(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 855141 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 855141

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 15/30
C07K 13/00
C12N 1/21
C12P 21/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.12.1985**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.12.1985**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.07.1986**

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

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

31.12.1984 US 687903 15.02.1985 US 702308

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**University of Georgia Research,** Boyd Graduate Studies Research Center Athens, Ga., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Cormier, Milton J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Prasher, Douglas,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Rekombinantti-DNA-vektoreita, jotka kykenevät ilmaisemaan apoaequoriinia.
Rekombinant-DNA-vektorer som förmår uttrycka apoaequorin

Apoaequoriinia ilmentämään kykenevät yhdistelmä-DNA-vektorit

Tämä keksintö kohdistuu yhdistelmä-DNA-tekniikkaan, ja erityisemmin se kohdistuu apoaequoriini-proteiinia koodaavien geenien istuttamiseen yhdistelmä-DNA-vektoreihin, sekä apoaequoriinin tuottamiseen tällaisia vektoreita vastaanottavissa mikro-organismikannoissa.

Apoaequoriini on yhdestä polypeptidiketjusta muodostuva proteiini, jota voidaan eristää fosforoivasta meduusasta Aequorea victoria. Kun tämä proteiini sisältää yhden molekyylin coelenterata-suvusta peräisin olevaa lusiferiinia, joka on sitoutunut siihen muutoin kuin kovalenttisesti, niin tällöin tämä proteiini tunnetaan aequoriinina. Aequoriini hapettuu kalsiumionien läsnäollessa, jolloin muodostuu näkyvää valoa. Valon tuottamisen jälkeen käytetty proteiini (apoaequoriini) voidaan puhdistaa hapettuneesta lusiferiinista, jonka jälkeen se voidaan "ladata" uudestaan asianmukaisissa olosuhteissa luonnollista tai synteettistä lusiferiinia käyttäen. Kalsiumionien lisääminen uudestaan ladattuun aequoriiniin johtaa jälleen valon muodostumiseen. Täten apoaequoriinia voidaan käyttää merkitsimenä monissa kemiallisissa ja biokemiallisissa kokeissa.

Luonnollinen apoaequoriini ei ole yksi ainoa yhdiste, vaan erilaisten molekyylilajien seos. Kun puhdasta luonnollista aequoriinia, jota on saatu useasta tuhannesta Aequorea-yksilöstä, käsitellään elektroforeettisesti /O. Gabriel, Methods Enzymol. 22, 565-578, (1971)/ alkalisissa puskureissa, ei-denaturoivissa olosuhteissa, kaikkien puskureiden sisältäessä 0,1 mM EDTA, niin geelille saadaan vähintään kuusi sinistä luminesenssivyöhykettä, kun tämä geeli (0,5 cm x 10 cm) upotetaan 0,1 M $CaCl_2$-liuokseen. Tämä havainto on yhtäpitävä julkaisussa /J.R. Blinks and G.C. Harres, Fed. Proc., 34, 474 (1975)/ esitetyn havainnon kanssa, jonka havainnon mukaan jopa 12 luminesenssivyöhykettä muodostui samankaltaisen uutteen isoelektrisen fokusoinnin jälkeen. Blinks ja Harres saivat esiin useampia molekyylilajeja, sillä isoelektrisen

fokusoinnin erottamiskyky on parempi kuin elektroforeesin. Kuitenkaan ainuttakaan näistä vyöhykkeistä ei eristetty puhtaaksi peptidiksi.

Lisäksi biolumineseenssikokeissa tarvittavien aequoriini- tai apoaequoriinimäärien tuottaminen meduusasta tai muista luonnollisista lähteistä on vaikeaa. Näin ollen olemassa on huomattava tarve saada aikaan menetelmä apoaequoriinin riittävän suurten määrien tuottamiseksi, jotta sen kaupallinen hyödyntäminen olisi mahdollista.

