

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 811009 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 811009

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12N 15/00
C12P 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date 01.04.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 01.04.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 07.12.1981

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

06.06.1980 GB 80.18701 15.08.1980 GB 80.26661

08.09.1980 GB 8028983

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Biogen N.V., Pieterma Al 15 Willemstad, Curacao, Netherlands Antilles, ALANKOMAIDEN ANTILLIT, (AN)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Fiers, Walter Charles, Belgium, BELGIA, (BE)

2 • Remaut, Erik Rene, TOWN UNKNOWN, BELGIA, (BE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

**Parannettuja vektoreita, näiden vektoreiden valmistusmenetelmiä ja kloonattujen geenien
ekspressiomeneekspressiomenetelmiä.**

Förbättrade vektorer, förfaranden för framställning av dessa vektorer och för expression av klonade gener.

Parannettuja vektoreita, näiden vektoreiden valmistusmenetelmiä ja kloonattujen geenien ekspressiomenetelmiä

Keksinnön kohteena on parannettuja vektoreita ja menetelmiä tällaisten vektorien aikaansaamiseksi ja kloonattujen geenien ekspressoimiseksi. Tässä esitetyille vektoreille ja menetelmille on ominaista kloonattujen geenien, erityisesti eukaryoottista alkuperää prokaryoottisissa isännissä olevien kloonattujen geenien parantunut ekspressio.

Kuten seuraavasta esityksestä käy ilmi näitä vektoreita ja menetelmiä käytetään erilaisten polypeptidien, proteiinien ja aminohappojen tuotannon parantamiseen isäntäsoluissa.

Proteiinin tuotantomäärän isäntäsolussa määrää kolme päätekijää: sen geenien kopioiden lukumäärä solun sisällä, tehokkuus, jolla nämä geenikopiot transkriboituvat ja tehokkuus, jolla syntynyt lähetti-RNA ("mRNA") translatoituu. Transkription ja translaation (jotka yhdessä muodostavat ekspression) tehokkuus riippuu puolestaan nukleotidisekvensseistä, jotka normaalisti sijaitsevat halutun koodaussekvenssin edessä. Nämä nukleotidisekvenssit eli ekspressiokontrollisekvenssit määrittävät, muunmuassa kohdan, jossa RNA-polymeraasi alkaa vaikuttaa (promoottorisekvenssi) transkription alulle panemiseksi ja jossa ribosomit sitoutuvat ja ovat vuorovaikutuksessa mRNA:n (transkriptio-tuotteen) kanssa translaation aloittamiseksi.

Kaikki tällaiset ekspressiokontrollisekvenssit eivät toimi samanlaisella tehokkuudella. Siten on usein eduksi erottaa spesifinen koodaussekvenssi jotakin haluttua proteiinia varten sen viereisistä nukleotidisekvensseistä ja yhdistää se sensijaan muihin ekspressiokontrollisekvensseihin korkeampien ekspressio-tasojen siten edistämiseksi.

Kun tähän on päästy, vastatuotettu DNA-pätkä voidaan kytkeä suuremman kopioluvun plasmidiin tai bakteriofaa-
gijohdannaiseen geenikopioiden lukumäärän lisäämiseksi
solun sisällä ja siten edelleen ekspressoidun proteiinin
5 saannon parantamiseksi.

Koska myös normaalien ei-myrkyllisten geeni-tuottei-
den ylituotanto saattaa olla haitaksi isäntäsoluille ja
johtaa nimenomaisten isäntä-vektori-systeemien vähenty-
neeseen pysyvyyteen, tulisi hyvän ekspressiokontrolli-
10 sekvenssin, sen lisäksi että se parantaa kloonattujen
geenien transkription ja translaation tehokkuutta, myös
olla kontrolloitava ekspression siten moduloimiseksi bak-
teerikasvun aikana. Edullisia ekspressiokontrollisekvens-
sejä ovat esimerkiksi sellaiset, jotka voidaan kytkeä
15 toiminnasta pois isäntäsolujen lisääntymisen mahdolls-
tamiseksi ilman geeni-tuotteiden liiallista rakentumista
ja sitten kytkeä toimintaan edistämään suurten määrien ha-
luttuja proteiini-tuotteita ekspressiota.

Monia ekspressiokontrollisekvenssejä, jotka täyt-
20 tävät joitakin edellä esitetyistä kriteerioista, on käy-
tetty parantamaan proteiinien ja polypeptidien ekspres-
siota bakteeri-isännissä. Näitä ovat esimerkiksi E.*Coli*:n
laktoosioperonin operaattori-, promoottori- ja ribosomi-
sitomis ja -vuorovaikutussekvenssit (esim. K.Itakura et
25 al., "Expression In Escherichia coli Of A Chemically
Synthesized Gene For The Hormone Somatostatin", Science,
198, sivut 1056-63 (1977); D,V, Goeddel et al., "Expression
In Escherichia coli Of Chemically Synthesized Genes For
Human Insulin", Proc.Natl,Acad.Sci. USA, 76, sivut 106-10
30 (1979)), E.coli:n tryptofaanisyntetaasi-systeemin vas-
taavat sekvenssit (J.S. Emtage et al., "Influenza Antigenic
Determinants Are Expressed From Haemagglutinin Genes Cloned
In Escherichia coli", Nature, 283, sivut 171-74 (1980);
J.A. Martial et al., "Human Growth Hormone: complementary
35 DNA Cloning And Expression In Bacteria", Science, 205, si-

vut 602-06 (1979)) ja faagin λ pää-operaattori- ja promootori-alueet (H. Bernard et al., "Construction Of Plasmid Clonig Vehicles That promote Gene Expression Form The Bacteriophage Lambda P_L Promoter", Gene, 5, sivut 59-76 (1979)). Tämä keksintö koskee viimeistä näistä ekspressiokontrollisekvensseistä.

Bakteriofaagi λ sisältää kolme pääpromoottoria P_L , P_R ja R'_R . Repressoriproteiinin, faagigeeni cI :n tuotteen, tiedetään säätelevän promoottorien P_L ja P_R aktiivisuutta. Repressori sitoutuu näiden promoottorien vastaaville operaattorialueille - O_L ja O_R - ja estää transkription alkamisen vastaavasta promoottorista. Lisäksi, tästä sen synteesiä itsestään säätelevästä tavasta johdun (M. Ptashne et al., "Autoregulation And Function Of A Repressor In Bacteriophage λ ", Science, 194, sivut 156-61 (1976)), pystyy cI -geenin yksi kopio lysogeenisen lajin kromosomilla täydellisesti repressoimaan P_L tai P_R -promoottorit, jotka ovat läsnä monikopioplasmidissa (infra). On huomattava, että systeemeissä, joihin liittyy lac-promoottori, promoottorin repressio ei-indusoiduissa olosuhteissa on ainoastaan osittainen (K. Itakura et al., D.V. Goeddel et al., supra).

Repressorin suorittamaa säätelyä promoottorien P_L ja P_R suhteen voidaan muuttaa modifioimalla repressoriproteiinia tai sen geenää. Tunnetaan esimerkiksi yksi mutaatio, jossa repressoriproteiini on lämpötilaherkkä. Kun tätä mutaatiota käytetään, voidaan promoottoreita aktivoita tai inaktivoida vaihtelemalla viljelyn lämpötilaa ja siten repressorin pysyvyyttä.

Bakteriofaagi λ sisältää myös geenit N ja cro . N -geeni on P_L -säätelyn alainen. N -geenin tuotteen tiedetään toimivan antiterminaattorina bakteriofaagissa λ . Anti-terminaatio on edullinen mentäessä transkriptioterminaatin ylitse tai terminaatiosekvenssien, terminaation kaltaisten sekvenssien tai traskriptiota hidastavien sekvenssien ai-

heuttamassa hidastumisessa nimenomaisissa DNA-sekvensseissä, jotka on transkriboitava. Lisäksi polarisuus-vaikutuksia, jotka aiheutuvat merkityksettömien kodonien läsnäolosta promoottoritranskriptiossa, voidaan huo-
 5 jentaa N-geenituotteella (N. Franklin & C. Yanofsky "The N Protein Of λ : Evidence Bearing ON transkription Termination, Polarity And The Altertion Of E.coli RNA Polymerase", julkaisussa RNA Polymerase (Cold Spring Harbor Laboratory), sivut 693-706 (1976)).

10 P_R -promoottorista transkriboidun cro-geenin tuotteen tiedetään olevan sekundaarinen repressor molemmille promoottoreille P_L ja P_R (J. Pero, "Delation Mapping Of The Site Of The Gene Product", julkaisussa The Bacteriophage λ , (Cold Spring Harbor Laboratory), sivut 549-608
 15 (1971); H. Echols, "Role Of The cro Gene In Bacteriophage λ Development", J.Mol.Biol., 80, sivut 203-16 (1973); A. Johnson et al., "Mechanism Of Action Of The cro Protein Of Bacteriophage λ ", Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75, sivut 1783-87 (1978). Koska cro-geenituote syntyy rinnan isäntä-
 20 vektori-yhdistelmän haluttujen tuotteiden kanssa, cro-geenituotteen vaikutus ekspressioon P_L - tai P_R -promoottoreista pyrkii lisääntymään ajan mukana. Siten kaikissa systeemeissä, joissa jatkuvat korkeat ekspressio-tasot ovat toivottuja, cro-geenin poisjättö tai inaktivointi on
 25 välttämätöntä.

P_L -promoottorin tehokkuus kloonattujen geenien ekspressiolle on osoitettu viemällä E.coli:n tryptofaani (trp)-operoni faagiin λ . (N. Franklin, "Altered Reading Of Genetic Signals Fused To The N Operon Of Bacteriop-
 30 hage λ : Genetic Evidence For Modification Of Polymerase By The Protein Product Of The N Gene", J.Mol.Biol., 89 sivut 33-48 (1979); A.Hopkins et al., "Characterization Of λ trp-Transducing Bacteriophages Made In Vitro", J.Mol. Biol., 107, sivut 549-69 (1976)). Tässä modifioidussa
 35 gaagissa trp-geenit voidaan transkriboida joko niiden omas-

ta promoottorista tai P_L -promoottorista. P_L -välitteisen ekspression havaittiin olevan 3-4 kertaa korkeampi kuin tasot, jotka saatiin homologisesta trp-promoottorista.

Repressorin vaikutus P_L -välitteiseen ekspressioon osoitettiin myös tässä modifioidussa faagissa. Esimerkiksi, repressorin poissaollessa, P_L :n säätelemä antrani-laattisyntetaasin (ensimmäinen entsyymi trp-operonissa) ekspressio oli 11 kertaa suurempi kuin ekspressio, joka havaittiin entsyymille trp-promotion alaisena trp-rep-
 10 repressorin poissaollessa (J.Davison et al., "Quantitative Aspects Of Gene Expression In A λ trp Fusion Operon", Molec. gen.Genet., 130, sivut 9,20 (1974)). Lisäksi aktiivisen cI-geenin läsnäollessa entsyymien P_L -välitteinen ekspressio aleni ainakin 900-kertaisesti. Nämä tutkimukset osoitti-
 15 vat myöskin, että jatkuva korkea P_L -välitteinen transkriptio-taso oli mahdollinen ainoastaan, jos cro-geeni ei ollut toiminnallinen isännässä.

Ongelmana on, että vaikka edellä kuvatut λ trp-faagit osoittavat P_L -promoottorin käyttökelpoisuuden väliinpan-
 20 tujen geenien ekspressiota varten, tällaisten faagien käyttöä rajoittavat jonkinverran vaikeudet cro-akseptorifaagien rakentelussa ja pysyvässä lisääntymisessä. Ilman tällaisia faageja havaitut korkeat ekspressio-tasot putoavat nopeasti, kun mukana syntynyt cro-geenituote lisääntyy ja tukahduttaa transkription P_L -promoottorista.
 25

Samalla kun λ -faagien haitta on jonkinverran voitettu kloonaamalla λ -kontrollielementit itsenäisesti monistuvalla plasmidilla kuten Col EI:lla tai sen johdannaisilla (J.Hedgpeth et al., "Lambda Phage Promoter
 30 Used To Enhance Expression Of A Plasmid-cloned Gene", Molec.gen.Genet., 163, sivut 197-203 (1978)) tai rakentamalla pienempiä plasmideja, jotka käsittävät ainoastaan λ P_L -systeemin (H.Bernard et al., supra), näitä jälkimmäisiä vektoreita haittaa etäisyys käytettävissä olevien
 35 kohtien kloonattujen geenien insertiota varten ja P_L -pro-

moottorin välillä. Esimerkiksi H. Bernardin et al.,
 supra, kuvaamissa vektoreissa etäisyys geenien insertio-
 kohtien ja P_L -promoottorin välillä vektorilla on noin
 300:sta noin 8600:aan emäkseen. Lisäksi tavallisemmin käy-
 5 tetyt EcoRI- ja BamHI-insertio-kohdat Bernard'in et al.
 vektoreissa eivät ole lähempänä kuin 600-1000 emäksen
 päässä, vastaavasti, P_L -promoottorista. Lisäksi N-geeni-
 tuotteen vaikutusta haluttujen DNA-sekvenssien transkrip-
 tioon ei voida helposti määrittää Bernard'in et al. vek-
 10 toreissa, koska N-geenituote on koodattu itse plasmii-
 dilla eikä ole kromosomaalista alkuperää. Lopuksi, sen
 lisäksi että ei ole mitään suoraa näyttöä siitä, että
 Bernard'in vektorit antavat korkeampia proteiiniekspressio-
 tasoja, ei Bernard'in esityksessä ole osoitusta siitä, et-
 15 tä hänen vektorinsa ovat hyödyllisesti käyttökelpoisia
 eukaryoottisten geenituotteiden ekspressiossa prokaryoot-
 tisissa isännissä.

Tämä keksintö ratkaisee ongelmat, joihin edellä
 viitattiin, antamalla parannetun vektorin ja menetelmän
 20 tällaisten vektorien aikaansaamiseksi ja kloonattujen
 geenien ekspressoimiseksi isäntäsoluissa.

Erityisesti tämän keksinnön mukaisesti esitetään
 vektori, joka käsittää ainakin yhden DNA-sekvenssin, jos-
 sa on ainakin yksi promoottori ja operaattori, jotka
 25 ovat peräisin bakteriofaagista, ja jolle on ominaista
 ainakin yksi endonukleasi-tunnistuskohda, joka sijait-
 see vähemmän kuin noin 300 emäsparin päässä DNA-sekvens-
 sin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja ope-
 raattorin.

30 Faagin λ pää-promoottorit tämän keksinnön vekto-
 reissa edistävät näihin vektoreihin väliinpantujen DNA-
 sekvenssien transkriptiota. Tämän keksinnön menetelmille
 ja vektoreille on lisäksi ominaista lukuisten sopivien
 tunnistuskohdien läsnäolo haluttujen DNA-sekvenssien kyt-

kemistä varten vektoreihin lähelle valittua promoottoria. Edullisesti etäisyys valitun promoottorin ja tunnistuskoh-
 tien välillä on pienempi kuin noin 300 emäsparia ja vie-
 lä edullisemmin pienempi kuin noin 150 emäsparia. Edulli-
 5 sia tämän keksinnön vektoreita ovat myös ne, joista ak-
 tiiviset N-geenit ja aktiiviset cro-geenit puuttuvat.
 Valitsemalla siten sopiva isäntä, esim. isäntä, joka si-
 sältää aktiivisen kromosomaalisen N-geenin tai josta se
 puuttuu, voidaan keksinnön jotakin vektoria käyttää DNA-
 10 sekvenssien ekspressiota varten N-geenituotteen läsnäolles-
 sa tai poissaollessa.

Kuten seuraavasta selostuksesta käy ilmi, sallivat
 tämän keksinnön vektorit ja menetelmät isäntä-vektoriyhdis-
 telmien rakentamisen, jotka tekevät mahdolliseksi prokary-
 15 oottisten ja eukaryoottisten tuotteiden parannetun ekspres-
 sion isäntäsoluissa.

Kuvista on kuva 1 kaavamainen luonnos faagin λ trp
 44 cIAt₂ cro- alueelta. Kaikkia pilkkomiskohtia ei ole
 esitetty kuvassa. Etäisyydet on kartoitettu λ -yksiköissä
 20 kuten E.Szybalski & W. Szybalski ovat kuvanneet julkaisussa
 "A Comprehensive Molecular Map Of Bacteriophage Lambda",
 Gene, 7, sivut 217-70 (1979).

Kuva 2 on kaavamainen luonnos vektorien rakenteesta
 tämän keksinnön mukaisesti - pPLa2, pPLa20 ja pPLa23.

25 Kuva 3 on kaavamainen luonnos vektorien rakenteesta
 tämän keksinnön mukaisesti - pPLa2311, pPLa231 ja pPLa8.

Kuva 4 on kaavamainen luonnos vektorien rakenteesta
 tämän keksinnön mukaisesti - pPLa83, pPLa831, pPLa832, pPLc2,
 pPLc23 ja pPLc28.

30 Kuva 5 on kaavamainen luonnos vektorien rakenteesta.
 tämän keksinnön mukaisesti - cPLc24.

Kuva 6 esittää pPLa2311:n O_LP_L-alueen nukleotidi-
 sekvenssiä.

Kuva 7 esittää PstI-kohdan β -laktamaasissa BamHI-
 35 kohdaksi.

Kuva 8 on autoradiografikuva, joka näyttää proteiinisynteesin 28°C:ssa ja 42°C:ssa E.coli K12 Δ HI (pPLa23):ssa ja E.coli M5219 (pPLa23):ssa.

5 Kuva 9 on autoradiografikuva, joka näyttää proteiinisynteesin 28°C:ssa ja 42°C:ssa E.coli K12 Δ HI (pPLa23trpA₁):ssa ja E.coli K12 Δ HI (pPLa23trpA₂):ssa.

Kuva 10 on autoradiografikuva, joka näyttää proteiinisynteesin 28°C:ssa ja 42°C:ssa E.coli K12 Δ HI (pPLc23trpA₁):ssa.

10 Kuva 11 on autoradiografikuva, joka näyttää proteiinisynteesin 28°C:ssa ja 42°C:ssa E.coli K12 Δ HI (pPLa2311R₁):ssa.

Kuva 12 on kaavamainen luonnos pPLc28SV_t5:n ja pPLc28SV_t5-37:n rakenteesta.

15 Kuva 13 esittää pPLc28SV_t5-37:n rakentumista pPLc28SV_t5:stä nukleotiditasolla.

Kuva 14 on autoradiografikuva, joka näyttää E.coli K12 HI (pPLc28SV_t5-37-9):n proteiinisynteesin 28°C:ssa ja 42°C:ssa ja proteiinien immunopresipitaation seerumilla hamsterista, jolla on SV40-tuumori, jotka proteiinit on syntetisoitu tästä isännästä induktion jälkeen 42°C:ssa, verrattuna autenttisen pien-t-antigeenin, joka on syntetisoitu SV40-infektoidun Afrikan vihreän apinan munuais-

20 soluissa, immunoprosipitaatioon samalla antiseerumilla.

25 Keksinnön paremmin ymmärtämiseksi esitetään seuraava yksityiskohtainen selostus.

Selostuksessa käytetään seuraavia termejä:

Nukleotidi - DNA:n tai RNA:n monomeeri-yksikkö, joka koostuu sokeriorasta (pentoosi), fosfaatista ja typpipitoisesta heterosyklisestä emäksestä. Emäs on sitoutunut sokeri-

30 osaan glykosidi-hiilen kautta (pentoosin 1' hiili) ja tätä emäksen ja sokerin yhdistelmää nimitetään nukleosidiksi. Emäs luonnehtii nukleotidia. Neljä DNA-emästä ovat adeniini ("A"), guaniini ("G"), sytosiini ("C") ja tymiini ("T").

35 Neljä RNA-emästä ovat A, G, C ja urasiili ("U").

DNA-sekvenssi - Suora jono nukleotidejä, jotka ovat liittyneet toisiinsa fosfodiesterisidoksin viereisten pentoosien 3'- ja 5'-hiilien välissä.

Kodoni - Kolmen nukleotidin (kolmikon DNA-sekvenssi, joka koodaa, mallinsa tai lähetti-RNA:n ("mRNA") kautta, aminohapon, translaation aloitus-signaalin tai translaation terminaatio-signaalin. Esimerkiksi nukleotidi-kolmikot TTA, TTG, CTT CTC, CTA ja CTG koodaavat aminohappoa leusiini ("Leu"), TAG, TAA ja TGA ovat translaation lopetussignaaleja ja ATG on translaation aloitusmerkki.

Polypeptidi - Suora jono aminohappoja, jotka ovat liittyneet toisiinsa peptidi-sidoksin viereisten aminohappojen α -amino- ja karboksi-ryhmien välissä.

Rakennegeeni - DNA-sekvenssi, joka koodaa mRNA:nsa kautta jollekin spesifiselle polypeptidille luonteenomaisten aminohappojen sekvenssin.

