12/CS412, ATCC n:o 39601;
E. coli K-12/MM294, ATCC n:o 39607; ja
B. subtilis SCR667, ATCC n:o 39608.

Plasmidista vapautunut *E. coli* K-12/CS412 voidaan saada viljelemällä mitä tahansa edellä lueteltua, plasmidin sisältävää *E. coli* K-12/CS412-kantaa ilman antibioottia. Vastaavasti plasmidista vapautunut *B. subtilis* BD224 voidaan saada viljelemällä mitä tahansa edellä lueteltua, plasmidin sisältävää *B. subtilis* BD224-kantaa ilman antibioottia.

B. subtilis BD224 ja *B. subtilis* SCR667 ovat myös saatavissa BGSC-kokoelmista numeroilla IA46 ja IS53, vastaavasti.

Näin ollen voidaan havaita, että keksintö tarjoaa muunnettuja signaaliptidejä, jotka on johdettu sellaisista villityyppeistä signaaliptideistä, jotka kykenevät muodostamaan kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja. Muunnettuja signaaliptidejä

koodittavat DNA-sekvenssit rakennetaan korvaamalla ainakin kysteiiniaminohapon kodoni, joka aminohappo löytyy karboksipään säilyneestä alueesta tai signaaliptidin liitosalueelta ja muuttuu kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostuessa, muun aminohapon kuin kysteiinin kodonilla, joka aminohappo ei toimi kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostajana. Näin ollen keksinnön mukaisissa muunnetuissa signaaliptideissä on muu aminohappo kuin kysteiini sen kysteiinin tilalla, joka muuttuu kalvoon kiinnittyneen lipoproteiinin muodostuessa. Tämän keksinnön mukaiset muunnetut signaaliptidit ovat hyödyllisiä haluttaessa saada aikaan proteiinien erittyminen soluista, joissa näitä proteiineja valmistuu. Muunnettuja signaaliptidejä koodittavat DNA-sekvenssit ovat hyödyllisiä kloonausvektoreissa. Edelleen keksintö tarjoaa menetelmän yhdistelmäplasmidien valmistamiseksi in vivo.

Edellä olevan perusteella voivat alan ammatti-ihmiset helposti kehittää erilaisia muunnoksia ja sovellutuksia. Tällaisten muunnosten katsotaan kuuluvan liitteenä olevien patenttiväitösten kattamaan alaan.

Patenttivaatimukset

1. Eksosignaaliptidiä koodittava DNA-sekvenssi, t u n -
n e t t u siitä, että mainitun eksosignaaliptidin amino-
happoketjussa on aminohappo X vastaavan villityyppisen sig-
naaliptidin kysteiinitähteen paikalla, ja mainittu villi-
tyyppinen signaaliptidi a) kykenee muodostamaan kalvoon si-
dottuja lipoproteiineja ja b) sisältää apualueen, jossa on
yksi ainut kysteiini; ja X ei toiminnallaan saa aikaan kal-
voon sitoutuneiden lipoproteiinien muodostumista; ja X:n
korvaama kysteiini on juuri se, joka sijaitsee apualueessa b).
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-sekvenssi, t u n -
n e t t u siitä, että vastaava villityyppinen signaalipti-
di on bakteeriperäinen signaaliptidi.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-sekvenssi, t u n -
n e t t u siitä, että X voi olla aminohappo, jossa on alle
3 hiiliatomia sisältävä neutraali sivuketju.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen DNA-sekvenssi, t u n -
n e t t u siitä, että X on seriini.
5. Peptidiä koodittava DNA-sekvenssi, t u n n e t t u siitä,
että peptidissä on patenttivaatimuksen 1 mukainen eksosigna-
aliptidi liittyneenä haluttuun proteiiniin.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen DNA-sekvenssi, t u n -
n e t t u siitä, että haluttu proteiini on bakteeriperäinen
eksopenisillinaasi, IL-2 tai hGH.
(lisäsim.)
7. Replikoitumiskykyinen ilmentämisvektori, t u n n e t t u
siitä, että se toimii prokaryoottisissa isäntäsoluissa il-
mentäen patenttivaatimuksen 5 mukaista DNA-sekvenssiä.
8. Prokaryoottisissa isäntäsoluissa replikoitumaan kykenevä
ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että siinä on
patenttivaatimuksen 5 mukainen DNA-sekvenssi toimivasti liit-
tyneenä sopiviin ohjaussekvensseihin.