Viimeaikoina kehitettyjen tekniikoiden avulla on mahdollista käyttää mikro-organismeja, jotka kasvavat nopeasti ja joiden kasvu on runsasta, kaupallisesti käyttökelpoisten proteiinien ja peptidien syntetoimiseksi, riippumatta näiden proteiinien ja peptidien luonnollisista lähteistä. Näiden tekniikoiden avulla on mahdollista muuntaa sopivaa mikro-organismia geneettisesti siten, että se kykenee syntetoimaan sellaista proteiinia tai peptidiä, jotka tavallisesti syntyvät muussa organismissa. Näissä tekniikoissa hyödynnetään sitä perustavaa laatua olevaa suhdetta, joka kaikissa elävissä organismeissa vallitsee organismin geneettisen materiaalin, tavallisesti DNA:n, ja tämän organismin syntetoimien proteiinien välillä. Tämä suhde on sellainen, että proteiinin aminohappojäännösten järjestys riippuu nukleotidien järjestyksestä DNA-ketjussa. DNA-ketjussa on yksi tai useampia, kolmen nukleotidin muodostamaa ryhmää, jotka vastaavat kutakin niitä 20, proteiineissa kaikkein tavallisimmin esiintyvää aminohappoa. Kunkin tietyn, kolmesta nukleotidistä muodostuvan ketjun ja sitä vastaavan aminohapon välinen spesifinen suhde muodostaa geneettisen koodin. Tämän geneettisen koodin uskotaan olevan sama tai samanlainen kaikissa elävissä organismeissa. Tämän seurauksena aminohappojäännösten järjestys jokaisessa proteiinissa tai peptidissä muodostuu vastaavan nukleotidiketjun perusteella, hyvin tunnetun mekanismin mukaisesti. Lisäksi mikä tahansa elävä organismi kykenee periaatteessa tulkitsemaan tämän nukleotidien järjestyksen.

Taulukko I

Geneettinen koodi

Fenyylialaniini (Phe)	TTK	Histidiini (His)	CAK
Leusiini (Leu)	XTY	Glutamiini (Gln)	CAJ
Isoleusiini (Ile)	ATM	Asparagiini (Asn)	AAK
Metioniini (Met)	ATG	Lysiini (Lys)	AAJ
Valiini (Val)	GTL	Asparatiinihappo (Asp)	GAK
Seriini (Ser)	QRS	Glutaamihappo (Glu)	GAJ
Proliini (Pro)	CCL	Kysteiini (Cys)	TGK
Treoniini (Thr)	ACL	Tryptofaani (Tty)	TGG
Alaniini (Ala)	GCL	Argiiniini (Arg)	WGZ
Tyrosiini (Tyr)	TAK	Glysiini (Gly)	GGL
Päättämissignaali	TAJ		
Päättämissignaali	TGA		

Huom. Kukin 3-kirjaiminen tripletti tarkoittaa trinukleotidiä DNA:ssa, jonka 5'-pää on vasemmalla ja 3'-pää oikealla. Kirjaimet tarkoittavat nukleotidiketjun muodostavia puriini- tai pyrimidiiniemäksiä.

A = adeniini
G = guaniini
C = sytosiini
J = A tai G
K = T tai C
L = A,T, C tai G
M = A, C tai T
T = tymiini
X = T tai C mikäli Y on A tai G
X = C, mikäli Y on C tai T
Y = A, G, C tai T mikäli X on C
Y = A tai G mikäli X on T
W = C tai A mikäli Z on C tai T
W = C mikäli Z on C tai T
Z = A, G, C tai T mikäli W on G
Z = A tai G mikäli W on A
QR = TC, mikäli S on A, G, C tai T
QR = A, G mikäli S on T tai C
S = A, G, C tai T mikäli QR on TC
S = T tai C mikäli QR on AG.

Taulukon 1 trinukleotidit, eli kodonit, on esitetty DNA-ketjun trinukleotideinä, jollaisina ne myös esiintyvät elävän organismin geneettisessä materiaalissa. Näiden kodonien ilmentäminen proteiinisynteesissä edellyttää välittävän lähetti-RNA:n (mRNA) muodostamista, kuten jäljempänä yksityiskohtaisemmin esitetään. mRNA-kodoneilla on sama nukleotidiketju kuin taulukossa 1 esitetyillä DNA-kodoneilla, paitsi että tymiinin paikalla on urasiili. Toisiaan täydentävät, trinukleotideista muodostuvat DNA-ketjut, joiden juosteiden polaarisuus on vastakkainen, vastaavat toiminnallisesti täysin taulukossa 1 esitettyjä kodoneita, kuten alalla tiedetään. Geneettisen koodin tärkeä ja hyvin tunnettu piirre on sen sisältämän informaation runsaus (redundanssi), jolloin proteiinin muodostamiseen käytettävien useampien aminohappojen tapauksessa voidaan käyttää useampaa kuin yhtä koodaavaa nukleotiditriplettiä. Näin ollen lukuisat erilaiset nukleotidiketjut voivat koodata jotakin tiettyä aminohappoketjua. Tällaisia nukleotidiketjuja pidetään toiminnallisesti toistensa vastineina, koska ne saattavat johtaa saman aminohappoketjun muodostumiseen kaikissa organismeissa, vaikka eräät kannat saattavatkin ilmentää eräitä ketjuja tehokkaammin kuin joitakin muita ketjuja. Tietystä nukleotidiketjusta saatetaan mahdollisesti löytää puriinin tai pyrimidiinin metyloitu vastine. Tällainen metyloituminen ei vaikuta millään tavalla koodaussuhteeseen.