Transkriptio - Prosessi mRNA:n tuottamiseksi rakennegeenistä

Translaatio - Prosessi polypeptidin tuottamiseksi mRNA:sta.

Ekspressio - Rakennegeenin läpikäymä prosessi polypeptidin tuottamiseksi. Se on transkription ja translaation yhdistelmä.

Plasmidi - Ei-kromosomaalinen, kaksisäikeinen DNA-sekvenssi, joka käsittää koskemattoman "replikonin", niin että plasmidi monistuu isäntäsolussa. Kun plasmidi sijoitetaan yksisoluiseen organismiin, muuttuvat tämän organismin ominaisuudet tai muodostuvat uudelleen seurauksena plasmidin DNA:sta. Esimerkiksi plasmidi, joka sisältää geenin tetrasykliiniresistenssiä varten (Tet^R), transformoi solun, joka on sitä ennen ollut herkkä tetrasykliinille, soluksi, joka on resistentti sille. Isäntäsolua, joka transformoitiin plasmidilla tai vektorilla, nimitetään "transformantiksi".

Faagi tai bakteriofaagi - Bakteeri-viruksia, joista monet koostuvat DNA-sekvensseistä kapseloituina proteiini-kuoreen tai päällysteeseen ("kapsidi").

- Kloonaussiirtäjä eli vektori - Plasmidi, faagi-DNA tai muu DNA-sekvenssi, joka pystyy monistumaan isäntäsolussa ja jolle on ominaista yksi tai pieni määrä endonukle-
- 5 DNA-sekvenssit voidaan leikata lähemmin määrättävissä olevalla tavalla ilman, että siihen liittyy DNA:n jonkun olennaisen biologisen toiminnan, esim. että siihen liittyy DNA:n jonkun olennaisen biologisen toiminnan, esim. replikaation, päällysteproteiinien tuotannon tai promoot-
- 10 torin tai liittymiskohtien häviötä, ja jotka sisältävät merkkiaineen, joka on sopiva käytettäväksi transformoitujen solujen tunnistamisessa, esim. tetrasykliiniresistenssi tai ampisilliini-resistenssi.
- Kloonaus - Menetelmä organismien tai DNA-sekvenssien, jotka ovat peräisin yhdestä tällaisesta organismista tai sek-
- 15 venssistä, populaation saamiseksi suvuttomalla lisääntymisellä.
- Rekombinantti (yhdistelmä) - DNA-molekyyli eli hybridi DNA -
- Molekyyli, joka koostuu DNA-segmenteistä eri genomeista
- 20 (solun tai viruksen ehut DNA), jotka on liitetty päittäin elävien solujen ulkopuolella ja joilla on kyky infektoida joku isäntäsolu ja jäädä siihen.
- Ekspressiokontrollisekvenssi - Nukleotidisekvenssi, joka kontrolloi ja säätelee geenien ekspressiota, kun ne
- 25 operatiivisesti kytketään näihin geeneihin.

Mitä tahansa suuresta joukosta käytettävissä olevia isäntäsoluja voidaan käyttää tämän keksinnön isäntä/vektori-yhdistelmissä. Jonkun nimenomaisen isännän valinta riippuu joukosta alalla tunnettuja tekijöitä. Näitä ovat esi-

30 merkiksi yhteensopivuus valitun vektorin kanssa, hybridi-plasmidin koodaamien proteiinien myrkyllisyys, bio-turvallisuus ja kustannukset. Tasapaino näiden tekijöiden välillä täytyy löytyä ymmärtäen, että kaikki isännät eivät ole yhtä tehokkaita jonkun nimenomaisen rekombinantti-

35 DNA-molekyylin ekspressiota varten. Näiden yleisten suunta-

viivojen puitteissa voi käyttökelpoisina isäntinä olla E.coli-, Pseudomonas-, Bacillus subtilis-, Bacillus stearothermophilus-kantoja sekä muita basilleja, hiivoja ja muita sieniiä, eläin- tai kasvi-isäntiä, kuten eläin- (ihminen mukaanluettuna) tai kasvisoluja viljelyssä tai muita isäntiä.

Tämän keksinnön edullisia isäntäsoluja ovat E.coli-kannat Kl2 cI_{ts} Δ HI (Kl2 M72 lac_{am} Δ trpEA2 Sm^R (λ cI857 N_{am7} N_{am53} Δ HI bio⁻)) ("Kl2 Δ HI") (H.Bernard et al. supra) ja M5219 (Kl2 M72 lac_{am} trp_{am} Sm^R (λ cI857 Δ HI bio252)) ("M5219") (H.Greer, "The kil Gene Of Bacteriophage λ ", Virology, 66, sivut 589-604 (1975)).

Kumpikin kanta majoittaa puutteellisen, poisleikkautumattoman λ -profaagin, jossa on mutantti cI-geeni. Mutant-tigeeni koodaa lämpötilaherkkää repressoria, sallien siten transkription P_L-promoottorista aktivoitumisen säätämällä lämpötilaa - 28°C:ssa repressori on aktiivinen ja transkriptio P_L-promoottorilta estyy, mutta 42°C:ssa repressori on inaktivoitunut ja transkriptio P_L-promoottorista käynnistyy.

Profaagin Δ HI-deleetio poistaa osan cro-geenistä ja kaikki muut geenit eteenpäin oikealle cro:sta profaagissa (M.Castellazzi et al., "Isolation And Characterization Of Deletions In Bacteriophage λ Residing As Prophage In E.coli Kl2", Mol.gen.Genet., 117, sivut 221-18 (1972)).

Kanta M5219 sisältää lisäksi bio252-deleetion, joka poistaa kaikki geenit vasemmalle cIII:sta, kil profaagissa mukaanluettuna. Lisäksi kanta M5219 ekspressoii lämpötila-induktion jälkeen funktionaalisen N-geenituotteen kromosomaalisesta N-geenistä. Toisaalta kannalla Kl2 Δ HI on kaksi ~~meripihka~~ mutaatiota N:ssa tehden sen funktionaalisesti N-negatiiviseksi.

Siten nämä kaksi kantaa sallivat ekspression kokeellisen päälle- tai päältäpois-kytkemisen P_L-promoottorista. Lisäksi Kl2 Δ HI:n tai M5219:n valinta sallii P_L-välitteisen transkription jatkumisen N-geenituotteen poissaollessa

tai läsnäollessa. Koska kumpikaan E.coli K12 HI:sta tai E.coli M5219:stä ei ekspressoi funktionaalista cro-geenituotetta, P_L -välitteisen ekspresion sekundaarinen repressio vältetään niissä.

5 Vaikka faagi λ promootoreille on olemassa useita hyvin tunnettuja lähteitä, valittiin seuraavien keksinnön mukaisesti vektoreiden rakennetta valaisevien esimerkkien tarkoituksia varten faagi λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ faagi promoottorien lähteeksi.

10 Faagin λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ tuottamisen on kuvannut N.Franklin, "The N Operon of Lambda: Extent And Regulation As Observed In Fusions To The Tryptophan Operon Of Escherichia Coli", julkaisussa The Bacteriophage λ (Cold Spring Harbor Laboratories), sivut 621-38 (1971). At₂-mutaatio
15 cI-geenissä tekee repressorin termolabiiliksi (M. Lieb, "Studies Of Heat-In-ducible Lambda Bacteriophages. I. Order Of Genetic Sites And Properties Of Mutant Prophages", J.Mol Biol., 16, sivut 149-63 (1966)). cro⁻-mutaatio estää P_L -funktion sekundaarisen repressio. On tietenkin ymmärrettävä,
20 että vaikkakin cro⁺-faagit ovat vähemmän edullisia pitkäaikaista ekspressiota varten, niitä voitaisiin käyttää tämän keksinnön vektoreissa. Faagissa on myös funktionaalinen N-geeni ja aktiivinen P_L -promoottori. Faagi antaa 3- - 4-kertaa korkeammat trp-entsvymiekspressio-tasot kuin
25 saatiin homologisella trp-promoottorilla itsellään (N. Franklin, supra).

λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ DNA valmistettiin tästä faagista uuttamalla fenolilla CsCl-puhdistettuja faagi-osasia. Tämän faagin $P_L O_L$ -alueen rakenne on esitetty kuvassa 1.

30 P_L -promoottori ja viereiset operaattorit (O_L) yhdessä N-geenisekvenssin alun kanssa määritellään DNA-välillä, joka on noin 100 emäsparin pituinen ja joka sijaitsee noin 73,4 %:ssa λ -kartassa (kuva 1) (T.Maniatis et al., "Recognition Sequences Of Repressor And Polymerase In Operators
35 Of Bacteriophage λ ", Cell, 5, sivut 109-13 (1975); J.Dahl-

berg & F. Blattner, "Sequence Of Promoter-Operator Proximal Region Of The Major Leftward RNA Of Bacteriophage λ ", Nucleic Acids Res., 2, sivut 1441-58 (1975)). Samalla tavalla P_R -promoottori ja viereinen operaattori (O_R) yhdessä *cro*-geenisekvenssin alun kanssa määritellään DNA-välillä, joka sijaitsee noin 76,6 %:ssa λ -kartalla (kuva 1) (T. Maniatis et al, supra).

Jotakin useista tavoista näiden alueiden eristämiseksi faagi λ DNA:sta voidaan käyttää kloonien valmistamiseksi, jotka sisältävät halutut promoottorisekvenssit. Voidaan käyttää esimerkiksi restriktioentsyymien eri yhdistelmiä pilkkomaan halutut alueet faagi λ DNA:sta (kuva 1). Näitä pätkiä voidaan sitten käyttää suoraan kloonien valmistamiseksi tai pätkiä voidaan käsitellä edelleen niiden viimeistelemiseksi tai jatkamiseksi alalla tunnetuin menetelmin ennen kloonausta.

Sopivan DNA-pätkän valmistamisen jälkeen se voidaan kytkeä johonkin useista kloonaussiirtäjistä eli -vektoreista. Käyttökelpoiset kloonaus-siirtäjät voivat käsittää esimerkiksi kromosomaalisten, ei-kromosomaalisten ja synteettisten DNA-sekvenssien segmenttejä kuten SV40:n erilaisia tunnettuja johdannaisia sekä tunnettuja bakteeriplasmideja, esim. plasmideja *E. coli*:sta, kuten Col, El, pCRL, pBR322, pMB9 sekä niiden johdannaisia, plasmideja laajemmalla isäntäalueella, esim. RP4, faagi DNA:t, esim. faagin λ lukuisia johdannaisia, muita DNA-faageja, lankamaisia yksisäikeisiä DNA-faageja, esim. M13, sekä vektoreita, jotka on johdettu plasmidin ja faagi-DNA:iden yhdistelmästä tai hiiva-plasmideja, kuten 2 μ plasmidia tai sen johdannaisia.

Lisäksi jokaisessa spesifisessä kloonaus-siirtäjässä eri paikkoja voidaan käyttää faagi λ DNA-pätkän insertiota varten. Nämä kohdat ovat tavallisesti restriktio-endonukleaasin määräämiä, joka leikkaa ne. Esimerkiksi pBR322:ssa on käytettävissä eri pilkkomiskohtia DNA-osa-

sen kytkemistä varten (F.Bolívar et al., "Construction And Characterization Of New Cloning Vehicles II. A Multi-Purpose Cloning System", Gene, 2, sivut 95-113 (1977); J.G. Sutcliffe, "pBR322 Restriction Map Derived From the
 5 DNA Sequence: Accurate DNA Size Markers Up To 4361 Nucleotide Pairs Long", Nucleic Acids Res, 5, sivut 2721-28 (1978)). Ks. myös kuvat 2 ja 4. On tietenkin selvää, että tässä keksinnössä käyttökelpoisella kloonaus-siirtäjällä ei tarvitse olla pilkkomiskohtaa faagi λ DNA-osasen kytkemistä varten. Sensijaan siirtäjä voitaisiin liittää osaseen
 10 vaihtoehtoisin keinoin halutun vektorin tuottamiseksi keksinnön mukaisesti.

A. Tämän keksinnön mukaisia vektoreita, jotka sisältävät P_L -promoottorin vastapäivään suunnattuna replikaatioalkukohdan suhteen
 15

1. pPLa23

Viitaten nyt kuvaan 2 valmistettiin tämän keksinnön parannettu vektori pPLa23 sarjassa eri vaiheita. Nämä on kuvattu kuvassa 2 ja täydellisemmin selostettu seuraavassa.

20 a) Välituote-plasmidi pPLa2

Edellä eristetty λ trp 44 cIAt₂ cro⁻ DNA digeroitiin BamHI:n ja EcoRI:n kanssa osasen poistamiseksi, joka ulottui noin 71,3 %:sta 81,02 %:iin λ -kartalla (kuvat 1 ja 2). Samalla tavalla pBR322 digeroitiin BamHI:n ja
 25 EcoRI:n kanssa ja faagi λ DNA-osanen kytkettiin poistetun EcoRI-BamHI pBR322-osasen paikalle (kuva 2).

Syntynyt vektori merkittiin pPLa2:ksi, jossa "a":n tehtävänä on osoittaa P_L -promoottorin suuntautuminen vastapäivään kopioinnin alkukohdan suhteen. λ -informaatio
 30 tällä molekyylillä ulottuu faagin NamHT-kohdasta (71,3 % λ) EcoRI-kohtaan (81,02 % λ) ja sisältää geenin N , $O_L P_L$ -alueen, geenit rex ja cI mutantti), $O_R P_R$ -alueen, geenit cro (mutantti) ja cII ja osan geenistä O (kuvat 1 ja 2).

- E. coli C600 (CaCl_2 kompetentti) transformoitiin edellä valmistetulla pPLa2:lla sopivissa olosuhteissa ja sopivin suojarakentein. Transformantit valittiin 34°C :ssa LB-levyillä, jotka oli ympätty 10^0 pfu:lla faagi λ kirkas mutantti (M.Lieb, supra) ja joka sisälsi myös $100 \mu\text{g/ml}$ karbenisilliiniä. Valittu λ DNA-pätkä sisältää cIAT_2 -geenin ja siten transformantit, jotka sisältävät tämän osan, ovat resistenttejä faagi λ kirkas mutantille 34°C :ssa. Lisäksi valittu pBR322-osanen sisältää geenin ampicilliini-resistenssiä varten, niin että isännät, jotka on transformoitu plasmideilla, joissa on tämä geeni koskemattomana, kasvavat viljelyissä, jotka sisältävät tätä antibioottia isäntien poissulkemiseksi, jotka eivät ole näin transformoituja.
- Valittiin 20 transformanttia ja viljelyjä kasvatettiin 34°C :ssa LB-väliaineessa, joka sisälsi $100 \mu\text{g/ml}$ karbenisilliiniä ja 10^{-2}M MgCl_2 . Sen varmistamiseksi, että transformantit olivat todella transformantteja, jotka majoittivat cI -geenin, eivätkä harvinaisia bakteereja, jotka eivät pystyneet adsorboimaan λ -faagia, infektoitiin viljelyjen tasaosia joko λ kirkas:lla tai λ vir:lla (F.Jacob & E.Wollman, Etude Genetique d'un Bacteriophage Tempere d'Escherichia coli. I. Le Systeme Genetique du Bacteriophage λ ", Ann.Inst.Pasteru, 87, sivut 653-90 (1954)).
- Kaikki 20 transformanttia olivat resistenttejä λ kirkas:lle ja herkkiä λ vir:lle.

Yhdestä näistä 20 transformantista eristettiin DNA:n muoto I käyttäen standardimenetelmiä, pilkottiin EcoRI :lla ja BamHI :lla ja määritettiin koko standardimerkkiaineita vastaan. DNA:ssa oli kaksi nauhaa, jotka vastasivat pBR322-osasen ja faagi λ -osasen odotettuja kokoja.

b) Välituote-plasmidi pPLa20-BgIII-osasten poistaminen pPLa2:sta

pPLa2:n λ -alue sisältää neljä BgIII-kohtaa, jotka sijaitsevat 73,77, 78,80, 80,16 ja 80,28 %:ssa λ (kuvat 1

ja 2) (V.Pirotta, "Two Restriction Endonucleases From *Bacillus Globigi*;" *Nucleic Acids Res.*, 3, sivut 1747-60 (1976); H.Szybalski & W. Szybalski, "A. Comprehensive Molecular Map of Bacteriophage λ ", *Gene*, 7, sivut 217-70 (1979)).

BglII-osasten poistamiseksi 73,77 %:n λ ja 80,28 %:n λ välistä pPLa2 DNA digeroitiin BglII:n kanssa, liitettiin uudelleen DNA-pitoisuudessa alle 1 μ g/ml ja transformoitiin *E.coli* W6 (λ_{rex}):een (CaCl_2 kompetentti), jossa oli kromosomaalinen λ -repressor $cI P_L$:stä riippuvan transkription siten vaimentamiseksi (kuva 2). Karbenisilliinille resistenttejä klooneja valittiin kasvattamalla L-liemessä, joka sisälsi 100 μ g/ml karbenisilliiniä ja seulottiin λ_{rex} -funktion häviön suhteen käyttäen T_4 rII 638-mutanttia. λ_{rex} funktio estää T_4 rII 638-mutantin kasvun (B.Howard, "Phage λ Mutants Deficient In rII Exclusion", *Science*, 158, sivut 1588-89 (1967)). Siten näiden BglII:lla pilkottujen transformanttien epäonnistuminen estää T_4 rII 638-mutantin kasvu verrattuna mutantin kasvun puutteeseen isännissä, jotka oli transformoitu pPLa2:lla, osoitti, että rex-funktio oli poistunut pPLa2 rekombinantti DNA-molekyylistä BglII:n deleetiolla.

Näiden BglII:lla pilkottujen transformanttien rekombinantti DNA-molekyylien restriktioanalyysi paljasti yksinkertaisen BglII-kohdan läsnäolon. Lisäksi digerointi EcoRI:lla ja BamHI:lla antoi kaksi fragmenttia - toisen, joka vastasi odotettua pBR322-osasta, ja toisen, joka vastasi faagi λ DNA-pätkän odotettua kokoa (1900 emäsparia) tämän osan poistamisen jälkeen BglII-kohtien 73,77 % λ ja 80,28 % λ välistä. Tämä modifioitu plasmidi merkittiin pPLa20:ksi. Sen λ DNA-insertio ulottuu BamHI-kohdasta (71,3 %) BglII-kohtaan (73,77 %) ja BglII-kohdasta (80,28 %) EcoRI-kohtaan (81,02 %). Se sisältää geenin N, $O_L P_L$ -alueen ja osan geenistä 0 (kuva 1).

Vaikka tämän keksinnön vektoreiden suoritusmuotojen rakennetta käsittelevän esimerkin loppuosa kohdistuu P_L -promoottoriin - jolloin P_R -promoottori on poistettu pPLa2:sta BglIII-BglIII-osasella - on ymmärrettävä, että samanlaisia manipulaatioita olisi voitu käyttää P_L -promoottorin poistamiseksi pPLa2-sta ja rakentaa vektori säilyttäen P_R -promoottori. Lisäksi tämän keksinnön vektoreita voitaisiin rakentaa samanlaisin keinoin, niin että molemmat P_L - ja P_R -promoottorit olisivat läsnä, niin että nämä kaksi promoottoria toimivat sopusoinnussa tai vastakohtaisesti, kytkettyjen DNA-sekvenssien ekspression välittämiseksi.

c) pPLa23 - EcoRI-kohdan tuominen lyhyen väli-
matkan päähän alavirtaan P_L :sta
 pPLa20:ssa läsnäoleva BglIII-BamHI-osasen sisäl-
 tää yhden ainoan HaeIII-kohdan /73,1 % λ , kuva 1/, joka sijaitsee noin 150 nukleotidia alavirtaan P_L :sta (B. Allet ja R. Solem "Separation And Analysis Of Promoter Sites In Bacteriophage λ DNA By Specific Endonucleases", J.Mol. Biol. 85, 475-84 (1975)/. Tämä kohta voidaan muuttaa EcoRI-kohdaksi avoimen HaeIII-pään tasapäisellä liitännällä avoimeen EcoRI-päähän, joka on sitä ennen tehty tasapäiseksi pidentämällä peräytyntä 3'-päästä DNA-polymeraasilla I deoksiribonukleosidi-trifosfaattien läsnäollessa (K.Backman et al., "Construction Of Plasmids Carrying The cI Gene Of Bacteriophage λ ", Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 73, sivut 4174-78 (1976)). Menetelmän yksityiskohtia on kuvattu seuraavassa ja valaistu kuvassa 2.