9. Yhdistelmäisäntäsolut, t u n n e t u t siitä, että ne ovat transformoituneet patenttivaatimuksen 8 mukaisella vektorilla. e

10. Eksosignaaliptidi, t u n n e t t u siitä, että se koostuu oleellisesti ottaen aminohapposekvenssistä, jossa on aminohappo X vastaavan villityyppisen signaaliptidin kysteiinitähteen paikalla, ja mainittu villityyppinen signaaliptidi a) kykenee muodostamaan kalvoon sidottuja lipoproteiineja, ja b) sisältää apualueen, jossa on yksi ainut kysteiini; ja X ei toiminnallaan saa aikaan kalvoon sitoutuneiden lipoproteiinien muodostumista; ja X:n korvaama kysteiini on juuri se, joka sijaitsee apualueella b). 2

11. Peptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää eksosignaaliptidin toimivasti liittyneenä haluttuun proteiiniin, ja eksosignaaliptidin kysteiinitähteen paikalla, ja mainittu villityyppinen signaaliptidi a) kykenee muodostamaan kalvoon sidottuja lipoproteiineja ja b) sisältää apualueen, jossa on yksi ainut kysteiini; ja X ei toiminnallaan saa aikaan kalvoon sitoutuneiden lipoproteiinien muodostumista; ja X:n korvaama kysteiini on juuri se, joka sijaitsee apualueella b). 2

12. Replikoitumiskykyinen ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se kykenee saamaan aikaan patenttivaatimuksen 11 mukaisen peptidin tuotannon prokaryoottisissa isäntäsoluissa.

13. Yhdistelmäisäntäsolut, t u n n e t u t siitä, että ne ovat transformoituneet patenttivaatimuksen 12 mukaisella vektorilla. e

14. Menetelmä halutun proteiiniketjun erittymisen aikaansaamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä viljellään patenttivaatimuksen 13 mukaisia transformoituneita soluja sopivassa ravintoalustassa. 2

toim. van.
kysteiini
alanina

15. Menetelmä halutun proteiinin erittymisen aikaansaamiseksi, t u n n e t t u siitä, että transformoidaan prokaryoottiset isäntäsolut replikoitumaan kykenevällä vektorilla, joka pystyy ilmentämään DNA-sekvenssin, joka koodittaa haluttuun proteiiniin toimivasti liittynyttä eksosignaali-peptidiä, joka eksosignaali-peptidi koostuu aminohapposekvenssistä, jossa on aminohappo X vastaavan villityyppisen signaali-peptidin kysteini-tähteen paikalla, ja mainittu villityyppinen signaali-peptidi a) kykenee muodostamaan kalvoon kiinnittyneitä lipoproteiineja ja b) sisältää apualueen, jossa on yksi ainut kysteini; ja X ei toiminnallaan saa aikaan kalvoon sitoutuneiden lipoproteiinien muodostumista; ja X:n korvaama kysteini on juuri se, joka sijaitsee apualueella b).

16. Eksosignaali-peptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää oleellisesti ottaen aminohappoketjun Met-Lys-Leu-Trp-Phe-Ser-Thr-Leu-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-Val-Leu-Leu-Phe-Ser-Cys-Val-Ala-Leu-Ala-Gly-X-Y-(Asn-Asn-Gln-Thr-Asn-Ala)_n, jossa X on seriini tai alaniini, Y on alaniini tai proliini ja n on 0 tai 1.