Menetelmä jonkin mikro-organismin muuttamiseksi siten, että se kykenee syntetoimaan uuden proteiinin, käsittää periaatteessa kolme yleistä vaihetta: (1) toivotun proteiinin aminohappoketjua vastaavan,geneettisesti koodatun informaation sisältävän spesifisen geenin tai nukleotidiketjun eristämisen ja puhdistamisen (tai kemiallisen synteesin); (2) tämän eristetyn nukleotidiketjun yhdistämisen sopivaan vektoriin, joka tavallisesti on bakteriofaagi, tai plasmidi-DNA:ta; sekä (3) tämän vektorin siirtämisen asianmukaiseen mikro-organismiin, ja tästä vastaanottaneesta mikro-organismista toivotun geneettisen informaation sisältävän kannan valikoimisen.

Edellä kuvatun prosessin kaupallisissa hyödyntämispyrkimyksissä esiintyvä huomattavin vaikeus liittyy prosessin ensimmäiseen vaiheeseen, eli toivotun spesifisen geneettisen informaation eristämiseen ja puhdistamiseen. DNA on läsnä kaikissa elävissä soluissa molekyylipainoltaan erittäin suurten nukleotidiketjujen muodossa. Solu voi sisältää yli 10 000 rakenteellista geeniä, jotka koodaavat yli 10 000 spesifisen proteiinin aminohappojäännösten ketjuja, ja kukin geeni on useiden satojen nukleotidien pituinen. Useimmissa tapauksissa neljä erilaista nukleotidiemästä muodostaa kaikki olemassa olevat nukleotidiketjut. Nämä ovat adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tymiini (T). Tiettyjen proteiinien rakenteelliset geenit sisältävät pitkät nukleotidiketjut ovat näin ollen hyvin samankaltaisia toisiinsa verrattuna yleisen kemiallisen koostumuksensa ja fysikaalisten ominaisuuksiensa suhteen. Yhden tällaisen nukleotidiketjun erottamista eristetyssä DNA:ssa läsnäolevien muiden ketjujen seoksesta ei tavallisesti voida toteuttaa perinteisillä fysikaalisilla ja kemiallisilla preparatiivisilla menetelmillä.

Alalla on aikaisemmin käytetty kahta yleismenetelmää edellä kuvatun yleismenetelmän ensimmäisen vaiheen toteuttamiseksi. Ensimmäistä menetelmää kutsutaan joskus "haulikkomenetelmäksi". Organismin DNA pilkotaan kappaleiksi, jotka ovat tavallisesti toivottua nukleotidiketjua pidempiä. Näin ollen edellä kuvatun prosessin vaihe (1) olennaisesti ohitetaan. Nämä DNA-kappaleet yhdistetään välittömästi toivotun vektorin kanssa, spesifisiä ketjuja tätä ennen puhdistamatta. Valinnaisesti tässä vaiheessa voidaan käyttää karkeata fraktiointia. Toivotun geneettisen informaation sisältävän mikro-organismikannan valikoinnissa, kaikista mahdollisuuksista, turvaudutaan mikrobigenetiikassa tunnettuihin valikointitekniikoihin. Tällä "haulikkotekniikalla" on kaksi pääasiallista haittaa. Edelleen vakavampaa on, että tämä menetelmä saattaa johtaa satojen tuntemattomien geenien siirtymiseen vastaanottaviin mikro-organismeihin, jolloin kokeen aikana muodostuu uusia kantoja, joiden geneettiset ominaisuudet ovat tuntemattomat. Näin ollen tällaisen menetelmän käyttäminen saattaa olla vaarana laboratorion henkilökunnalle sekä ympäristölle. Tämän "haulikkomenetelmän" toisena haittana on se, että toivotun