6 pmoolia pBR322 digeroitiin EcoRI:n kanssa. Entsyymien kuumaan tappamisen jälkeen DNA-saostettiin ja liuotettiin 250 μ l:ään puskuria, joka sisälsi 50 mM tris-HCl (pH 7,8), 5 mM $MgCl_2$, 1 mM β -merkaptotetanolia, 2 μ m jo-
 kaista neljästä deoksiribonukleosidi-trifosfaatista (α - 32 p-dATP:n kanssa (345 Ci 32 p/mmoll)) ja 50 μ g BSA/ml. Lisät-
 tiin kuusi yksikköä DNA-polymeraasi I:tä E.coli:sta (Wort-

hington) ja seosta inkuboitiin 16°C:ssa 90 min. Tämän prosessin tuloksena avoin 3'-EcoRI-kohta tuli tasapäiseksi linearisoidussa pBR322:ssa.

Entsyymin inaktivoimisen jälkeen kuumassa seos
 5 asetettiin 50 mM:ksi NaCl, 7 mM:ksi β -merkaptotoetanolin suhteen ja DNA digeroitiin BamHI:n kanssa. Pätvät erotettiin elektroforeesilla 1,4-%:sella agarosegeelillä ja tarkkailtiin autoradiografialla. Geeli-viipale, joka sisälsi suuremman kahdesta osasta - pBR322:n, joka sisälsi avoimen BamHI-kohdan ja tasapäisen EcoRI-kohdan - leikattiin
 10 irti ja pakastettiin -90°C:ssa. Tätä agarosen palasta lingottiin sitten (SS34 roottori (Sorvall)) 20 minuuttia nopeudella 20,000 r/min. Palasen päällä oleva neste poistettiin ja pakastamis- ja linkoamisvaiheet toistettiin vielä kaksi kertaa. Näissä olosuhteissa noin 30 % agarose-
 15 viipaleen sisältämästä DNA:sta kulkeutuu päällä olevaan nesteeseen. Siirtynyt DNA saostettiin yhdistetyistä päällä olevista nesteistä ja liuotettiin 10 μ l:ään 10 mM tris-HCl (pH 7,4), 50 mM NaCl, 7 mM β -merkaptotoetanolia.

20 Kaksi pmol pPLa20 digeroitiin BglII:n ja BamHI:n kanssa ja osaset erotettiin agarosegeelillä. Pienempi osan (BglII-BamHI) eluoitiin geelistä kuten edellä kuvattiin ja digeroitiin BspRI:n, HaeIII:n erään isoshitsomeerin kanssa (A.Kiss et al. "A New Sequence-Specific Endonuc-
 25 ldase (Bsp) From Bacillus Sphaericus", Gene, 1, sivut 323-29 (1977)) antamaan BamHI-BspRI- ja BspRI-BglII-osasten seos, jolloin P_L -promoottori on jälkimmäisessä. Entsyymit BglII ja BamHI tekevät identtiset avoimet päät, niin että avoin BglII-pää voidaan liittää avattuun BamHI-päähän
 30 ja päinvastoin. Lisäksi kummankaan liitännän tulos ei enää ole substraatti BglII:lle tai BamHI:lle, mutta sen tunnistaa entsyymi Sau3AI (MboI) (V.Pirotta, supra).

Kaksi pmoolia edellä mainittua pBR322-EcoRI-BamHI suurempaa osasta liitettiin 0,8 pmooliin BamHI-BspRI- ja
 35 BspRI-BglII-osasten seosta. Liitännän jälkeen (avoin BamHI-

kohta pBR322-osasella on käytettävissä liitäntää varten pPLa20-osasten joko avoimiin BglII- tai BamHI-kohtiin ja pPLa20-osasten tasapäinen EcoRI-kohta on käytettävissä liitäntää varten pPLa20-osasten BspRI (HaeIII)-kohtiin)

5 seos digeroitiin BamHI:n kanssa niiden rekombinantti-molekyylien poistamiseksi, jotka sisälsivät ei-toivotun BamHI-BspRI-osasen kytkettynä pBR322-vektoriin. Saatu seos transformoitiin E.coli M5219:ään ja transformantit valittiin resistenssin suhteen karbenisilliinille. Saatiin yhteensä

10 23 transformanttia. Kaikki nämä transformantit olivat herkkiä tetrasykliinille (jota myös sisältyy pBR322:een), koska pBR322:n BamHI-pilkkominen sai geenin, joka koodaa Tet^R:ää, olemaan enää koskematon modifioidussa plasmidissa (kuva 2).

15 P_L-sisältävän BspRI-BglII-osasen jatkuva läsnäolo näissä klooneissa tarkistettiin digeroimalla DNA:ta HincII:n kanssa. Koska pBR322 sisältää kaksi HincII-kohtaa (J.Sutcliffe, supra) ja odotettu λ P_L-osanen sisältää yhden ainoan HincII-kohdan (73,4 % λ , kuva 1) (B.Allet ja R.Solem,

20 supra), oikein rakennettujen rekombinantti-DNA-molekyylien tulisi sisältää kolme HincII-kohtaa. Saaduista 23 transformantista viisi sisälsi kolme ennustettua HincII-kohtaa. Kolmella näistä oli erikoinen EcoRI-kohta, mikä osoittaa, että näissä klooneissa on tehty oikea liitos pPLa20-osasen BspRI

25 (HaeIII)-kohdan ja pBR322-osasen tasapäisen EcoRI-kohdan välillä. Näistä kolmesta kloonista puuttui myös BamHI-koh- ta, kuten ennustettiin pPLa20-osasen BglII-pään odotetulla liittymisellä pBR322-osasen BamHI-päähän. Yksi näistä kloo- neista valittiin jatkotyötä varten ja merkittiin pPLa23:ksi

30 (kuva 2).

pPLa23 käsittää pBR322-osasen, joka ulottuu BamHI-kohdasta (pBR322:n emäspari 377) EcoRI-kohtaan (pBR322:n emäspari 4362) (J.Sutcliffe, supra) (kuva 2). pBR322:n jäl- jellejäävä osa on pPLa23:ssa korvattu λ trp 44 cIAt₂ cro⁻

35 DNA:n osasella, joka sijaitsee HaeIII-kohdan 73,3 %:ssa λ

(nyt uudelleen rakennettu EcoRI-kohta) ja BglIII-kohdan 73,77 %:ssa λ (nyt Sau3A-kohta) välissä (kuva 3). Tämän osasen koon arvioitiin agarosegeeli-elektroforeesilla olevan noin 300 emäsparia. Tämä osanen sisältää $O_L P_L$ -alueen ja N-geenitranskriptin ensimmäiset 115 nukleotidia (J. Dahlberg & F. Blattner, supra). P_L -promoottorin transkription suunta on BglIII-kohdasta kohti HaeIII-kohtaa ja kulkee samassa suunnassa transkription kanssa pBR322:n β -laktamaasipromoottorista (J. Dahlberg & F. Blattner, supra; J. Sutcliffe, supra).

Plasmidin kaksi ominaispiirrettä ovat erityisen kiinnostavia: 1) alueet, jotka koodaavat P_L -promoottoria ja β -laktamaasigeeniä, ovat läsnä yhdellä aineella HaeII-osasella, jonka HaeII-kohdat pBR322:n emäsparilla 2720 ja 436 hahmottavat (kuva 3) (J. Sutcliffe, supra; B. Allet ja R. Solem, supra; V. Pirodda, supra). 2) kopioinnin alkukohta sijaitsee 370 emäsparin HaeII-osasella β -laktamaasia kantavan HaeII-osasen vieressä (kuva 3). Funktionaalinen kopioinnin alkukohta vaatii, että liitos HaeII-kohdan ympärillä asemassa 2720 ylläpidetään (A. Oka et al. "Nucleotide Sequence Of Small Col El Derivatives. Structure Of The Regions Essential For autonomous Replication And Colicin El Immunity", Mol.Gen.Genet, 172, sivut 151-59 (1979)). pPLa23:n näitä ominaispiirteitä käytettiin hyväksi toisen antibiootteille resistentin merkkiaineen tuomiseksi vektoriin.

2. pPLa231 ja pPLa2311 - kanamysiinille resistentin merkkiaineen tuominen pPLa23:een

Viitaten nyt kuvaan 3 on siinä esitetty vaiheet, joita käytettiin tämän keksinnön muiden vektoreiden valmistamiseksi pPLa23:sta. Näitä vaiheita selostetaan yksityiskohtaisemmin seuraavassa.

HaeII-osanen, joka koodaa resistenssiä kanamysiinille, saatiin plasmidista pMK20 (M. Kahn et al., "Plasmid Cloning Vehicles Derived From Plasmids SolEl, F, R6K And RK2" Methods in Enzymology, 68, sivut 268-80 (1979)). Kopioinnin alku-

kohta plasmidilla pMK20 sisältyy suurelta 359 emäsparin
HaeII-osaseen. Alkukohta käsittää kuitenkin myös liitok-
sen tämän osasen ja viereisen HaeII-osasen välillä (M.Kahn
et al., supra). Nukleotidisekvenssi tämän HaeII-kohdan
5 ympärillä on sama kuin sekvenssi pBR322:ssa HaeII-kohdan
ympärillä asemessa 2720 (A.Oka et al., supra; J.Sutcliffe,
supra).

pPLa23:n ja pMK20:n seosta digeroitiin täydentämis-
tä varten HaeII:lla, liitettiin uudelleen ja transformoi-
10 tiin *E. coli* M5219:aan (CaCl_2 kompetentti) (kuva 3). Oikein
transformoidut koloniat valittiin niiden resistenssin pe-
rusteella karbenisilliinille ja kanamysiinille, koska ai-
noastaan klooneilla, jotka sisältävät β -laktamaasigeenin
pBR322:sta ja kanamysiinigeenin pMK20:sta on kahtalainen
15 antibioottinen resistenssi. Valittiin 12 kaksinkertaisesti
resistenttiä transformanttia. Plasmidi DNA eristettiin
näistä transformanteista kuten edellä ja analysoitiin pilk-
komalla HaeII:lla ja määritettiin osaskoko 6-%:sella akryy-
liamidigeelillä. Viidellä näistä klooneista oli ainoastaan
20 kolme HaeII-osasta - HaeII-osanen, joka vastasi pPLa23:n
HaeII-osasta, jolla on P_L -promoottori ja β -laktamaasigeeni,
HaeII-osanen, joka vastaa pMK20:n HaeII-osasta, jolla on
geeni kanamysiini-resistenssiä varten, ja pieni HaeII-
osanen, joka on myös peräisin pMK20:stä ja joka on tarpeen
25 plasmidikopiointia varten (kuva 3).

Näitä viittä valittua kloonia tutkittiin edelleen
kanamysiinigeenin sisältävän HaeII-osasen pMK20:stä suun-
tautumisen määrittämiseksi uudelleen rakennetun EcoRI-
kohdan suhteen HaeII-osasessa pPLa23:sta. Kanamysiinigeenin
30 sisältävän HaeII-osasen pMK20:stä tiedetään sisältävän eri-
koisen asymmetrisen HindIII-kohdan (M.Kahn et al., supra)
(kuva 3). Siten tämä kohta antaa keinon osasen suuntautu-
misen määrittämiseksi.

Näitä viittä kloonia digeroitiin HindIII:n ja EcoRI:n
35 kanssa ja saatujen osasten koko määritettiin kuten edellä.

Neljällä viidestä kloonista oli HindIII:lla pilkotun kanamysiinigeenin sisältävän HaeII-osasen pMK20:stä suurempi osa uudelleenrakennetun EcoRI-kohdan vieressä. Yksi kloonista oli päinvastoin suuntautunut. Nämä kaksi kloonisarjaa merkittiin mielivaltaisesti pPLa2311:ksi ja vastavasti pPLa2311:ksi (kuva 3).

pPLa2311 valittiin mielivaltaisesti edellä rakennetuista plasmideista ja P_L -alueen nukleotidisekvenssi määritettiin.

Ennen sekvenssointia valmistettiin kaksi restriktio-
 palasten sarjaa pPLa2311:stä - EcoRI-HincII-osaset ja
 HincII-EcoRI-XhoI-osaset (eivät näy kuvassa 3). Kummassakin tapauksessa pPLa2311:ta digeroitiin ensimmäisen restriktioentsyymin kanssa ja saadut osaset merkittiin ^{32}P :lla käyttäen T_4 -polynukleotidia Kinase (P-L Biochemicals). Sitteen osasia digeroitiin toisen restriktioentsyymin tai entsyymiparin kanssa, kun kysymyksessä oli EcoRI-XhoI, ja osaset erotettiin 6-%:sella agarosegeelillä. Sekvenssointi tehtiin tavalliseen tapaan käyttäen A.Maxam & W.Gilbert'in menetelmiä, "A New Method For Sequencing DNA", Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 74, sivut 560-64 (1977).

Tämän alueen nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 6. Se ulottuu HaeII-kohdasta pBR322:ssa rekonstruoituun EcoRI-kohtaan liitoskohdassa λ faagi-osasen ja pBR322:n välissä. Määritetyllä sekvenssillä on seuraavat ominaisuudet verrattuna tunnettuihin sekvensseihin: 1) $O_L P_L$ -operatoripromootori-alueen nukleotidisekvenssi on sama kuin tämän alueen sekvenssifaagissa λ (T.Maniatis et al., supra); 2) sekvenssi HaeII-kohdan ja Sau3A-kohdan välissä liitoskohdassa λ faagi-osasen ja pBR322:n välissä on sama kuin autenttisen pBR322:n sekvenssi (J.Sutcliffe, supra); 3) N-geeni transkriptin sekvenssi on sopusoinnussa sekvenssin kanssa, jonka Dahlberg & Greenblatt (supra) määrittelivät mRNA-tasolla, lukuunottamatta yhden adensiini-tähteen poistamista transkriptin asemassa 41; ja 4) sekvenssi ei si-

sällä N-geenin translationaalista alkusignaalia (N.Franklin & G. Bennett, "The N Protein Of Bacteriophage λ , Defined By Its DNA Sequence, Is Highly Basic", Gene, 8, sivut 10719 (1979)).

5 3. pPLa4 ja pPLa8 - PstI-kohdan pPLa2311:n β -laktamaasigeenissä muuttaminen BamHI-kohdaksi

Kuvat 3 ja 7 esittävät kaavamaisena luonnoksena PstI-kohdan pPLa2311:n β -laktamaasigeenissä muuttamisen BamHI-kohdaksi. Plasmidi pPLa2311 linearisoitiin PstI:lla. Fenoli- ja kloroformi-uuton jälkeen DNA saostettiin, liuotettiin uudelleen 50 mmol/ml:n väkevyyteen 25 mM NaCOOCH₃:een (pH 4,5), 1 mM ZnCOOCH₃:een, 125 mM NaCl:ään ja käsiteltiin S1-nukleaasilla (Sigma) 1,5 yksikössä moolia kohti DNA:ta 90 minuutin ajan 25°C:ssa 3'-ulostyöntyvien häntien poistamiseksi (kuva 7). Reaktio lopetettiin lisäämällä EDTA 5 mM:ksi. S1-nukleaasi poistettiin inkuboimalla seosta 0,2-%:sen SDS:n läsnäollessa 10 minuuttia 70°C:ssa, mitä seurasi fenoli- ja kloroformiuutto. DNA saostettiin lisäämällä 4 tilavuusosaa 2M NH₄COOCH₃ ja 14 tilavuusosaa etanolia.

20 Talteenotettu DNA liitettiin tylppäpäisästi 10-kertaiseen mooliylimäärään BamHI-sitojamolekyylejä (Collaborative Research Inc.) (C.Bahl et al. "A General Method For Inserting Specific DNA Sequences Into Cloning Vehicles", Gene, 1, sivut 81-92 (1977)) (kuva 7). Pilkkomisen jälkeen BamHI:lla ja uudelleenliittämisen jälkeen alhaisessa DNA-pitoisuudessa (kuva 7) seos pilkottiin PstI:lla niiden molekylien, jotka olivat välttyneet S1-nukleaasikäsittelyltä ja säilyttäneet koskemattoman PstI-kohdan, vastavaltitsemiseksi. Kaksi μ g käsiteltyä DNA:ta transformoitiin E.coli M5219:een ja transformantit valittiin kanamysiini-resistenssillä. Saatiin yhteensä 10 transformanttia, joista kahdesta puuttui PstI-kohta ja olivat saaneet BamHI-kohdan. Näiden kahden jälkimmäisen transformantin rekombinantti-DNA-molekyylit nimettiin pPLa8:ksi ja pPLa4:ksi (kuva 3, pPLa4 ei näy kuvassa 3). Näiden transformanttien rekombinantti-

DNA-molekyylien yhdistetyn EcoRI-BamHI-digeroinnin jäl-
keen saadut osaset kulkeutuivat yhteen 1,4 %:sella agaro-
segeelillä osasten kanssa, jotka oli saatu pPLa2311:stä
EcoRI-PstI-pilkkomisen jälkeen. Siten PstI-kohta pPLa2311:
5 ssä on korvattu BamHI-kohdalla.

Viitaten jälleen kuvaan 7 on siinä kuvattu edellä
kuvattujen vaiheiden sekvenssin vaikutus β -laktamaasi-
geeniin. Kuten kuvassa 7 on esitetty, on rakentelun lopul-
lisena tuloksena Ala-aminohappotähteen asemassa 182 β -lak-
10 tamaasiproteiinissa korvautuminen sekvenssillä Arg-Ile-Arg.
Koska tämä korvaaminen jättää β -laktamaasi-geenin koodi-
kaavan koskemattomaksi, odotettiin, että uudelleenraken-
nettujen kloonien transformantit olisivat resistenttejä
karbenisilliinille. Odottamatta pPLa4:llä ja pPLa8:lla
15 transformoidut isäntäsolut eivät olleet resistenttejä karbe-
nisilliinille.

4. pPLa83 - BamHI-kohdan tuominen seuraavaksi pPLa8:n EcoRI-kohdasta

Plasmidi pAD3 (H.Schaller'in lahjoitus) sisältää
20 47 emäsparin sekvenssin kytkettynä pBR322:n BamHI-kohtaan.
Tämä sekvenssi koostuu seuraavista yksiköistä - BamHI-
kohta-EcoRI-kohta-laktoosioperaattori-EcoRI-kohta-BamHI-
kohta. Tämän sekvenssin kytkemiseksi pPLa8:n rekonstruo-
tuun BamHI-kohtaan, pPLa8 ja 10-kertainen ylimäärä pAD3 di-
25 geroitiin BamHI:n kanssa, liitettiin uudelleen ja trans-
formoitiin E.coli W6 (λ_{rex}):een (kuva 4). Transformantit
valittiin levyillä, jotka sisälsivät vähimmäisväliainetta,
50 $\mu\text{g/ml}$ kanamysiiniä, 0,1 % glukoosia, 40 $\mu\text{g/ml}$ X gal
(5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galaktosidia) (J.Miller,
30 Experiments In Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Labo-
ratory), sivu 48 (1972)), koska X gal-väriaineen läsnäolo
tekee mahdolliseksi transformanttien havaitsemisen, jotka
sisältävät laktoosi-operaattoriosasen. Itseasiassa tässä
väliaineessa laktoosioperaattoria sisältävät transformantit
35 ovat sinisiä ja siten muista transformanteista helposti erot-
tuvia.

Rekombinantti DNA-molekyylit eristettiin yhdestä näistä sinisistä kolonioista kuten edellä ja digeroitiin EcoRI:n kanssa. Saadut kaksi osasta kulkeutuivat agarosegeelillä pääasiallisesti yhteen kahden osasen kanssa, jotka oli saatu pPLa8:n EcoRI-BamHI-digeroinnista, vahvistaen siten, että haluttu 47 emäsparin osanen pAD3:sta oli kytketty oikein rekonstruoituun BamHI-kohtaan pPLa8:ssa. Plasmidi nimettiin pPLa83:ksi (kuva 4).

5. pPLa831 - BamHI-kohdan tuominen lähemmäksi

10 P_L-promoottoria pPLa83:ssa

BamHI-kohdan tuomiseksi lähemmäksi P_L-promoottoria pPLa83:ssa EcoRI-EcoRI-osanen delefoitiin digeroimalla pPLa83 EcoRI:n kanssa ja liittämällä uudelleen laimeassa DNA-pitoisuudessa (kuva 4). Syntyneiden rekombinantti-DNA-molekyylien transformointi E.coli W6 (λ_{rex}):een ja viljely levyillä, jotka sisälsivät vähimmäisväliainetta täydennettynä kuten edellä X gal:lla ja kanamysiinillä, teki mahdolliseksi niiden kloonien valitsemisen, jotka eivät enää sisältäneet laktoosi-operaattori-aluetta. DNA:n pilkkominen valitusta transformantista BamHI-XhoI:lle ja saadun kahden osasen kulkeutumisen vertailu kahteen osaseen, jotka oli saatu pPLa8:n EcoRI-XhoI-digeroinnista vahvasti, kuten odotettiin, että BamHI-kohta modifioidussa plasmidissa oli noin 150 emäsparin päässä P_L-promoottorista. Modifioitu plasmidi merkittiin pPLa831:ksi.