17. Yhteenliitetty peptidi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 16 mukaisen eksosignaali-peptidin toimivasti haluttuun proteiinisekvenssiin liittyneenä.

18. Replikoitumaan kykenevä ilmentämisvektori, t u n n e t t u siitä, että se pystyy prokaryoottisissa isäntäsoluissa ilmentämään patenttivaatimuksen 17 mukaista peptidiä koodittavan DNA-sekvenssin.

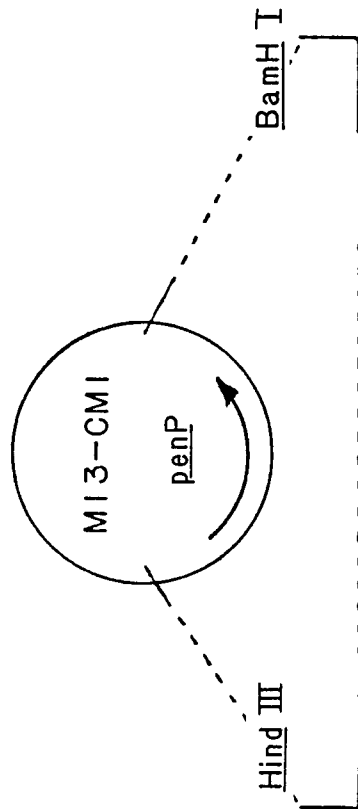
19. Yhdistelmäisäntäsolut, t u n n e t t u t siitä, että ne ovat transformoituneet patenttivaatimuksen 18 mukaisella vektorilla.

20. Menetelmä halutun yhdistelmäplasmidivektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) katkaistaan ensimmäinen kantaplasmi restriktioentsyymillä niin, että saadaan ensimmäinen lineaarinen DNA-jakso;

*opäyde-
näkymä.*

- b) katkaistaan toinen kantaplasmidi, jonka sekvenssi on oleellisesti ottaen homologinen ensimmäisen kantaplasmidin sekvenssin kanssa, restriktioentsyymillä, joka suorittaa katkaisun kohdasta, joka on noin 20 emäsparin päässä vastavasta kohdasta, joka katkaistiin ensimmäisessä kantaplasmidissa, jolloin saadaan toinen lineaarinen DNA-jakso;
- c) lineaarisissa DNA-jaksoissa a) ja b) mahdollisesti olevat yksisäikeidet päät tehdään tylppäpäisiksi;
- d) erotetaan a):n ja b):n lineaariset DNA-jaksot yksisäikeiksi DNA-rihmoiksi;
- e) sijoitetaan d)-kohdassa saatu yksisäikeinen DNA-materiaali olosuhteisiin, jotka johtavat kaksisäikeisen DNA:n muodostumiseen;
- f) e)-kohdassa saadulla kaksisäikeisellä DNA:lla transformoidaan transformointikelpoiset isäntäsolut;
- g) viljellään kohdassa f) saatuja transformoituneita soluja.



	<u>Hha I</u>									
	ala	leu	ala	gly	cys	ala	asn	asn	gln	
	GCG	CTT	GCA	GGA	TGC	GCT	AAC	AAT	CAA	<u>BamH I</u>
<u>Hind III</u>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3'-CGT CCT AGG CGA TTG-5'									
					*					
					↓					
	ala	leu	alc	gly	ser	ala	asn	asn	gln	
	GCG	CTT	GCA	GGA	TCC	GCT	AAC	AAT	CAA	<u>BamH I</u>
<u>Hind III</u>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	CGC	GAA	CGT	CCT	AGG	CGA	TTG	TTA	GTT	
	<u>BamH I</u>									
	<u>Hha I</u>									