kannan tuottaminen on erittäin tehotonta, ja se riippuu erotuskyvyltään riittävän tehokkaan valikointitekniikan käytöstä, millä kompensoidaan fraktioinnin puuttuminen ensimmäisestä vaiheesta. Kuitenkin olemassa on menetelmiä, joilla nämä haitat voidaan välttää, mikä ilmenee tämän hakemuksen myöhemmistä kappaleista.

Toisessa yleisessä menetelmässä käytetään hyväksi sitä tosiseikkaa, että solun sisältämä koko geneettinen informaatio ilmenee erittäin harvoin, mikäli lainkaan, tietyllä ajanhetkellä. Erityisesti korkeampien organismien erikoistuneet kudokset voivat syntetoida ainoastaan pienen osan niistä proteiineista, jotka organismi kykenee tuottamaan jollakin tietyllä hetkellä. Äärimmäisissä tapauksissa tällaiset solut saattavat syntetoida pääasiallisesti yhtä proteiinia. Tällaisissa ääritapauksissa kyseistä proteiinia koodaava nukleotidiketju on voitu eristää eristämällä vastaava lähetti-RNA näistä asianmukaisista soluista.

Lähetti-RNA toimii siinä prosessissa, jossa DNA:n nukleotidiketjujen sisältämä informaatio muunnetaan proteiinin aminohappoketjuista muodostuvaksi rakenteeksi. Tämän prosessin ensimmäisessä vaiheessa, jota kutsutaan kopiointivaiheeksi, DNA:n, jonka sisältämä nukleotidiketju spesifioi valmistettavan proteiinin, paikallinen osa kopioituu RNA-molekyyliksi. RNA on polynukleotidi, joka on samankaltaista kuin DNA, paitsi että deoksiriboosi on korvautunut riboosilla, ja että urasiili korvaa tymiinin. RNA:n käsittämät nukleotidiemäkset kykenevät muodostamaan samankaltaisia emäspareja, joiden tiedetään esiintyvän DNA-molekyylissä toisiaan täydentävien säikeiden välillä. A ja U (T) ovat toisiaan täydentäviä ja G ja C ovat toisiaan täydentäviä. DNA:n nukleotidiketjun RNA-kopio on kopioitua ketjua täydentävä. Tällaista RNA-molekyyliä kutsutaan lähetti-RNA:ksi (mRNA), koska se toimii välittäjänä solun geneettisen välineistön ja sen proteiineja syntetoivan välineistön välillä. Yleisesti ottaen, tietyllä hetkellä ainoat solussa läsnäolevat mRNA-ketjut ovat niitä ketjuja, jotka vastaavat sillä hetkellä syntetoitavia proteiineja. Näin ollen, erikoistunut solu, jonka toiminta kohdistuu pääasiassa yhden proteiinin syntetoimiseen, sisältää etupäässä tätä proteiinia vastaavia

RNA-molekyylejä. Tiettyä proteiinia koodaavan, asianmukaisen nukleotidiketjun eristäminen ja puhdistaminen voidaan toteuttaa niissä tapauksissa, missä se on kannattavaa, käyttämällä hyväksi tällaisen proteiinin erityistä syntetoimista erikoistuneissa soluissa.

Tämän menetelmän pääasiallisena haittana on se, että sitä voidaan soveltaa ainoastaan niissä suhteellisen harvinaisissa tapauksissa, joissa solut ovat erikoistuneet tuottamaan etupäässä yhtä ainoata proteiinia. Suurin osa kaupallisesti mielenkiintoisista proteiineista ei syntetoidu näin erikoistuneella tavalla. Toivottu proteiini voi olla yksi esimerkiksi sadoista sellaisista erilaisista proteiineista, joita kudoksen tai organismin solut tuottavat tietyllä hetkellä. Kaikesta huolimatta mRNA-molekyyliä hyväksi käyttävä eristämistekniikka on käyttökelpoinen, sillä solussa läsnäolevien RNA-molekyylien joukko edustaa tavallisesti ainoastaan pientä osaa kaikista DNA:n sisältämistä ketjuista, joten tällä menetelmällä voidaan toteuttaa ensimmäinen puhdistaminen.