On tietenkin selvää, että samanlaisia manipulointeja, kuin edellä kohdissa 3, 4 ja 5 kuvatut, voitaisiin käyttää antamaan muita endonukleasitunnistuskohchia vähemmän kuin 300 emäsparin päässä valitusta promoottorista ja operaattoreista tämän keksinnön vektoreissa. Esimerkkejä tällaisista manipulaatioista esitetään seuraavassa.

6. pPLa832 - HindIII-kohdan kytkeminen seuraavaksi BamHI-kohdasta pPLa831:ssa

Plasmidi pAD16 (H.Schaller'in lahjoitus) sisältää

36 emäsparin osasen kytkettynä pBR322:n BamHI-kohtaan ja se koodaa sekvenssiä: BamHI-kohta-HindIII-kohta-HindIII-kohta-BamHI-kohta. Tämän sekvenssin kytkemiseksi pPLa831:n BamHI-kohtaan, pPLa831 ja 10-kertainen ylimäärä pAD33:a
 5 pilkottiin BamHI:lla, liitettiin uudelleen ja transformoitiin E.coli M5219:een valiten kanamysiini-resistenssin suhteen (kuva 4). Koska ei ole olemassa mitään helppoa seulontamenetelmää halutun BamHI-osasen oikean kytkennän määrittämiseksi pPLa831:een, transformanttien, jotka kasvoivat kanamysiinin läsnäolossa, analyysi riippui yksittäisten, umpimähkään valittujen kloonien restriktio-pilkonnasta. Analysoitujen 32 kloonin joukosta löydettiin yksi, joka antoi kaksi osasta pilkkomisen jälkeen HindIII:lla (kuva 4). Näiden osasten koko ei ollut erotettavissa 1,4-%:lla
 15 sella agarosegeelillä osasista, jotka oli saatu pPLa831:n BamHI-HindIII-pilkonnan tai EcoRI-HindIII-pilkonnan jälkeen. Tämä modifioitu plasmidi merkittiin pPLa832:ksi.

B. Vektoreita, jotka sisältävät P-promoottorin myötäpäivään suunnattuna kopioinnin alkukohdan suhteen

20 1. pPLc2 - pPLa832:n P_L:n sisältävän osasen kloonaus
 pBR322:n ja pPLa832:n ekvimolaarinen seos pilkottiin BamHI:lla ja sen jälkeen HindIII:lla (kuva 4). Seos liitettiin uudelleen ja transformoitiin M5219:een valiten karbenisilliini-resistenssin suhteen. Koska oikein valmistetut
 25 rekombinantti-DNA-molekyylit, joilla on tämä rakenne, eivät enää sisällä koskematonta geeniä tetrasykliiniä varten, transformantit seulottiin myös tetrasykliini-resistenssin menetyksen suhteen. Rekombinantti-DNA-molekyyli eristettiin kuten edellä valituista transformanteista ja analysoitiin
 30 pilkkomalla. Valittu plasmidi sisälsi yhden ainoan HindIII-kohdan. Yhdistetty HindIII-BamHI-digerointi antoi kaksi osasta, jotka agarosegeelillä kulkeutuivat pääasiallisesti yhteen kahden osasen kanssa, jotka oli tuotettu yksinkertaisella EcoRI-uutolla. P_L-sisältävän osasen läsnäolo vah-

vistettiin HincII-digeroinnilla. Tämä entsyymi pilkkoi vektorin kolmeksi osaseksi, joiden koot olivat yhtäpitäviä kuvassa 4 esitettyjen osasten rakenteen kanssa. Tämä plasmidi merkittiin pPLc2:ksi, jossa "c":n tehtävänä on
 5 osoittaa P_L -promoottorin suuntautuminen myötäpäivään kopioinnin alkukohdan suhteen.

2. pPLc23 - yhden EcoRI-kohdan poistaminen pPLc2:sta

Plasmidi pPLc2 sisältää kaksi EcoRI-kohtaa - joista toinen on peräisin emä-pBR322-vektorista ja toinen läheltä
 10 BamHI-kohtaa, joka on tuotu kytkemällä HindIII-BamHI-osasia pPLa832:sta (kuva 4). pBR322:sta peräisin oleva EcoRI-kohta poistettiin pilkkomalla pPLc2 HindIII:lla ja XhoI:lla, mitä seurasi digerointi Bal31:n kanssa 30 minuutin ajan 25°C:ssa 0,6M NaCl:ssa, 12,5 mM sekä $CaCl_2$:ssa että $MgSO_4$:ssa, 1 mM
 15 EDTA:ssa ja 20 mM tris-HCl:ssa (pH 8,1). Eksonukleaasi Bal31 lyhentää 3'- ja 5'-terminaatiot vaiheittain (H.Gray et al., "Extracellular Nucleases of Pseudomonas Bal31. I. Characterization Of Single Strand-Specific Deoxyriboendo-nuclease And Double-Strand Deoxyriboexonuclease Activities",
 20 Nucleic Acids Res., 2, sivut 1459-92 (1975)).

Seos uutettiin fenolilla ja kloroformilla, laimennettiin 1 µg/ml:n DNA-pitoisuuteen ja liitettiin. Liittämisen jälkeen DNA pilkottiin uudelleen XhoI:lla ja HindIII:lla emä-plasmidi-molekyylien poistamiseksi ja transformoitiin
 25 M5219:een valiten karbenisilliini-resistenssin suhteen. Löydettiin yksi transformantti, josta HindIII- ja XhoI-kohta puuttuivat. Tämä plasmidi sisälsi yhden ainoan EcoRI-kohdan ja siinä oli kolme HindIII-kohtaa (kuva 4). Tämä jälkimmäinen ominaisuus vahvisti, että P_L -alue oli vielä läsnä.
 30 Tämä plasmidi nimettiin pPLc23:ksi.

Eksonukleolyttisen hajoamisen määrän määrittämiseksi Bal31-entsyymin vaikutuksesta pPLc23:n DNA pilkottiin samanaikaisesti BamHI:lla ja PstI:lla ja osasten koko määritettiin 1,4 %:sella agarosegeelillä. Verrattuna PstI-BamHI-
 35 osaseen emä-pPLa2:sta PstI-BamHI-osasesta pPLc23:sta oli

jäänyt pois yli 800 emäsparia. Yhdistetty digerointi EcoRI-PstI-HaeII:lla verrattuna EcoRI-PstI-pilkkomiseen vahvistii, että HaeII-kohta liitoskohdassa P_L -sisältävän osasen ja kanamysiini-osasen välissä oli säilynyt.

- 5 3. pPLc236 - HindIII-kohdan tuominen pPLc23:een
 Plasmidi pPLc23 sisältää erikoiset EcoRI- ja BamHI-kohdat, jotka sijaitsevat noin 150 nukleotidin päässä myötävirtaan P_L -promoottorista (kuva 4). HindIII-inser-tiokohta tuotiin pPLc23:een liittämällä BamHI-HindIII-HindIII-
 10 BamHI-osanen, joka oli saatu pPLa832:sta, pPLc23:n BamHI-kohtaan. Transformantteja saatiin M5219:ssa ja seulottiin restriktioanalyysillä HindIII-kohdan suhteen. Edustavan kloonin rakenne vahvistettiin osasten, jotka oli saatu PstI-EcoRI-, PstI-BamHI- tai PstI-HindIII-digeroinnin jälkeen,
 15 agarosegeelielektroforeesilla. Osaset, jotka saatiin jokai-sen tällaisen yhdistetyn uuton jälkeen, kulkeutuivat pää-asiallisesti yhteen 1,4-%:sella agarosegeelillä osoittaen, että EcoRI-, BamHI- ja HindIII-kohdat sijoittuvat toisten-sa välittömään läheisyyteen. Tämä plasmidi merkittiin pPLc236:
 20 ksi (kuva 4).

- Suurempi osa plasmidista pPLc236 on peräisin pBR322:sta BamHI-kohdasta asemassa 377 (J.Sutcliffe, supra) ainakin β -laktamaasigeenin alkukohtaan asti suunnilleen asemassa 4160 (J.Sutcliffe, supra). Loppuosa koostuu 1) sekvenssistä, jotka ovat peräisin osasta kanamysiini-geeniä, joka sijaitsee tämän osasen XhoI-kohdan ja yhden HaeII-pään välissä; 2) HaeII-BamHI-osasesta, joka sisältää P_L -promoottorin ja joka koostuu noin 300 nukleotidista ja on johdettu pPLa832:sta; 3) sekvenssistä, joka koodaa BamHI-HindIII-HindIII-BamHI-kohtia.
 30

4. pPLc28 - deleetio pPLc236:sta

- Kahden vierekkäisen HindIII-kohdan osittainen limit-tyminen pPLc236:ssa on BalI-kohta (ei-esitetty kuvassa 4). Plasmidi sisältää myös erikoisen PvuII-kohdan emäsparilla
 35 2067 pBR322-osalla (J.Sutcliffe, supra) (kuva 4). Entsyymit BalI ja PvuII tuottavat molemmat tasaisia päitä. pPLc236:n

DNA pilkottiin BalI:llä ja PvuII:lla ja liitettiin uudelleen alhaisella DNA-pitoisuudella. Transformantteja saatiin M5219:ssa valiten karbenisilliini-resistenssin suhteen. Edustavan kloonin DNA analysoitiin pilkkomalla. BamHI-pilkkominen antoi yksinkertaisen osasen, joka 1,4 -%:sella agarosegeelillä kulkeutui yhteen pPLc236:n suuremman osan kanssa BamHI-PvuII-pilkonnan jälkeen. Yhdistetty uutto joko PstI-EcoRI:lla, PstI-BamHI:lla tai PstI-HindIII:lla antoi kaikissa tapauksissa kaksi osasta, joista pienempi kulkeutui 1,4-%:sella agarosegeelillä pääasiallisesti yhteen PstI-EcoRI-osasen kanssa, joka oli saatu pPLc236:sta. Tämä plasmidi nimettiin pPLc28:ksi (kuva 4).

pPLc28:a, samoin kuin muita tämän keksinnön mukaisesti kuvattuja plasmideja, voidaan tietenkin manipuloida edelleen muiden pilkkomiskohtien kytkemiseksi. Esimerkiksi osanen, joka sisältää seuraavat kohdat: Xba-pilkkomiskohta - Sal-pilkkomiskohta - Xba-pilkkomiskohta - Pst-pilkkomiskohta - Xba-pilkkomiskohta - on kytketty pPLc28:aan HindIII-pilkkomiskohtaan. Tämä plasmidi nimettiin pPLc2819:ksi. Toinen samankaltainen manipulointi antoi plasmidin, joka sisälsi Pst-pilkkomiskohdan - Sal-pilkkomiskohdan - Xba-pilkkomiskohdan - Sal-pilkkomiskohdan - Xba-pilkkomiskohdan sisältävän osasen kytkettynä pPLc28:n BamHI-kohtaan. Tämä plasmidi nimettiin pPLc2833:ksi.

5. pPLc24 - bakteriofaagi MS2-relikaasiproteiinin ribosomi-sitomiskohdan ja aminopääteosan kytkeminen pPLc28:aan

431 emäsparin EcoRI-BamHI-osanen, joka koodaa bakteriofaagi MS2-replikaasigeenin ribosomi-sitomiskohdan ja ensimmäiset 98 aminohappotähdettä, saatiin plasmidi pMS2-7:stä (R.Devos et al., "Construction And Characterization Of A Plasmid Containing A Nearly Full-Size DNA Copy Of Bacteriophage MS2 RNA", J.Mol.Biol., 128, sivut 595-619 (1979)). Tämä osanen kytkettiin plasmidiin pPLc28 korvaamaan alkuperäinen EcoRI-BamHI-osanen siinä (kuva 5). Syntyneen plas-

midin, joka merkittiin pPLc24:ksi, rakenne vahvistettiin restriktioanalyysillä EcoRI-BamHI:lla ja vertaamalla saatujen osasten kokoa niihin, jotka saatiin pMS2-7:n ja pPLc28:n EcoRI-BamHI-digeroinnin jälkeen. MS2-replikaasi-proteiini-
 5 osasen pPLc24-translaatio kulkee kolineaarisesti transkription kanssa P_L -promoottorilta ja on siten P_L -säätelyn alainen.

Tämän keksinnön vektoreilla transformoitujen isäntäsolujen biologisia ominaisuuksia.

10 1. Pysyvyys 28°C:ssa.

K12 Δ HI- tai M5219-kantoja, jotka oli transformoitu jollakin edellä kuvatuista vektoreista, viljeltiin 28°C:ssa 20 sukupolvea LB-väliaineessa valikoimatta antibioottisen resistanssimerkkiaineen suhteen. Viljelyjen so-
 15 pivia laimennuksia levitettiin sitten levyille 28°C:ssa halutun antibiootin joko läsnäollessa tai poissaollessa. Kaikissa tapauksissa saatujen kolonnioiden lukumäärä oli sama riippumatta valinnasta antibioottisen resistenssin suhteen, mikä osoitti, että vektorit olivat täysin pysyviä näissä
 20 isännissä 28°C:ssa (ks. taulukko I, infra).

Kaikki vektorit voitiin myös transformoida isäntäkantaan, joka on lysogeeninen bakteriofaagille . Tällaiset kannat, joissa oleva faagi syntetisoi villintyyppisen cI-tuotteen, olivat elinkykyisiä korotetussa lämpötilassa
 25 (37°C). Sensijaan ei-lysogeenisiä isäntiä ei voitu transformoida näillä vektoreilla. Sensijaan näistä kokeista saadut harvinaiset transformantit sisälsivät poikkeuksetta vektoreita, joiden deleetit poistivat kaiken tai suurimman osan P_L -alueesta.

30 2. P_L -vektoreita sisältävien solujen käyttäytyminen pidennetyn induktion jälkeen 42°C:ssa

K12 Δ HI- ja M5219-kantojen, jotka oli transformoitu tämän keksinnön vektoreilla, levyviljelyn tehokkuus 42°C:ssa määriteltiin käyttäen antibioottista valikointia tai
 35 ilman sitä.

Vektorit, joissa oli P_L kytkettynä myötäpäivään suunnattuna kopioinnin alkukohdan suhteen (pPLc-tyyppi), käyttäytyivät samalla tavalla. pPLc236:lla saadut tulokset on esitetty taulukossa I, infra. Kanta Kl2 HI, joka
 5 oli transformoitu pPLc236:lla, kasvoi levyillä yhtä hyvin 42°C :ssa kuin 28°C :ssa riippumatta siitä käytettiinkö antibioottista valintaa vai ei. Kanta M5219, joka oli transformoitu pPLc236:lla, kasvoi ei-selektiivisillä levyillä tehokkuudella 1. Kun käytettiin antibiootti-valintaa,
 10 levykasvun tehokkuus putosi kuitenkin vähintään 1000-kertaisesti. Koloniät, jotka oli saatu 42°C :ssa ei-selektiivisillä levyillä, eivät enää olleet resistenttejä antibioottimerkkiaineelle.

Vektoreilla, joissa oli P_L kytkettynä vastapäivään suunnattuna kopioinnin alkukohtaan nähden (pPLa-tyyppi),
 15 oli monimutkaisempi kolonian muodostusmalli 42°C :ssa. Kannan M5219 transformantit eivät muodostaneet kolonioita 42°C :ssa, ei edes antibioottisen valinnan poissaollessa (levyviljelyn tehokkuus oli pienempi kuin 10^{-3} ; taulukko I).
 20 Kannan Kl2 HI transformanttien käyttäytyminen 42°C :ssa riippui läsnäolevan vektorin luonteesta. Esimerkiksi, kun transformanteilla, jotka sisälsivät pPLa832:n, poikkeuksetta esiintyi ainakin 1000-kertainen levykasvutehokkuuden aleneminen, sekä antibiootti-valinnalla että ilman sitä,
 25 oli transformanteilla, jotka sisälsivät pPLa23:n tai pPLa2311:n, levykasvutehokkuudet väliltä $1-10^{-3}$, usein suurin erilaisuuksin kolonioiden koossa.

Siten pPLa-tyyppisten vektoreiden ekspressointi 42°C :ssa aiheuttaa häiriöitä isännän aineenvaihduntaan, mikä tekee solujen eloonjäämisen tässä korkeassa lämpötilassa mahdottomaksi, myös valinnan puuttuessa plasmidia varten. Tämä vaikutus on useimmiten korostunut M5219-isäntiä käytettäessä. Sitävastoin pPLc-tyyppiset vektorit eivät suoraan häiritse isäntäsolun aineenvaihduntaa, koska havaitaan indusoitujen solujen 100-%:nen eloonjääminen selek-

tiivisen paineen poissaollessa. Jatkuvasta transkriptios-
 ta P_L -promoottorilta lähtien samanaikaisesti N-geenin
 ekspression kanysa M5219:ssa voi seurauksena kuitenkin
 olla vektorikopionnin estyminen M5219-kannoissa. Tätä
 5 kuvaa tällaisten solujen kyvyttömyys kasvaa 42°C :ssa se-
 lektiivisillä levyillä.

Taulukko I

10			Kasvun tehokkuus levyllä ^{x)}			
			28 ^o C		42 ^o C	
	Kanta	Vektori	Käyttämättä valinointia	Käyttäen valikoin- tia	Käyttämättä valikointia	Käyttäen valikoin- tia
15	K12	HI ilman	1	-	1	-
		pPLa23	1	1	$1-\leq 10^{-3}$	$1-\leq 10^{-3}$
		pPLa2311	1	1	$1-\leq 10^{-3}$	$1-\leq 10^{-3}$
		pPLa832	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
		pPLc236	1	1	1	1
20	M5219	ilman	1	-	1	-
		pPLa23	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
		pPLa2311	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
		pPLa832	1	1	$\leq 10^{-3}$	$\leq 10^{-3}$
		pPLc236	1	1	1	$\leq 10^{-3}$
25						

x) Bakteeriviljelyt kasvatettiin kyllästyksen asti LB-väli-
 aineessa 28^oC:ssa antibiootin läsnäollessa. Sopivia laimen-
 noksia kasvatettiin levyllä antibiootin joko läsnä- tai
 30 poissaollessa ja inkuboitiin 28^oC:ssa tai 42^oC:ssa. Saatu-
 jen kolonioiden lukumäärä laskettiin.

Geenien ekspressoointi tämän keksinnön vektoreissa

1. Yleinen menettelytapa

Tämän keksinnön vektoreita voidaan käyttää hyödyksi
 35 tuottamaan joukko erilaisia polypeptidejä ja proteiineja kyt-

kemällä DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat haluttuja polypeptidejä tai proteiineja, vektoreihin yhteen endonukleaasi-tunnistuskohdista lähellä promoottoria ja operaattoria, transformoimalla sopivia isäntiä vektoreilla, jotka
 5 sisältävät näitä kytkettyjä DNA-sekvenssejä, viljelemällä isäntiä ja kokoamalla polypeptidit tai proteiinituotteet. Esimerkkejä tällaisista polypeptideistä ja proteiineista ovat leukosyytti-interferoni, insuliini, hepatitiksien antigeenit, suu- ja sorkkataudin antigeenit, fibroblasti-interferoni, ihmisen kasvuhormoni, immuuni-interferoni ja joukko erilaisia muita prokaryoottisia, eukaryoottisia ja viraleja entsyymejä, hormoneja, polypeptidejä, antigeenejä ja proteiineja.

Näiden prosessien valaisemiseksi spesifisten geenituotteiden synteesiä tämän keksinnön vektoreissa tarkkailtiin pulssimerkitsemällä indusoituja soluja ja analysoimalla merkityt proteiinit polyakryyliamidi-geelielektroforeesilla.

Tämän keksinnön vektoreilla transformoituja soluja kasvatettiin LB-väliaineessa ilman antibioottia 28°C:ssa 2 x
 20 10⁸/ml:n tiheyteen. Solut koottiin linkoamalla ja suspendoitiin uudelleen alkuperäiseen väliainemäärään, jossa oli 19mM NH₄Cl, 86 mM NaCl, 42 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 0,2 % glukoosia, 0,05 % cas-aminohappoja (Difco), 0,01 % hiivauutetta ja 50 µg/ml L-tryptofaania, solujen merkitsemiseksi
 25 si ¹⁴C-aminohapposeoksella, tai edellä mainittuun väliaineeseen, paitsi että cas-aminohapot ja hiivauute on korvattu 5 %:lla metioniini-analyysiväliainetta (Difco), solujen merkitsemiseksi ³⁵S-metioniinilla. Inkubointia 28°C:ssa jatkettiin 60 minuuttia. Puolet viljelystä vaihdettiin sitten
 30 42°C:seen. Eri ajankohtina induktion jälkeen merkittiin tasaosia 28°C:n ja 42°C:n viljelyistä ¹⁴C-aminohapposeoksella tai ³⁵S-metioniinilla (Amersham).