FIG. 1

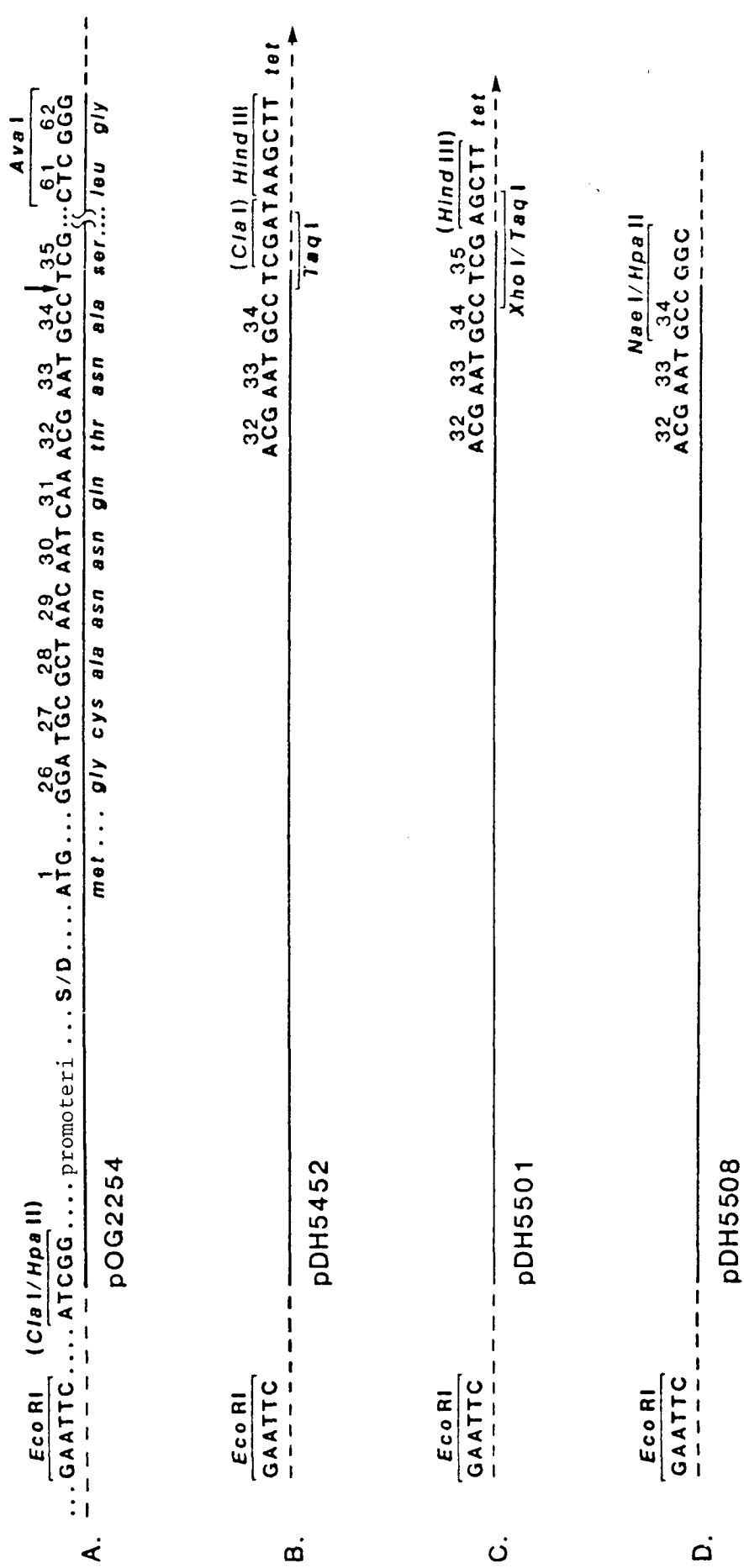


FIG. 2

		heterokahdenteen muodostus										(Sma I / Nru I)	
		Hind III											
pSYC742	EcoRI	ATG ... GGA, T ^o C ACG, AAT, GCC, TTC, CCA hGH geeni TTC, TAG											
		27	Ser										
pSYC744	EcoRI	Met	Gly	Cys	Thr	Asn	Ala	Phe	Pro	Phe			
		1	26	27	32	33	34	1	2	191			
transformointi													
pSYC748	BamHI	ATG, ... GGA, TCC ACG, AAT, GCC, TTC, CCA hGH geeni TTC, TAG											
		XmnI											
pSYC748		Met	Gly	Ser	Thr	Asn	Ala	Phe	Pro	Phe			
		1	26	27	32	33	34	1	2	191			
		penisillinaasin signaali-										ihmisen kypsä kasvuhoirmoni	
		peptidi											