Merkkiaineen yhdistäminen lopetettiin fenoli-uutolla. Syntetisoidut proteiinit saostettiin fenoli-kerroksesta
 35 lisäämällä 5 tilavuusosaa etanolia ja liuotettiin uudelleen

1-%:seen SDS, 1-%:seen β -merkaptoetanoliin, 10-%:seen glyseroliin, 62,5 mM tris-HCl:ään (pH 6,8). Näytteitä keitettiin 5 minuuttia, lingottiin 12000 x g:ssä ja käsiteltiin sähköforeesilla SDS-sisältävissä polyakryyliamidi-geeleissä (10-15 % akryyliamidia) U.Laemmli'n menetelmän mukaisesti, "Cleavage Of Structural Proteins During the Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4", Nature, 227, sivut 680-82 (1970). Elektroforeesin jälkeen geelit valmisteltiin fluorografialla varten W.Bonner & R.Laskey'n menetelmän mukaisesti, "A Film Detection Method For Tritium-Labelled Proteins And Nucleic Acids In Polyakrylamide Gels", Eur.J.Biochem., 46, sivut 83-88 (1974) paitsi että EN³HANCE(NEN) käytettiin PPO-DMSO:n asemesta.

2. Prokaryoottiset geenit

15 a) β -laktamaasigeeni

pPLa23 (kuva 3) sisältää β -laktamaasigeenin suunnattuna alavirtaan P_L-promoottorista. Siten proteiinin, jota β -laktamaasigeeni koodaa, valmistumista voidaan tarkkailla osoituksena vektorin tehokkuudesta prokaryoottisten geenien 20 ekspressoinnissa.

K12 Δ HI:n ja M5219:n transformantteja pPLa23:lla - E.coli K12 Δ HI (pPLa23) ja E.coli M5219 (pPLa23) - valmistettiin kuten edellä kuvattiin ja niiden proteiinisynteesiä tarkkailtiin. Tulokset on esitetty kuvassa 8. Siinä voidaan 25 nähdä, että kahden proteiinin, joiden näennäiset molekyylipainot olivat vastaavasti 27,5K ja 30K, syntetisoimisnopeudessa oli tapahtunut voimakas kasvu pian transformanttien induktion jälkeen 42°C:ssa. Näiden ekspressoitujen proteiinien koot ovat yhtäpitäviä täysikasvuisen β -laktamaasin ja sen 30 prekursorin odotetun pituuden kanssa (J.Sutcliffe, supra).. Lisäksi näiden proteiinien indusoituun synteesiin rinnastui β -laktamaasin lisääntynyt entsymaattinen aktiivisuus, kuten määritettiin O'Callaghan'in et al. menetelmällä, "Novel Method For Detection Of β -laktamases By Using A Chromogenic Cephalosporin Substrate". Antimicrobial Agents and 35

Chemotherapy 1, sivut 283-88 (1972) ja kumpikin proteiini saostui spesifisesti anti- β -laktamaasiseerumilla. Vertailua varten tarkkailtiin proteiinisynteesiä isännissä, jotka eivät olleet transformoituja vektorilla pPLa23.

- 5 Kummankaan edellä kuvatun kahden proteiinin synteesiä ei havaittu näistä transformoimattomista isännistä.

Kuten kuvassa 8 on esitetty, on proteiinisynteesin kokonaismalli näissä transformanteissa hyvin samankaltainen 28°C:ssa ja 42°C:ssa. Joidenkin proteiinien synteesinopeus
 10 näyttää kuitenkin merkittävästi muuttuvan vaihtamalla solut 42°C:seen. Samanlainen käyttäytyminen on havaittu soluissa, jotka eivät ole transformoituja pPLa23:lla. Lisäksi, kuten kuvasta 8 näkyy, suuremman näistä kahdesta β -laktamaasi-sukuisesta proteiinista - käsittelemätön
 15 prekursori β -laktamaasille - suhteellinen määrä kasvaa ajan mukana induktion jälkeen. Tämä kallistuminen kohti prekursoriproteiini-rakennetta voi osoittaa solun β -laktamaasia käsittelevän mekanismin kyllästymistä.

β -laktamaasin syntetisoitumisprosentin määrittämiseksi verrattuna transformantin kokonais de novo-proteiinisynteesiin, proteiinirihmat β -laktamaasia (27,5K) ja sen prekursoria (30K) varten leikattiin kuivatusta geelistä ja niiden radioaktiivisuutta verrattiin geeliin kohdistettuun kokonaisradioaktiivisuuteen. Nämä tulokset on
 20
 25 esitetty taulukossa II.

Taulukko II

β -laktamaasin syntetisoitumisprosentti verrattuna kokonais de novo-proteiinisynteesiin

5	Kantaja		
	Minuuttia induktion jälkeen 42°C:ssa	K12 Δ HI (%)	M5219 (%)
10	0-10	8	9
	10-20	9	16
	20-30	10	25
	30-40	16	24
	40-50	23	30
15	50-60	27	-
	60-70	30	-
	70-80	33	-
	Vertailu 28°C:ssa	5	4

Kuten taulukossa II on esitetty, saavuttaa β -laktamaasin ja sen prekursorin synteesi noin 30 %:n maksimitason kokonais de novo-proteiinisynteesistä kummasakin isäntäsolukannassa. Kuitenkin kinetiikka tämän tason saavuttamiseksi on erilainen näille kahdelle kannalle - kanta K12 Δ HI myöhästyy noin 20 minuuttia kannasta M5219 30 %:n tason saavuttamisessa. Haluamatta olla sidottu mihinkään teoriaan voidaan olettaa, että N-geenituote, jota syntyy mukana kannan M5219 induktiossa mutta joka puuttuu kannalta K12 Δ HI, voittaa tietyt transkription vaimennus-signaalit DNA-sekvensseissä myötävirtaan P_L -promoottorista ja siten nopeuttaa β -laktamaasi-synteesiä kannassa M5219.

Kokonaisproteiinisynteesin nopeuden määrittämiseksi näissä transformanteissa, kokonaisradioaktiivisuus, joka yhdistettiin määrättyä ajanjaksona, määritettiin ja verrattiin siihen, joka yhdistettiin 0-10 minuutin väliaikana

(ts. tämä alkuaikaväli on mielivaltaisesti valittu 100 %:ksi vertailua varten). Tulokset on esitetty taulukossa III.

5

Taulukko III

Kokonaisproteiinisynteesin nopeus

	Minuutteja induktion jälkeen 42°C:ssa	Kanta	
		K12 Δ HI (%)	M5219 (%)
10	1-10	100	100
	10-20	104	92
	20-30	134	56
	30-40	113	31
	40-50	120	10
15	50-60	113	7
	60-70	96	3
	70-80	96	3
	150-160	20	-

20

Kuten taulukossa III on esitetty seisahtuu kokonaisproteiinisynteesi E.coli M5219 (pPLa23):ssa nopeasti induktion jälkeen. Tämä on yhtäpitävää sen aikaisemman havainnon kanssa, että M5219-transformantit eivät pystyneet elämään 42°C:ssa. Samankaltaista proteiinisynteesin estymistä ei havaita E.coli M5219 (pBR322):ssa. Melkoinen aleneminen kokonaisproteiinisynteesissä havaitaan myös E.coli K12 Δ HI (pPLa23):ssa pitkitetyn inkuboinnin jälkeen 42°C:ssa. Nämä solut pystyvät kuitenkin jäämään eloon 42°C:n lämpötiloissa.

25

30

b) Tryptofaani-syntetaasi A-geeni

i) pPLa23

EcoRI-osan (5300 emäsparia), joka sisälsi *Salmonella typhimurium*'in trp A kistronin saatiin pES9:sta (E.Selker et al., "Mitomycin C Induced Expression Of trp A Of *Salmonella typhimurium* Inserted Into The Plasmid

35

ColE1", J.Bacteriology, 129, sivut 388-94 (1977)) ja
kytkettiin pPLa23:een sen EcoRI-kohtaan. Kaksi edus-
tavaa plasmidia, joilla oli tämä osanen kytkettynä jom-
paankumpaan kahdesta mahdollisesta suuntauksesta P_L -
5 promoottorin suunnan suhteen, merkittiin pOLa23trpA₁:lla
ja pPLa23trpA₂:lla.

Kannan Kl2 Δ HI, joka sisältää joko pPLa23trpA₁:n
tai pPLa23trpA₂:n, induktioprofiilit on esitetty kuvassa
9. Noin 25000 daltonin pääproteiini indusoitui pPLa23trpA₁:
10 lla, mutta puuttui indusoiduista soluista, jotka sisäl-
sivät pPLa23trpA₂:n. Tämän proteiinin havaittu molekyyli-
paino on yhtäpitävä teoreettisen arvon (28500) kanssa,
joka ennustettiin S.typhimurium trp A geenin nukleotidisek-
venssistä (B.Nichols & C.Yanofsky, "Nucleotide Sequences
15 Of trp A Of Salmonella typhimurium And Escherichia coli:
An Evolutionary Comparison", Proc.Natl.Acad.Sci. USA.,
76, sivut 5244-48 (1979). Lisäksi entsyymiaktivisuus li-
sääntyi yhtäpitävästi trp A geenituotteen läsnäolon kans-
sa, kuten on määritetty O.Smith'in & C.Yanofsky'n mene-
20 telmien mukaisesti "Enzymes Involved In The Biosynthesis
Of Tryptophan", Methods in Enzymology, 5, sivut 794-806,
(1962) rinnan tämän indusoidun proteiinin keräytymisen
kanssa.

Sekä pPLa23trpA₁:n että pPLa23trpA₂:n pitkitetyn
25 induktion jälkeen syntetisoituu proteiini, jonka likimää-
räinen molekyyli-paino on 18K (kuva 9). Tämän proteiinin
syntetisoitumisprosentti verrattuna transformantin koko-
nais-de novo-proteiinisynteesiin on riippumaton EcoRI trp A-
osasen suuntautumisesta transkription suunnan suhteen P_L -
30 promoottorilta. Siten tämän proteiinin synteesiä oletet-
tavasti säätelee, ehkä lievästi lämpötilasta riippuva,
bakteeripromoottori, joka sijaitsee 5300 emäsparin EcoRI
trp A-osasella, jonka koodauskapasiteetti on todella pal-
jon tarvittua suurempi trp A varten (E. Selker, supra).

trp A:n syntetisoitumisprosentti verrattuna kokonais de novo proteiinisynteesiin transformantissa, määritettiin pääasiallisesti kuten edellä kuvattiin β -laktamaasille. Tulokset on esitetty taulukossa IV. Jälleen
 5 trp A-synteesi saavutti noin 30 %:n maksimitason kokonais de novo-synteesistä.

Taulukko IV

trp A:n syntetisoitumisprosentti verrattuna kokonais de novo proteiinisynteesiin

Minuutteja induktion jälkeen 42°C:ssa	K12 Δ HI /pPLa23A ₁ (%)	K12 Δ HI /pPLa23A ₂ (%)
0-10	3	2
15 30-50	4	2
60-80	14	1
90-110	21	2
120-140	24	2
150-170	33	2
20 Vertailu 28°C:ssa	2	3

ii) pPLa2311

Valmistettiin myös rekombinantti-DNA-molekyyli, joka oli samanlainen kuin pPLa23trpA₁, mutta joka perustui pPLa2311:een, pääasiallisesti kuten edellä selostettiin. K12 Δ HI-transformantit pPLa2311trpA₁:n kanssa käyttäytyivät samalla tavalla kuin transformantit pPLa23trpA₁:n kanssa (paitsi että tässä kokeessa kokonais de novo-synteesin maksimitaso oli ainoastaan 20 % 150 minuutin kuluttua). Jälleen pitkitetty induktio johti pie-
 25 tetettiin. K12 Δ HI-transformantit pPLa2311trpA₁:n kanssa
 30 neen vähennykseen kokonaisproteiinisynteesissä.

iii) pPLc23

pES9:n EcoRI-osasen toinen pää sijaitsee trp B-geenin sisällä ja sisältää yhden ainoan SalI-kohdan noin 2500 emäsparin päässä EcoRI-kohdasta (E.Selker et al., supra).
 35

Koska trp A-geeni ei sisällä SalI-kohtaa, (B.Nichols & C.Yanofsky, supra), täytyy trp A-geenin sijaita täydellisesti pES9:n EcoRI-osasen siinä osassa, joka ulottuu ensimmäisestä EcoRI-kohdasta SalI-kohtaan. Siten edellä valmistettua pES9:n EcoRI-osasta digeroitiin SalI:n kanssa ja saatu osanen kytkettiin pPLc23:een korvaamaan EcoRI-SalI-osanen siinä (kuva 4). trp A-geenin translaation havaitun suunnan perusteella pPLa23trpA₁:ssa ja pPLa23trpA₂:ssa, pPLc23-pohjainen rekombinantti-DNA-molekyyli, jossa oli trp A-geeni kolineaarisena transkription kanssa P_L-promoottorilta, merkittiin pPLc23trpA₁:ksi.

E.coli K12 Δ HI (pPLc22trpA₁):n induktion jälkeen (42°C) trp A syntetisoitui noin 40 %:n maksimitasolle kokonais de novo-proteiinisynteesistä 3 tunnin induktion jälkeen. Lisäksi tämä korkea de novo-synteesi ylläpidettiin 2 tuntia (kuva 10). Nämä tulokset on esitetty taulukossa V, infra. Siten, vastakohtana pPLa-tyyppisten vektorien käyttäytymiselle, pPLc-tyyppisten transformanttien proteiinisynteesi ei vähene ennenkuin noin 5 tuntia induktion jälkeen.

Taulukko V

	Minuutteja induktion jälkeen 42°C:ssa	trp A:n syntetisointumisosentti x) (%)	Kokonaisproteiinisynteesin nopeus (%)
25	30-50	11	100 (vertailu)
	60-80	17	198
	120-140	31	228
30	180-200	41	162
	240-260	36	205
	300-320	39	213
	Vertailu 28°C:ssa (300-320)	3	-

x) Verrattuna kokonais de novo-proteiinisynteesiin.

Edellä esitettyihin transformantteihin kasautuneen indusoidun proteiinin tarkka määrä mitattiin myös merkitsemällä jatkuvasti indusoidut solut. *E. coli* Kl2 Δ HI (pPLc23trpA₁) kasvatettiin 28°C:ssa LB-väliaineessa 1×10^7 solua/ml tiheyteen. Solut merkittiin sitten 10^7 uCi 14 C-aminohapposeoksella. Viljelytiheydellä 4×10^7 solua/ml solut vaihdettiin 42°C:seen ja inkubointia jatkettiin. Kun viljely saavutti kyllästyksen (6 tuntia induktion jälkeen), proteiinit uutettiin soluista ja erotettiin SDS-polyakryyliamidigeeleillä. Radioaktiivisuus-prosentti, joka oli yhdistynyt trp A-rihmaan, määritettiin. Käytetyissä olosuhteissa voidaan olettaa, että solut ovat tulleet tasaisesti merkityiksi, niin että proteiiniin yhdistetty radioaktiivisuus heijastaa solussa läsnäolevan proteiinin todellista määrää. trp A-proteiinin havaittiin muodostavan 10 % solun kokonaisproteiineista.

Tämä trp A:n 10 %:n pitoisuus *E. coli* Kl2 Δ HI (pPLc23trpA₁):n solun kokonaisproteiinista osoittaa myös tärkeät erot H. Bernard'in et al., supra, λ P_L sisältävien vektoreiden ja tämän keksinnön vektoreiden välillä. Vastakohtana tämän keksinnön vektoreiden antamalle 10 %:n todelliselle trp-A-pitoisuudelle H. Bernard et al. ilmoittaa trp A:n pitoisuudeksi ainoastaan 6,6 % - arvioituna trp A:n entsymaattisen aktiivisuuden ja oletetun spesifisen aktiivisuuden perusteella proteiinille. On myös huomattava, että H. Bernard'in et al. ilmoittama 6,6 %:n trp A-pitoisuus oli havaittu vektoreilla, jotka sisälsivät myös aktiivisen N-geenin, ja sentähden transkriptio toennäköisesti tapahtui anti-terminaatin-N-geenituotteen läsnäollessa. H. Bernard et al. ilmoitti ainoastaan 2 %:n trp A-pitoisuuden vektorilla, joka ei sisältänyt aktiivista N-geeniä. Sensijaan tämän keksinnön parannetuilla vektoreilla havaittu 10 %:n trp A-pitoisuus oli saatu N-geenituotteiden poissaollessa. Siten

nämä vektorit ja menetelmät muodostavat merkittävän parannuksen verrattuna tekniikan tasolla kuvattuihin vektoreihin ja menetelmiin.

c) Bakteriofaagi MS2-replikaasi-proteiinigeeni

5 Plasmidi pMS-7 sisältää RNA-bakteriofaagi MS2:n genomien lähes täysikokoisen kopion (R. Devos et al., supra). Faagi-replikaasigeeni (R) sisältyy EcoRI-PstI-osaseen. Tämä osan kytkettiin pPLa2311:een korvaamalla yksinkertaisesti tämän vektorin EcoRI-PstI-osan.

10 Transformantit E.coli K12 Δ HI (pPLa2311R₁) seulottiin karbenisilliini-herkkyyden suhteen, koska geeni ampicilliini-resistenssiä varten ei enää ole koskematon pPLa2311R₁:ssa. Kytketyn osan samaisuus todettiin ko-

15 silla pMS2-7-DNA:sta. pPLa2311R₁:ssä MS2-replikaasi-proteiinin transkriptio tapahtuu kolineaarisesti transkription kanssa P_L-promoottorilta.

E.coli K12 Δ HI (pPLa2311R₁):n indusoidut solut syntetisoivat proteiinin, jonka näennäinen molekyypaino on 59K (kuva 11). Tämän proteiinin koko on yhtäpitävä 60692 daltonin molekyylipainon kanssa, joka on laskettu MS2-replikaasille virus-RNA:n sekvenssiarvoista (W.Fiers et al., "Complete Nucleotide Sequence Of Bacteriophage MS2 RNA: Primary And Secondary Structure Of The

20 Replicase Gene", Nature, 260, sivut 500-507 (1976)).

Funktionaalisen MS2 replikaasiproteiinin läsnäolo pPLa2311R₁:lla transformoitujen solujen proteiinituotteissa vahvistettiin myös komplementaatioanalyysillä MS2 meripihka (amber)-mutanteilla. Tämä analyysi varmisti että pPLa2311R₁:llä transformoidut solut tuottivat tuotteen, joka spesifisesti täydensi MS2-mutantin tuotteen, jossa on vika replikaasigeenissä ja että solut, joita ei oltu transformoitu pPLa2311R₁:llä, eivät täydentäneet tällaisen mutantin tuotetta.

30

35 Mitä MS2 replikaasiproteiinisynteesiin tulee,

käyttäytyivät sekä E.coli K12 Δ HI (pPLa2311R₁) ja E.coli M5219 (pPLa2311R₁) samalla tavalla - 30 minuutin induktion jälkeen MS2-replikaasin syntetisointiprosentti oli 29 % kokonais de novo proteiinisynteesistä, jolloin proteiinisynteesin taso aleni nopeasti lisäinduktion aikana (kuva 11). Koska tällaista alentumista synteesitasossa ei havaittu β -laktamaasin tai trp A:n synteesissä, saattaa alentuminen olla MS2-replikaasin jonkun erikoisominaisuuden aiheuttama. Esimerkiksi, faagireplikaasin havaittu pyrkimys sitoutua omaan mRNA:hansa kohdassa lähellä kistronin keskiosaa (Meyer et al., "The Binding Sites Of Q β RNA", Experienta, 31, sivut 143 - (1975)) saattaa häiritä kompleksoidun mRNA:n jatkotranslaatiota.

3. Eukaryoottiset geenit

15 a) Simian virus 40 geenin pien-t antigeeni

HindIII DNA-osan, joka sisälsi täydellisen koodaussekvenssin SV40 pien-t antigeenia varten (G.Volckaert et al., "Nucleotide Sequence Of The Simian Virus 40 Small-t Gene", Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 75, sivut 2160-64 (1978))
20 kytkettiin pBR322:n HindIII-kohtaan (kuva 12). Insertiosuuntautuminen määritettiin restriktioanalyysillä, joka perustui asymmetrisesti sijaitsevan TaqI-kohdan läsnäoloon. Tästä hybridi DNA-molekyylistä leikattiin EcoRI-BamHI-osan, joka sisälsi edellä mainitun HindIII-osan
25 ja osia pBR322:sta ja kytkettiin pPLc28:aan korvaamaan sen EcoRI-BamHI-osan, niin että pien-t-antigeenin translaatiosuunta kulkee kolineaarisesti transkription kanssa P_L-promoottorista (kuva 12). Saatu rekombinantti-DNA-molekyyli merkittiin pPLc28SV_t5:ksi.

30 Etäisyyden lyhentämiseksi P_L-promoottorin ja geenin, joka koodaa pien-t-antigeeniä, alotuskodonin (ATG) välillä, pPLc28SV_t5 modifioitiin EcoRI-HindIII-osan poistamiseksi geenin ja P_L-promoottorin välistä. Näitä manipulaatioita on kuvattu kuvissa 12 ja 13. Ne käsittivät
35 pPLc28SV_t5:n pilkkomisen ClaI:lla, DNA:n 3'-pään palauttami-

sen kahdessa eri vaiheessa käyttäen T4 DNA:n 3'-eksonukleaasi-aktiivisuutta GTP:n ja vastaavasti TTP:n läsnäollessa, jatkokäsittelyn S1-nukleaasilla, EcoRI-liittäjien lisäämisen tylppään päähän, osasen pilkkomisen
 5 EcoRI:lla ja komplementaaristen päiden uudelleenliittämisen.

E.coli K12 Δ HI:n transformointi näillä modifioituilla hybridi-DNA-molekyyleillä ja induktio sai aikaan melko suurten määrien proteiinia, jonka näennäinen molekyyli-
 10 kyllipaino oli 14K, ekspresion (kuva 14). Tätä proteiinia ei valmistunut ilman induktiota ja sitä eivät tuottaneet isäntäsolut, joita ei ollut transformoitu vektoreilla, jotka sisältävät SV40 DNA.

Vaikka autenttisen pien-t-antigeenin molekyyli-
 15 paino on 19K ja näissä transformoiduissa soluissa tuotettu proteiini saostui vain hyvin niukasti vasta-aineilla, joita syntyi SV40:n suur-T-antigeeniä vastaan, varmisti kaksi dimensiollista tuntomerkkiä (elektroforeesi pH 3,5:ssä, mitä seurasi tästä proteiinista ja autenttisesta pien-t-antigeenistä peräisin olevien tryptisten peptidien kromatografia butanoli/etikkahappo/pyriidiini/vedessä (15:3:10:12)), että nämä kaksi olivat suhteissa toisiinsa. Haluamatta olla sidottu mihinkään teoriaan oletetaan, että mRNA:n, joka alkaa P_L-promoottorista, sekundaarinen rakenne on sellainen, että aloitus
 25 pien-t-antigeenin sisäisellä aloituskodonilla on etusijalla aloitukseen verrattuna todellisella aloitussignaaliilla. Tämä hypoteesi on myös yhtäpitävä sekundaarisen rakenteen kanssa, johon päästäisiin käyttäen D.Iserentant'-
 30 in & W.Fiers'in menetelmiä, "Secondary Structure Of mRNA And Efficiency Of Translation Initiation", Gene, 9, sivut 1-12 (1980), joidenkin näitä SV_t sisältävien vektoreiden nukleotidisekvensseistä.

Yksi modifioiduista pPLc28V_t5-rekombinantti DNA-
 35 molekyyleistä, jotka oli valmistettu kuten edellä, ekspres-

soi pieniä määriä 17K-komponenttia pää-14K-proteiini-komponentin lisäksi. Tämä molekyyli merkittiin pPLcSV_t5-37:ksi. Samalla kun 17K-proteiinin läsnäolo voitiin aluksi havaita ainoastaan spesifisellä immunopresipitaatiolla suur-T-antiseerumilla, molekyylin pidemmälle modifioiminen teki mahdolliseksi 17K-komponentin parantuneen synteesin. Tämä modifikaatio, joka käsitti pPLc28SV_t5-37:n pilkkomisen EcoRI:lla, peräytyneiden 3'-päiden jatkamisen DNA polymeraasi I:llä (K.Backman et al., supra) ja tylppien päiden uudelleenliittäminen, on saattanut muuttaa mRNA:n sekundaari-rakennetta. Isännät, jotka oli transformoitu pPLc28SV_t5-37-9:llä, antoivat noin 4 % kokonais de novo proteiinisynteesistään 17K-proteiinikomponenttina induktion jälkeen. Nämä tulokset on esitetty kuvassa 14.

Kuten kuvan 14 viiva c osoittaa, 17K-komponentti oli immunosakkautunut seerumilla hamsterista, jolla oli SV40-tuumori, pääasiallisesti samaan määrään kuin autenttinen pien-t-antigeeni, joka oli kasvanut SV40-infektoidun afrikan vihreän apinan munuaissoluissa.

20 b) Ihmisen fibroblasti-interferoni (HFIF) geeni

Kuten on kuvattu brittiläisessä patenttihakemuksessa nro 80 18701, jätetty 6.6.1980, kytkettiin geeni, joka koodaa ihmisen fibroblasti-interferonia, vektoreihin pPLa8 ja pPLc24 tuottamaan rekombinantti DNA-molekyyliä, jotka pystyvät transformoiduissa isännissä sopivan induktion jälkeen ekspressoimaan proteiineja, joilla on viruksen vastainen, fysiokemikaalinen, immunologinen ja biologinen vaikutus, joka läheisesti vastaa autenttista ihmisen fibroblasti-interferonia.

30 c) FMDV antigeeni-geeni

Kuten brittiläisessä patenttihakemuksessa nro 80 26661, jätetty 15.8.1980, on esitetty, kytkettiin DNA-sekvenssi, joka koodaa polypeptidiä ja joka antaa FMD virus-antigeenien spesifisyyden, vektoriin pPLc24 antamaan rekombinantti DNA-molekyyliä, jotka pystyvät

transformoiduissa isännissä sopivan induktion jälkeen ekspressoimaan polypeptidejä, joilla on FMD virus-antigeenien spesifisyys.

Mikro-organismeista ja vektoreista, jotka on valmistettu tässä kuvatuin menetelmin, ovat esimerkkejä viljelyt, jotka on talletettu kokoelmaan American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, United States 8.9.1980 ja nimetty PL-A - PL-D:ksi:

- A. E.coli M5219 (pPLa2311)
- 10 B. E.coli K12 Δ HI (pPLa8)
- C. E.coli K12 Δ HI (pPLc28)
- D. E.coli M5219 (pPLc24)

Näille viljelyille annettiin tulonumerot ATTC 31694-31697, vastaavasti.

- 15 Lisäksi mikro-organismeista ja vektoreista, jotka on valmistettu tässä kuvatuin menetelmin ja jotka myös sisältävät kytkettyjä DNA-sekvenssejä ekspressiota varten niissä, ovat esimerkkejä viljelyt, jotka on tallennettu viljelykokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikro-
- 20 organismen in Gottingen, BRD ja ne on nimetty seuraavasti:
- HFIF-D: E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12) /DSM 1851/
 - HFIF-E: E.coli K12 Δ HI (G-pPLa-HFIF-67-12) /DSM 1852/
 - HFIF-F: E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19) /DSM 1853/
 - HFIF-G: E.coli M5219 (G-pPLc-HFIF-67-8) /DSM 1854/
 - 25 FMDV-A: E.coli W6 (λ_{rex} - pPL-VP1-1) /DSM 1879/
 - FMDV-B: E.coli NF1 (λ N⁻cro⁻cI_{ts}-pPL-VP1-1) /DSM 1880/
 - FMDV-C: E.coli NF1 (λ N⁻cro⁻cI_{ts}-pPL-VP1-5) /DSM 1881/.
- Viljelyt HFIF-D-HFIF-G talletettiin 5.6.1980.
- Viljelyt FMDV-A-FMDV-C talletettiin 31.7.1980.

- 30 Samalla kun edellä on esitetty joukko tämän keksinnön suoritusmuotoja, on selvää, että tätä perusrakennetta voidaan muuttaa antamaan muita suoritusmuotoja, jotka käyttävät tämän keksinnön menetelmiä ja yhdistelmiä. Siten on selvää, että tämän keksinnön piiri on määriteltävä
- 35 oheisilla patenttivaatimuksilla eikä spesifisillä suoritusmuotoilla, jotka on edellä esitetty esimerkinomaisesti.

Patenttivaatimukset:

1. Vektori, joka sisältää ainakin yhden DNA-sekvenssin, joka käsittää ainakin yhden promoottorin ja operaattorin, jotka ovat peräisin bakteriofaagista λ ,
 5 t u n n e t t u ainakin yhdestä endonukleaasi-tunnistuskohdasta, joka sijaitsee vähemmän kuin noin 300 emäsparin etäisyydellä DNA-sekvenssin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja operaattorin.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen vektori, t u n n e t t u aktiivisen cro-geenin tai aktiivisen N-geenin poissaolosta.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että promoottori ja operaattori
 15 on $P_{L}^{O_L}$ tai $P_{R}^{O_R}$.
4. Jonkun patenttivaatimusten 1-3 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että tunnistuskohta on EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, Xba tai Sal.
5. Jonkun patenttivaatimusten 1-4 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että tunnistuskohta sijaitsee vähemmän kuin noin 150 emäsparin päässä DNA-sekvenssin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja operaattorin.
- 20 6. Jonkun patenttivaatimusten 1-5 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ribosomin sitomiskohdan.
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että ribosomin sitomiskohta on peräisin bakteriofaagi MS2-replikaasista.
- 30 8. Jonkun patenttivaatimusten 1-7 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että yhteen endonukleasitunnistuskohdista sisällytetään DNA-sekvenssi, joka koodaa eukaryoottista, prokaryoottista tai virus-proteiinia, polypeptidiä, entsyymiä, hormonia, antigeeniä tai niiden osasta.

9. Menetelmä parannetun kloonausvektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että olemassa olevaan kloonaussiirtäjään kytketään ainakin yksi DNA-sekvenssi, joka käsittää ainakin yhden promoottorin ja operaattorin, jotka ovat peräisin bakteriofaagista λ , ja joka sisältää $P_{R_R}^O$:n tai $P_{L_L}^O$:n, ja tähän kloonaussiirtäjään aikaansaadaan ainakin yksi endonukleaasi-tunnistuskohda vähemmän kuin noin 300 emäsparin päähän DNA-sekvenssin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja operaattorin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inaktivoidaan jokainen aktiivinen cro-geeni tai jokainen aktiivinen N-geeni, joka sijaitsee tässä DNA-sekvenssissä.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tunnistuskohda on EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, Xba tai Sal.

12. Jonkun patenttivaatimusten 9-11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tunnistuskohda sijaitsee vähemmän kuin noin 150 emäsparin päässä DNA-sekvenssin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja operaattorin.

13. Jonkun patenttivaatimusten 9-12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vektoriin kytketään ribosomin sitomiskohta.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ribosomin sitomiskohta on peräisin bakteriofaagi MS2-replikaasista.

15. Menetelmä rekombinantti DNA-molekyylin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kytketään DNA-sekvenssi, joka koodaa eukaryoottista, prokaryoottista tai virus-proteiinia, polypeptidiä, entsyymiä, hormonia, antigeeniä tai niiden osasta, ainakin yhteen endonukleaasi-tunnistuskohtaan vektorissa, joka käsittää

1) ainakin yhden DNA-sekvenssin, joka sisältää ainakin yhden promoottorin ja operaattorin, joka on johdettu bakteriofaagista λ ja joka sisältää $P_{R}O_{R}:n$ tai $P_{L}O_{L}:n$ ja

5 2) tämän ainakin yhden endonukleaasi-tunnistuskohdan, joka sijaitsee vähemmän kuin noin 300 emäsparin päässä DNA-sekvenssin siitä osasta, joka sisältää promoottorin ja operaattorin.

16. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään isäntää, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 8 mukaisella vektorilla, ja kerätään polypeptidi.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on leukosyytti-interferoni, fibroblasti-interferoni, immuuni-interferoni, insuliini, ihmisen kasvuhormoni, eläimen kasvuhormoni, hepatitoksen antigeenejä, suu- ja sorkkataudin ja muita viruksia, ja muita prokaryoottisia, eukaryoottisia ja virus-entsyymejä, hormoneja, polypeptidejä, proteiineja
15
20 tai aminohappoja.

Patentkrav:

1. Vektor bestående av minst en DNA-sekvens som innehåller minst en promotor och operator som här-
 5 letts från bakteriofagen λ , k ä n n e t e c k n a d
 av minst ett endonukleas-igenkänningsställe som ligger
 närmare än ca 300 baspar från den delen av DNA-sekvensen
 som innehåller promotorn och operatorn.
2. Vektor enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -
 10 n a d av borovaron av aktiv cro-gen eller aktiv N-gen.
3. Vektor enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n -
 n e t e c k n a d därav, att promotorn och operatorn
 är $P_{L}^{O_L}$ eller $P_{R}^{O_R}$.
4. Vektor enligt något av patentkraven 1-3,
 15 k ä n n e t e c k n a d därav, att igenkänningsstället
 är EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, Xba eller Sal.
5. Vektor enligt något av patentkraven 1-4, k ä n -
 n e t e c k n a d därav, att igenkänningsstället ligger
 närmare än ca 150 baspar från den delen av DNA-sekvensen
 20 som innehåller promotorn och operatorn.
6. Vektor enligt något av patentkraven 1-5, k ä n -
 n e t e c k n a d därav, att den innehåller ett ribosom-
 bindningställe.
7. Vektor enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k -
 25 n a d därav, att ribosombindningsstället härletts från
 bakteriofag MS2-replicas.
8. Vektor enligt något av patentkraven 1-7, k ä n -
 n e t e c k n a d därav, att i ett av endonukleas-igen-
 känningsställena inkluderas en DNA-sekvens som koderar för
 30 ett eukaryotiskt, prokaryotiskt eller virus-protein, poly-
 peptid, enzym, hormon, antigen eller fragment därav.
9. Förfarande för framställning av en förbättrad
 kloningsvektor, k ä n n e t e c k n a t därav, att i en
 existerande kloningsvehikel kopplas minst en DNA-sekvens

5 som innehåller minst en promotor och operator som härletts från bakteriofagen λ och som innehåller $P_{R}O_R$ eller $P_{L}O_L$ och i kloningsvehikeln åstadkommes minst ett endonukleasigenkänningsställe närmare än ca 300 baspar från den delen av DNA-sekvensen som innehåller promotorn och operatorn.

10 10. Förfarande enligt patentkravet 9, k ä n n e t e c k n a t därav, att alla aktiva cro-gener och alla aktiva N-gener som ligger i DNA-sekvensen inaktiveras.

11. Förfarande enligt patentkravet 9 eller 10, igenkänningsstället är ligger närmare än ca 150 baspar från den delen av DNA-sekvensen som innehåller promotorn och operatorn.

15 13. Förfarande enligt något av patentkraven 9-12, k ä n n e t e c k n a t därav, att i vektorn kopplas ett ribosom-bindningsställe.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att ribosom-bindningsstället härletts från bakteriofag MS2-replicas.

20 15. Förfarande för framställning av en rekombinant DNA molekyl, k ä n n e t e c k n a t därav, att en DNA-sekvens som koderar för ett eukaryotiskt, prokaryotiskt eller virus-protein, polypeptid, enzym, hormon, antigen eller fragment därav, kopplas till minst ett endonukleasigenkänningsställe av en vektor som består av

1) minst en DNA-sekvens som innehåller minst en promotor och operator som härletts från bakteriofag λ och innehåller $P_{R}O_R$ eller $P_{L}O_L$ och

2) minst ett endonukleasigenkänningsställe som
30 ligger närmare än ca 300 baspar från den delen av DNA-sekvensen som innehåller promotorn och operatorn.

35 16. Förfarande för framställning av en polypeptid, k ä n n e t e c k n a t därav, att en värd som transformerats med en vektor enligt patentkravet 8 odlas och polypeptiden samlas.

17. Förfarande enligt patentkravet 16, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att polypeptiden är leukocyt inter-
feron, fibroblast interferon, immun interferon, insulin,
humant växthormon, animaliskt växthormon, antigener av
5 hepatitis, mul- o. klövsjuka- och andra virus, och andra
prokaryotiska, eukaryotiska och virus-enzymmer, hormoner,
polypeptider, proteiner eller aminosyror.