FIG. 3

Hind III
 AAGCTT TTC CCA-hGH geenl-TTC TAG CCCGGG
 phe pro phe Sma I

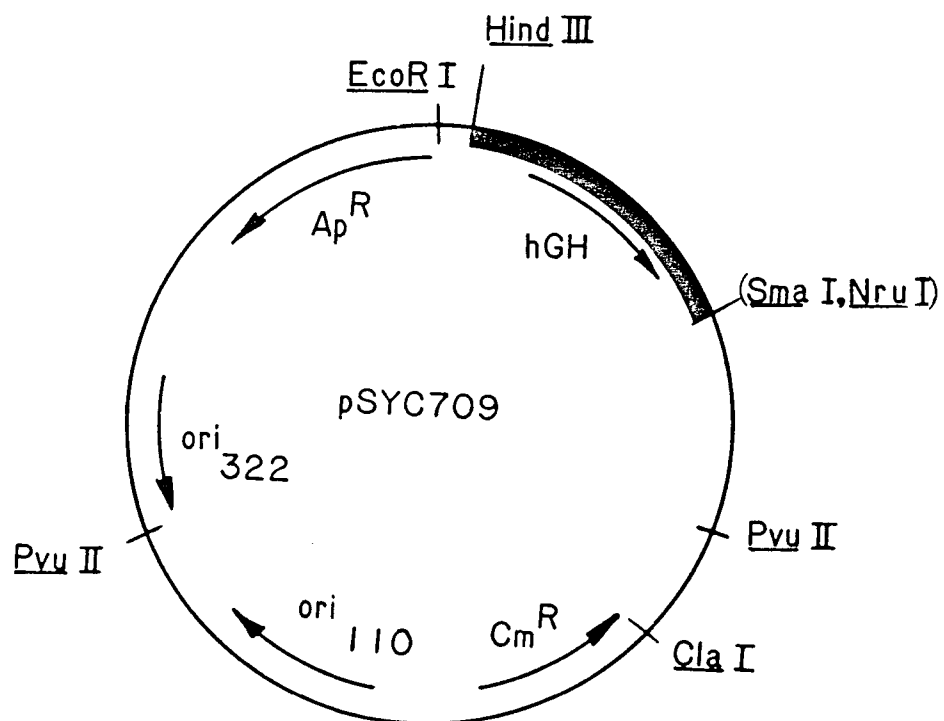


FIG. 4

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 ①
 pSYC310-2: — TGC GTC ala leu ala GCA GGA TGC GCT ala asn AAT CAA gln thr asn ala TCG — ser

27 ①
 pSYC660: — TCC — TCG — ser — TCG — ser

27 ①
 pSYC660A: — GCT — TCG — ala — ser

27 28 ①
 pSYC947: — TCT CCT — TCG — ser — pro — ser

27 28 ①
 pSYC947A: — GCG CCT — TCG — ala — pro — ser

24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 ①
 pSYC957: — CCA GAT CTT GCA GGA TCC GCT AAC AAT CAA ACG AAT GCC TCG — pro asp leu ala gly ser ala asn gln thr asn ala ser

23 24 25 26 27 28 29 ①
 pSYC617: — GCT AAC AAT CAA ACG AAT GCC TCG — ala asn asn gln thr asn ala ser

FIG. 5

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 _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

31/10-88

Järvi-Huoma

Allekirjoitus