FIG. 1

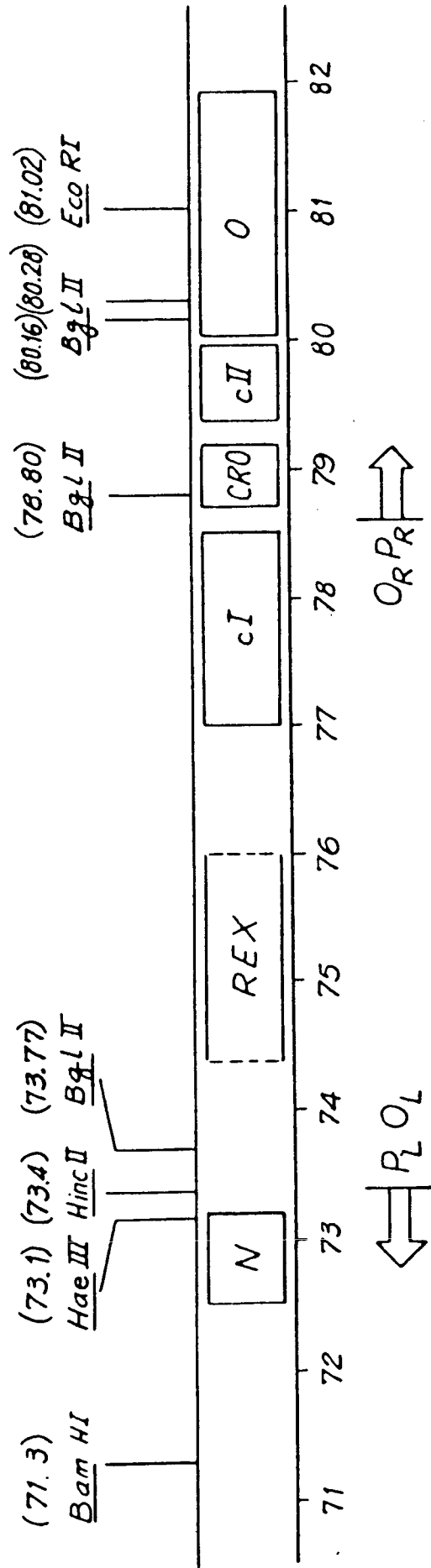


FIG. 2

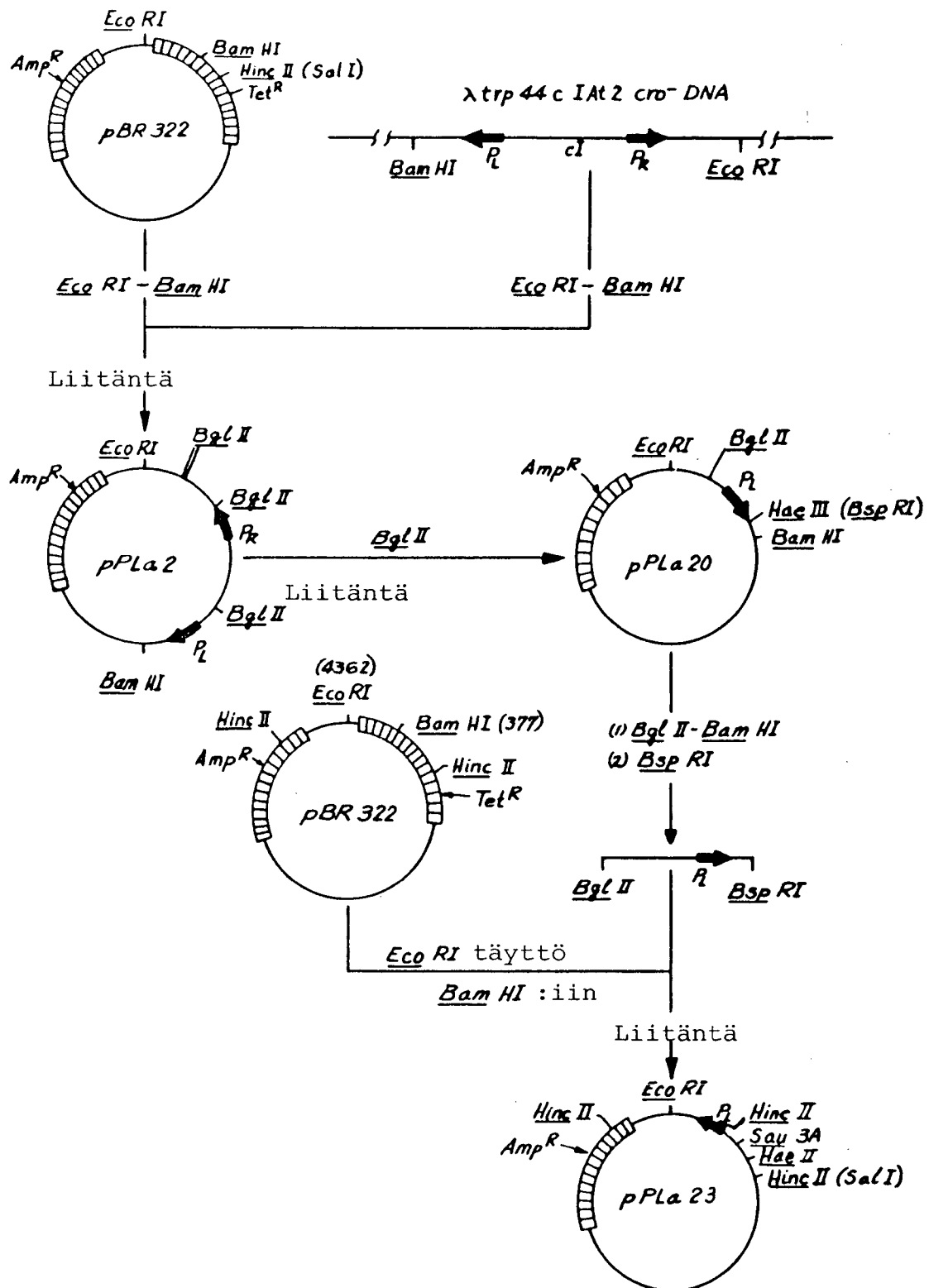


FIG.3

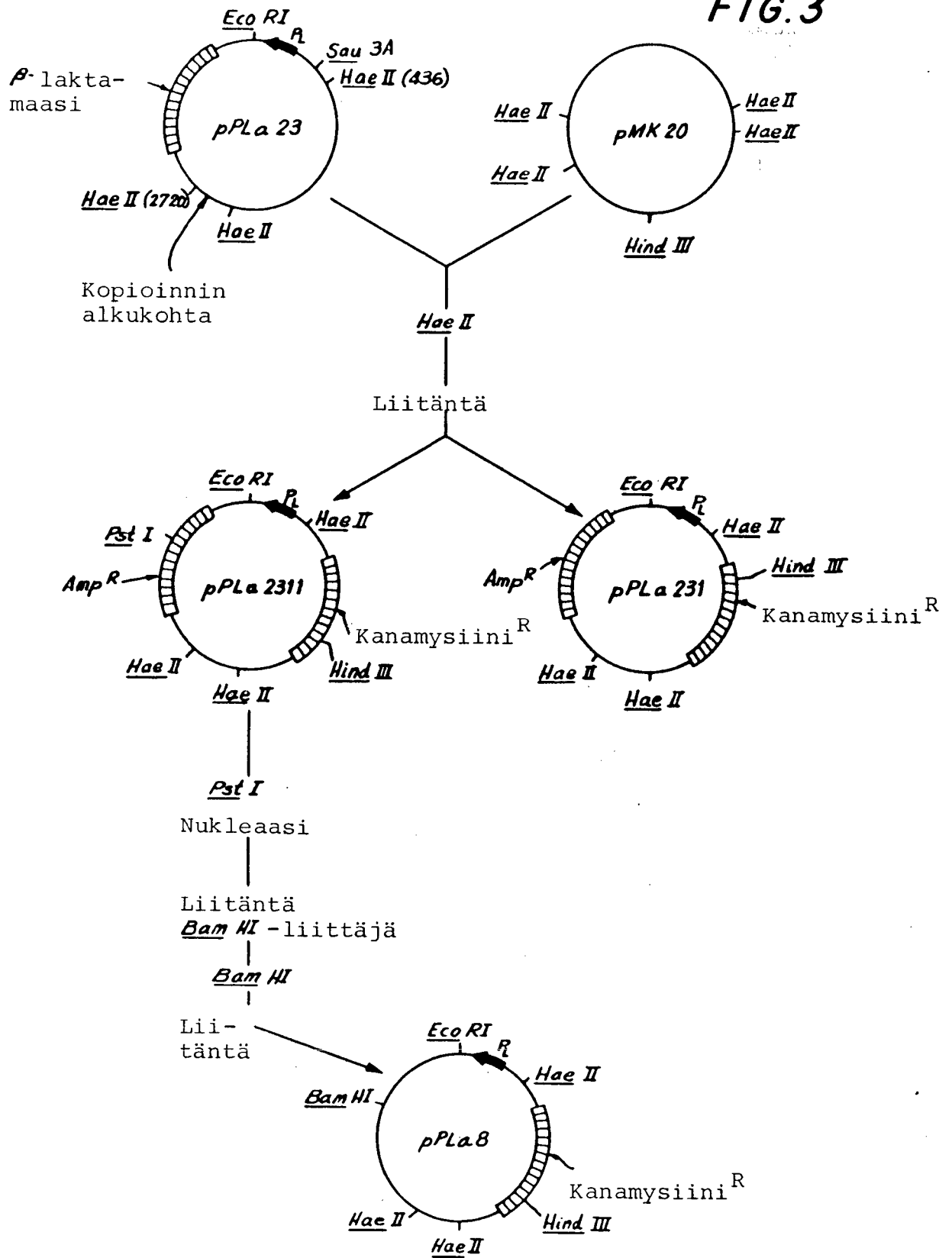


FIG. 4

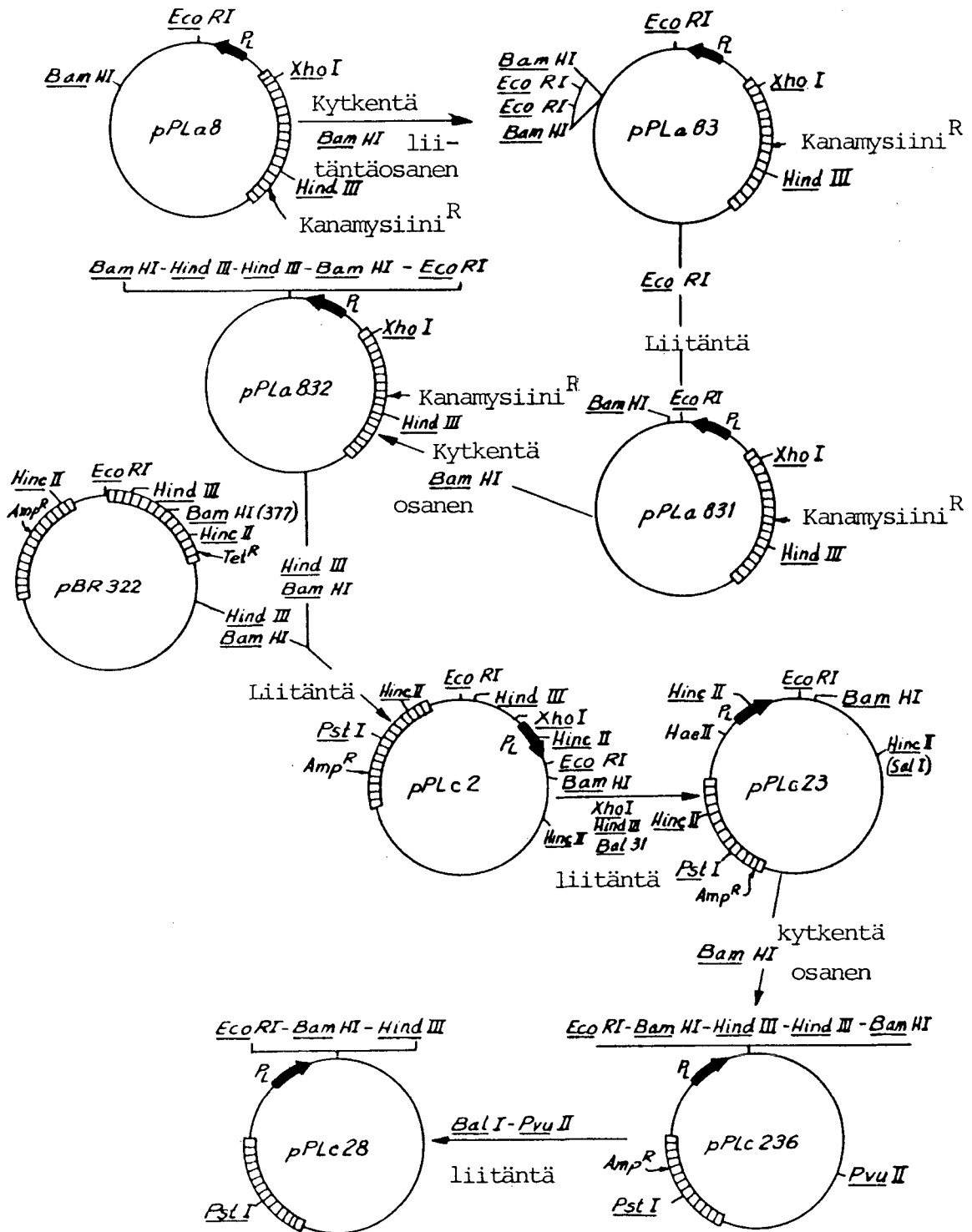
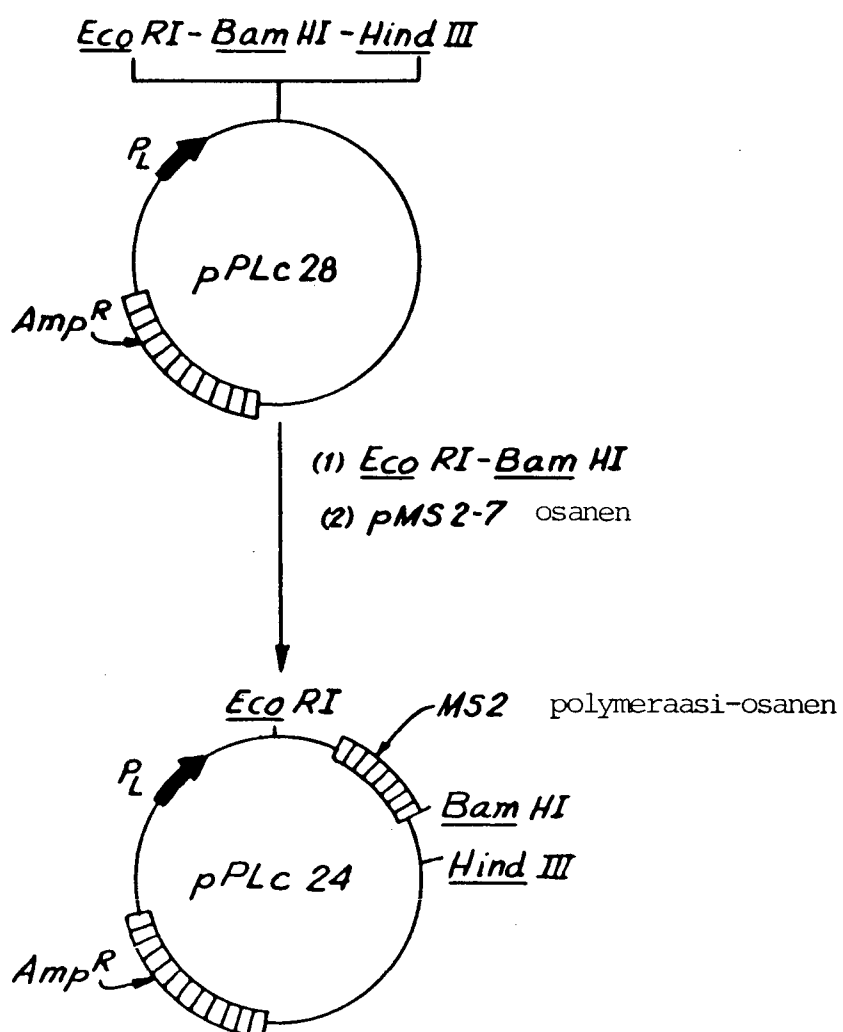
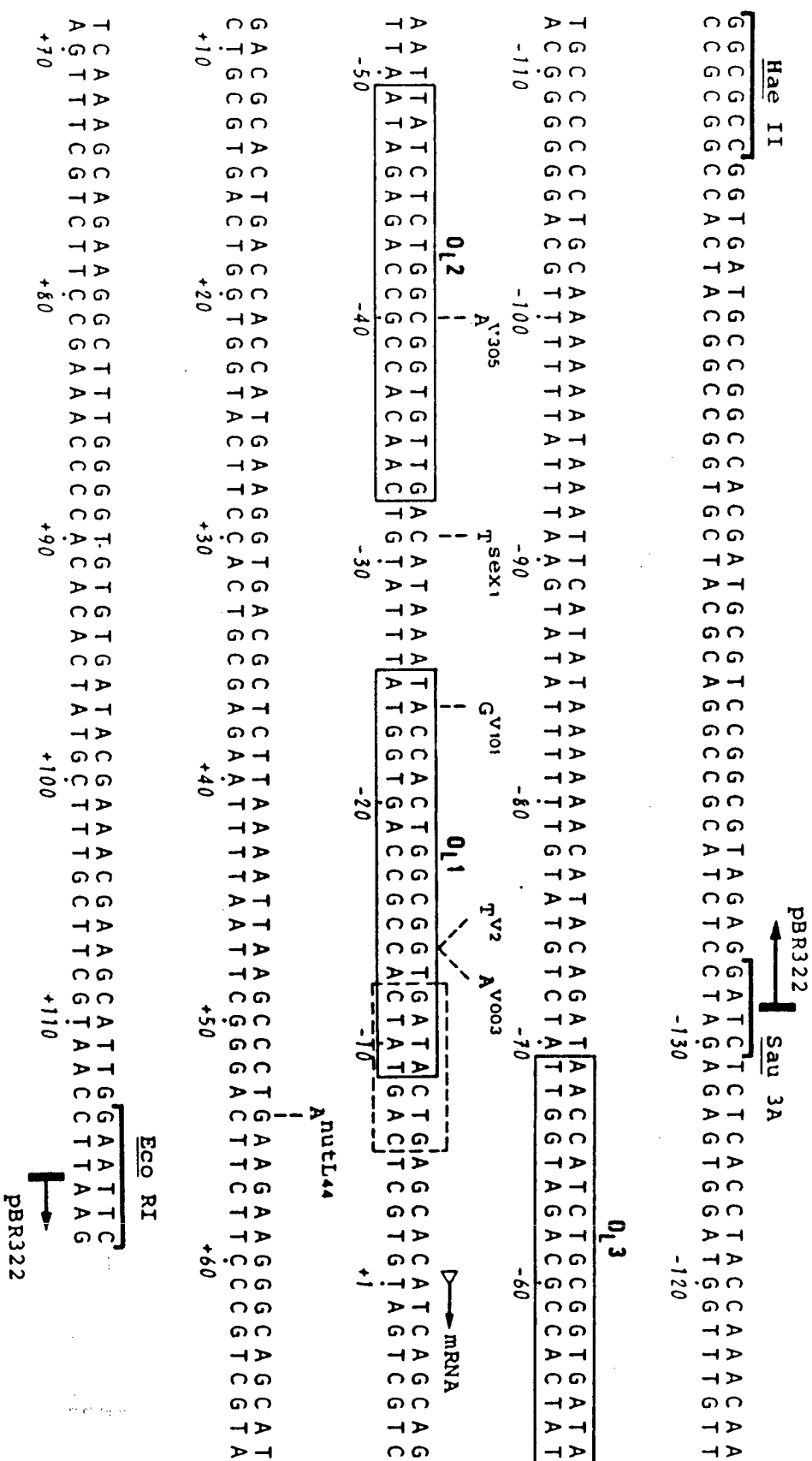


FIG. 5



LAMBDA promoter_L



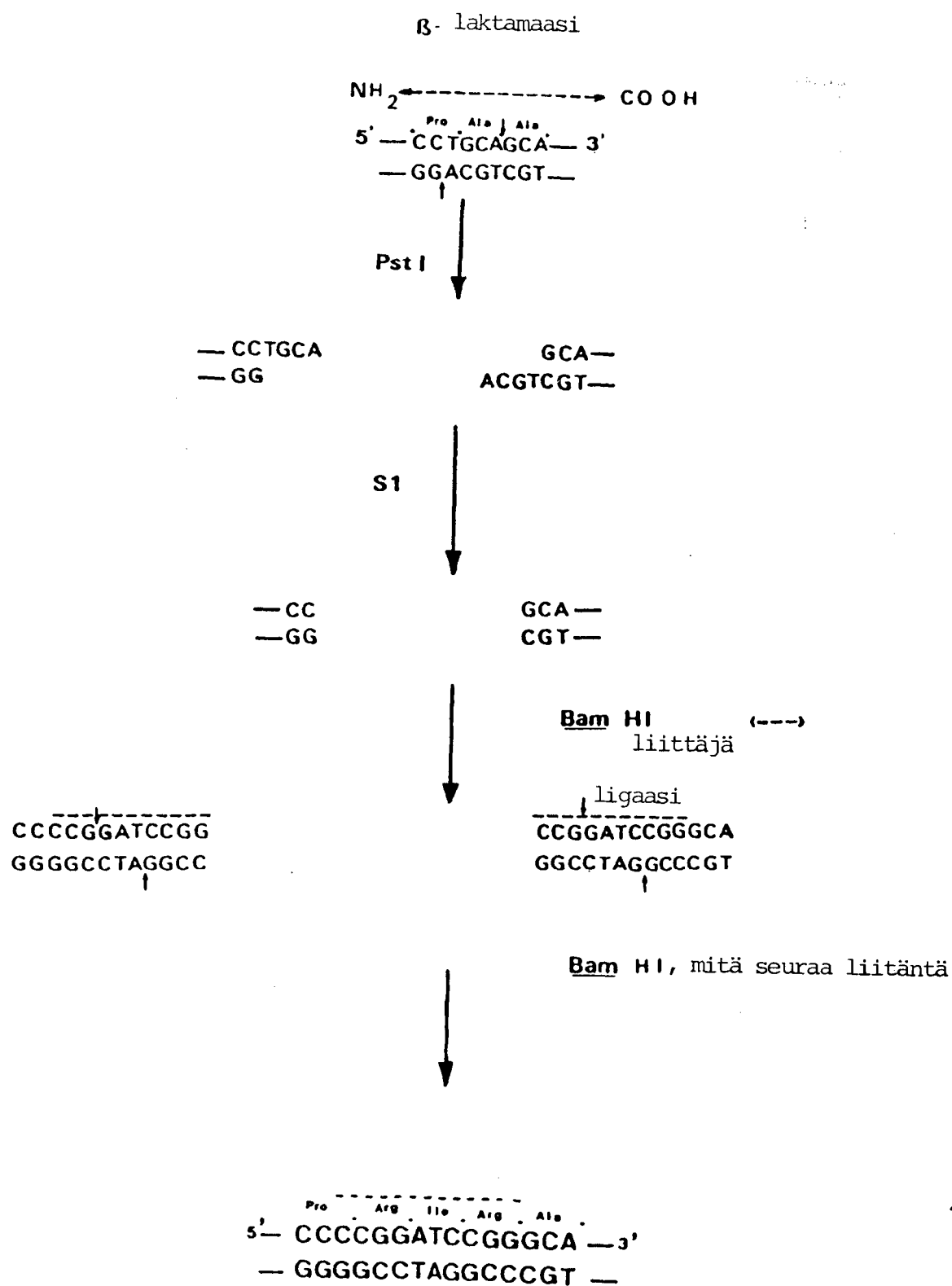
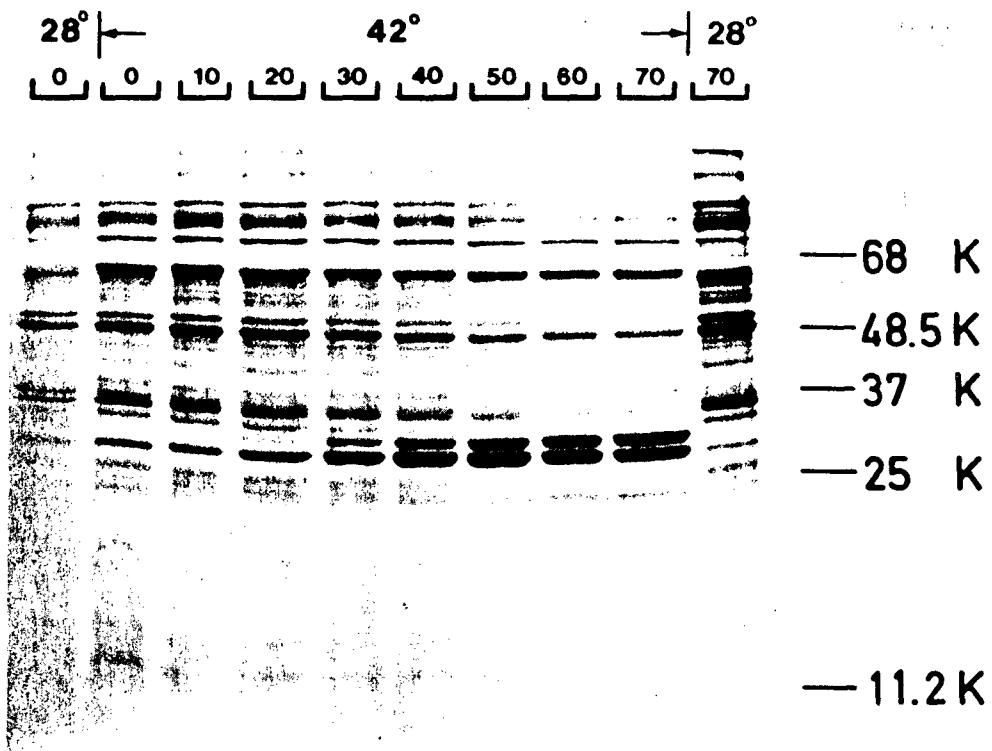
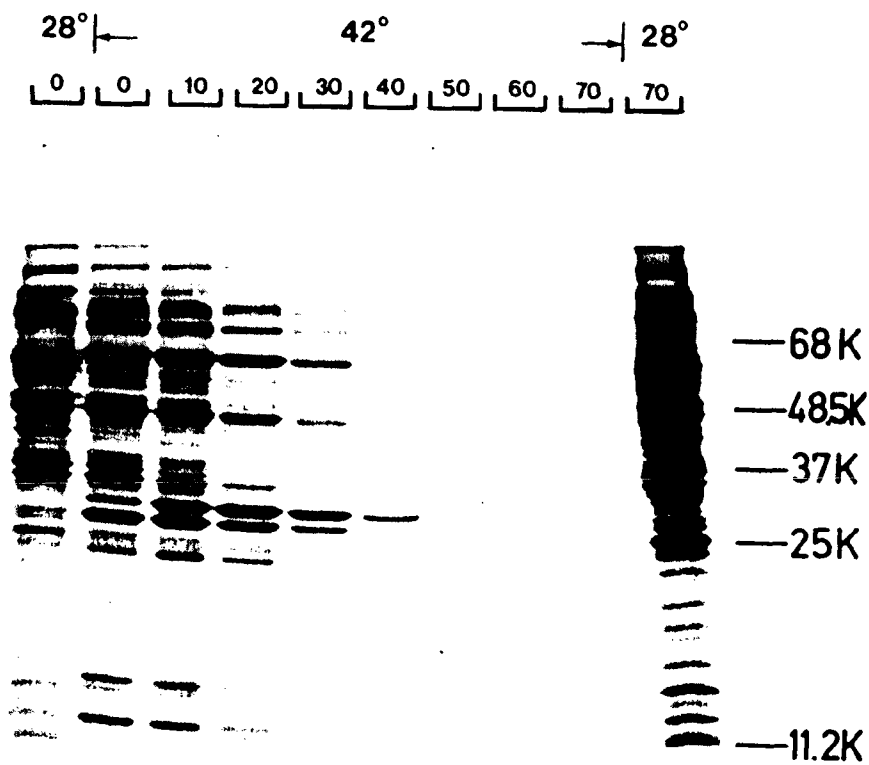


FIG. 7

FIG. 8

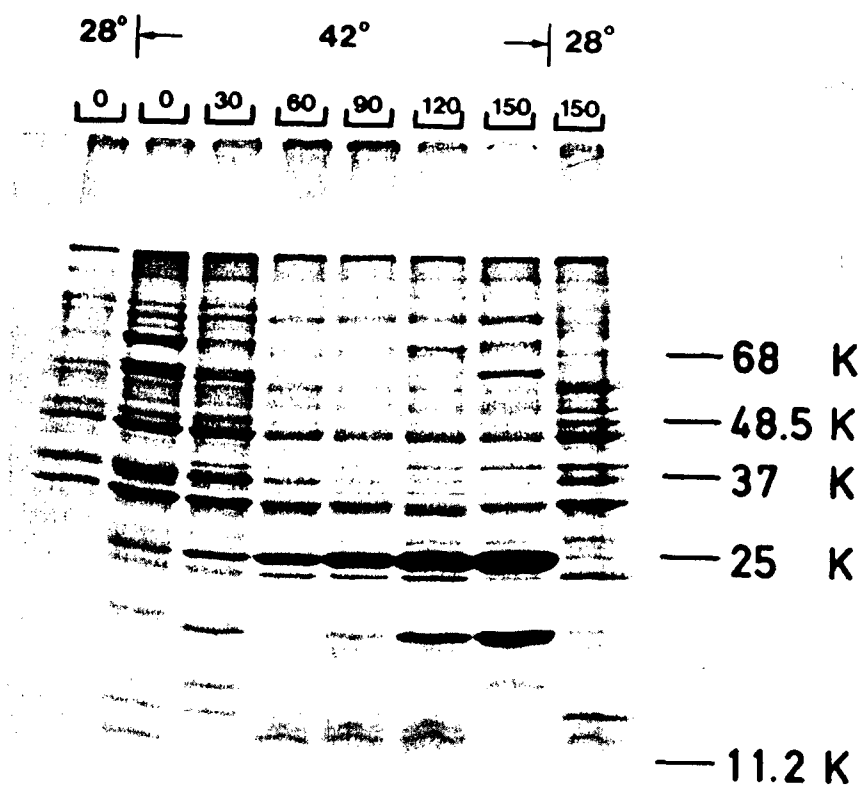


E. coli K12ΔHI (pPLa23)

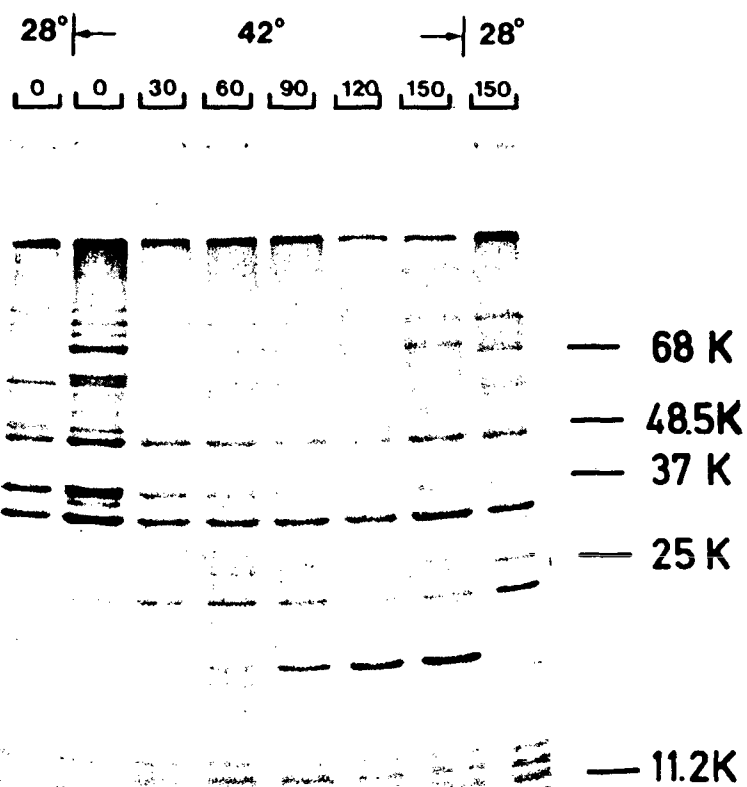


E. coli M5219 (pPLa23)

FIG.9

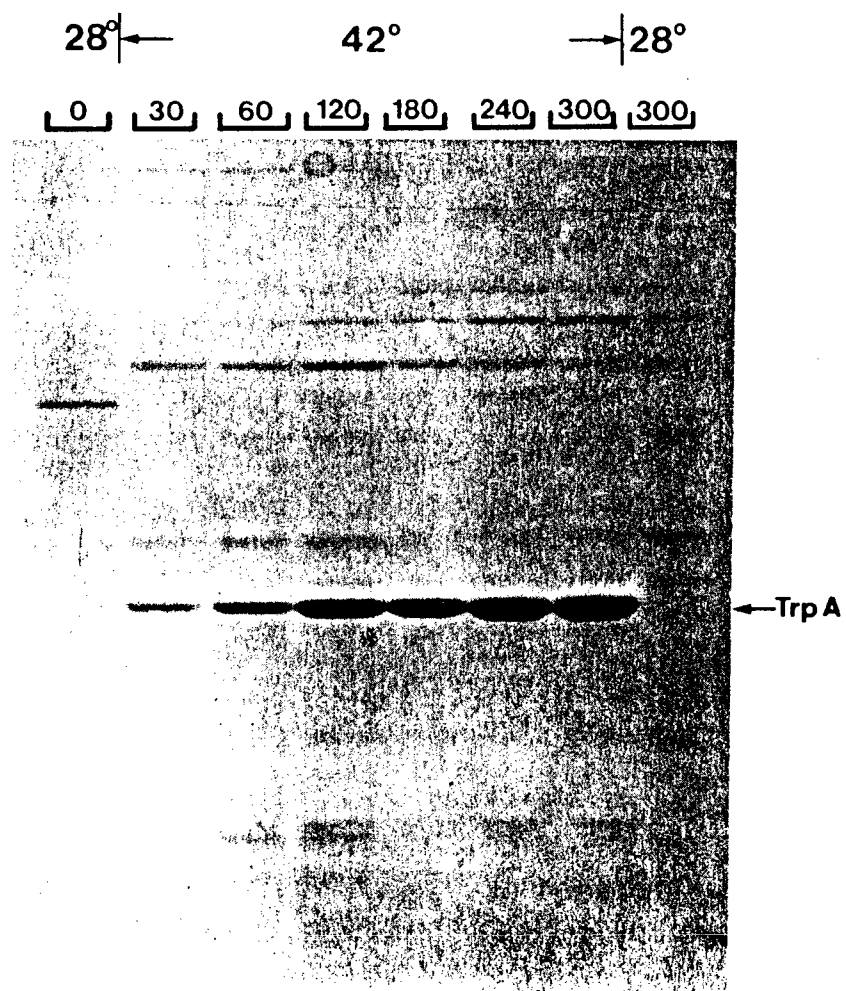


E. coli K12ΔHI (pPLa23trpA₁)



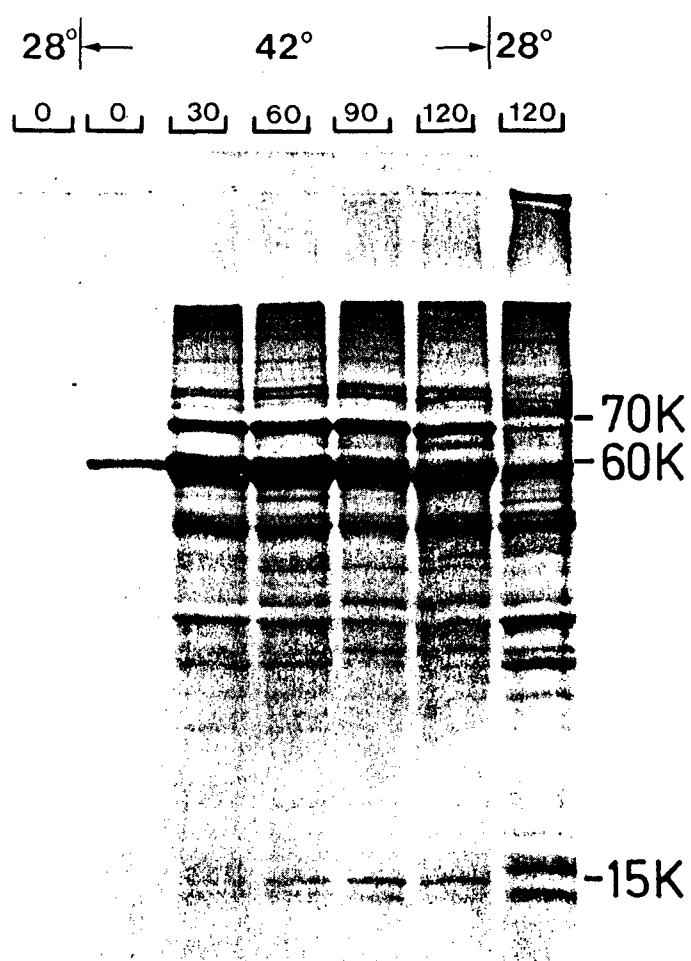
E. coli K12ΔHI (pPLa23trpA₂)

FIG. 10



E.coli K12ΔHI (pPLc23trpA₁)

FIG. 11



E. coli K12ΔHI (pPLa2311R₁)

FIG. 12

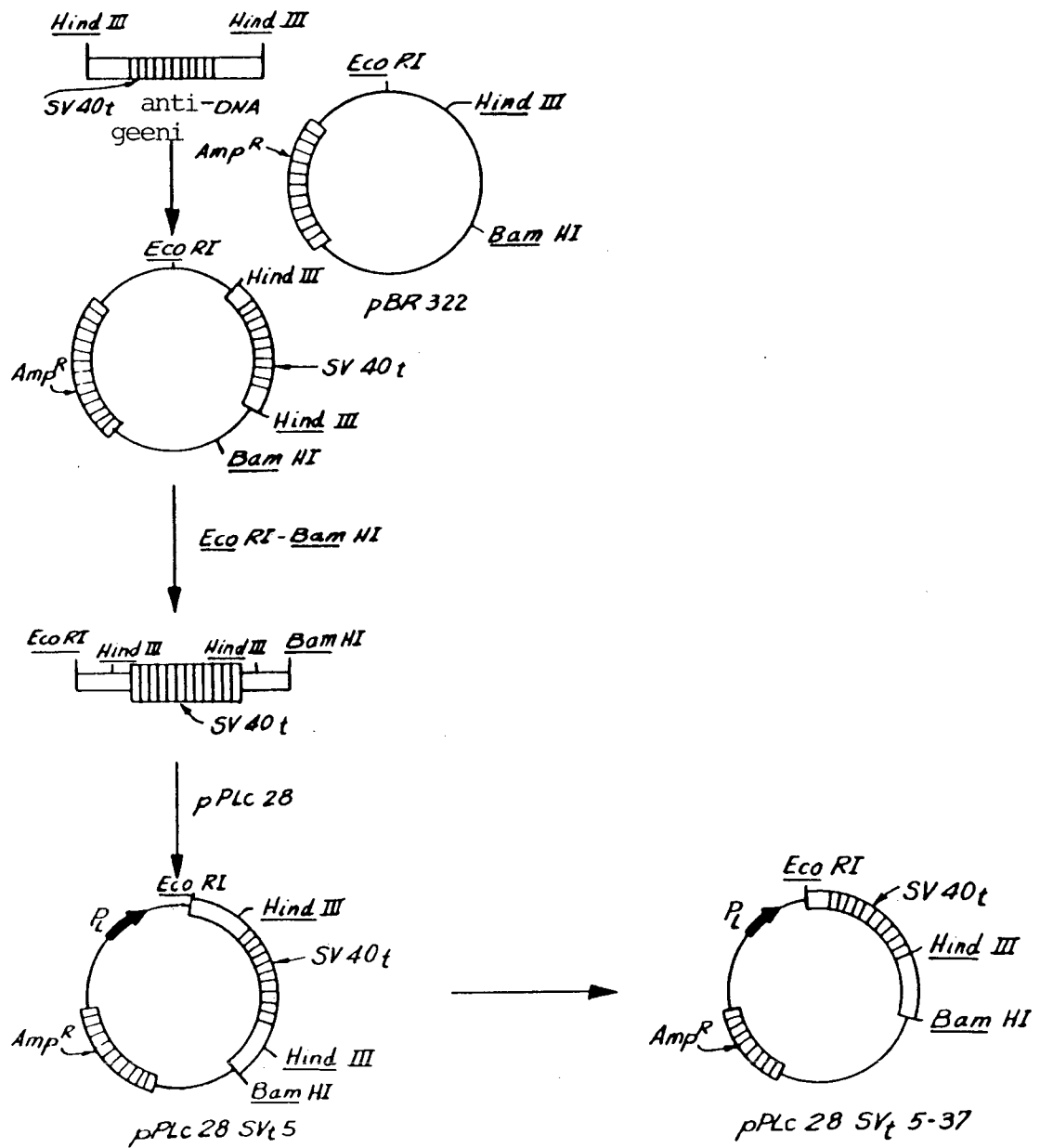
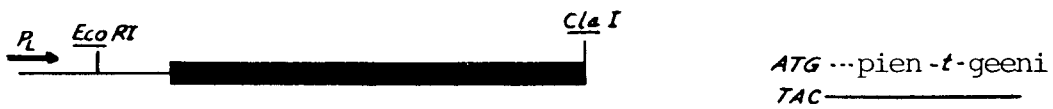


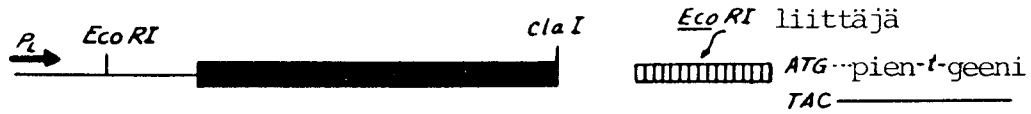
FIG. 13



- (1) *ClaI*
- (2) 3' eksonukleaasi/GTP
- (3) 3' eksonukleaasi/TTP
- (4) 5' nukleaasi



(1) *EcoRI* liittäjä " [] "



- (1) *EcoRI*
- (2) liittäjä

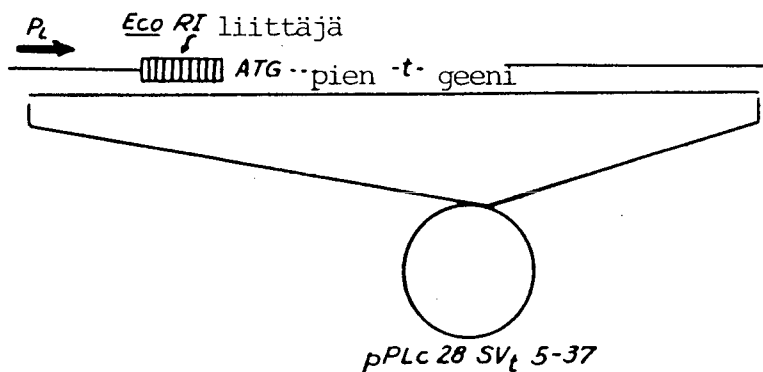
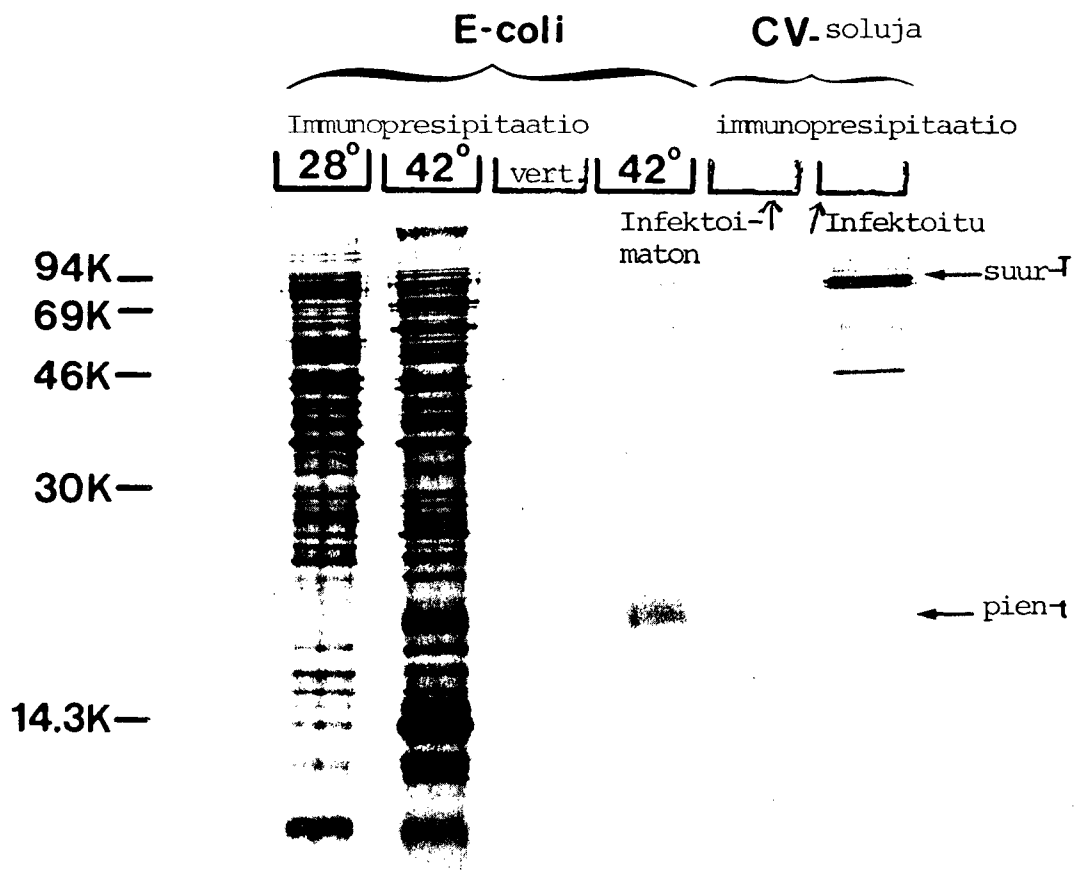


FIG. 14



E.coli K12ΔHI (pPLc28SV_t5-37-9)

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:

Methods in Enzymology vol. 68 (1979) 482-92

22/7-86 Teo Koini

Allekirjoitus