US-patenttijulkaisussa 4 363 877 esitetään jokin aika sitten kehitetty uudempi menetelmä, jolla nukleotidiketjuja voidaan eristää ja puhdistaa siinäkin tapauksessa, että niiden esiintymistiheys on niinkin alhainen kuin 2 % mRNA-ketjujen heterogeenisessa populaatiossa. Lisäksi tätä menetelmää voidaan käyttää yhdessä tunnettujen mRNA-molekyylien fraktiointimenetelmien kanssa sellaisten ketjujen, joiden esiintymistiheys RNA-molekyylien kokonaispopulaatiossa on peräti alhaisempi kuin alunperin eristettäessä, eristämiseksi ja puhdistamiseksi. Tätä menetelmää voidaan yleisesti ottaen käyttää lähes mistä tahansa organismista eristettyjen mRNA-molekyylien tapauksessa, joten tätä menetelmää voidaan käyttää tehokkaasti kaupallisesti mielenkiintoisten ja tutkimuksessa tarvittavien proteiinien lopullisessa tuotannossa, jossa näitä proteiineja syntyy hyödyllisiä määriä.

Tässä menetelmässä käytetään hyväksi mRNA- ja DNA-molekyylien tiettyjä rakenteellisia ominaisuuksia, ja siinä hyödynnetään tiettyjä, entsyymien katalysoimia reaktioita. Näiden reaktioiden

ja rakenteellisten yksityiskohtien luonne, kuten ne alalla tunnetaan, kuvataan ohessa ja lisäksi yksityiskohtaisemmin mainitussa patenttijulkaisussa. Tässä julkaisussa käytetyt symbolit ja lyhenteet selitetään seuraavassa taulukossa.

Taulukko 2

DNA	- deoksiribonukleiinihappo	A	- adeniini
RNA	- ribonukleiinihappo	T	- tymiini
cDNA	- täydentäjä-DNA (syntetoitu entsymaattisesti mRNA-ketjusta)	G	- guaniini
		C	- sytosiini
mRNA	- lähetti-RNA	U	- urasiili
dATP	- deoksiadenosiinitrifosfaatti	Tris	- 2-amino-2-hydroksimetyyli-1,3-propaanidioli
dGTP	- deoksiguanosiinitrifosfaatti		
dCTP	- deoksisytidiinitrifosfaatti	EDTA	- etyleenidiamiinitetraetikkahappo
TCA	- trikloorietikkahappo		
dTTP	- tymidiinitrifosfaatti	ATP	- adenosiinitrifosfaatti

Luonnossa esiintyvän DNA:n rakenne on muodostunut kahdesta parin muodostavasta lineaarisesta polynukleotidijuosteesta. Näiden kahden, parin muodostavan juosteen välillä vallitsee edellä kuvattu, toisiaan täydentävien emästen parinmuodostamissuhde siten, että yhden juosteen kukin nukleotidiemäs on toisen juosteen täydentävää emästä vastapäätä. Yhden juosteen muodostama koko ketju on toisen juosteen muodostavan täydentävän ketjun peilikuva. Mikäli nämä juosteet erotetaan toisistaan, niin on mahdollista syntetoida uusi parin muodostava juoste alkaen sopivista prekursorimonomeereistä. Järjestys toisesta päästä alkavassa monomeerien lisäyksessä määräytyy alkuperäisen vahingoittumattoman polynukleotidijuosteen ketjun perusteella, ja on tätä ketjua täydentävä, joten tämä alkuperäinen polynukleotidiketju toimii mallina sitä täydentävän parin synteesissä. DNA:n spesifistä nukleotidiketjua vastaavan mRNA-molekyylin synteesin oletetaan noudattavan samaa perusperiaatetta. Näin ollen tietyn mRNA-molekyylin ketju on DNA:n yhtä juostetta täydentävä, ja DNA:n vastakkaisen DNA-juosteen ketjun kanssa identtinen kopioituvassa alueessa. Elävissä soluissa on entsymaattisia mekanismeja, joiden avulla tietyn DNA-osan, joka sisältää tietyn proteiinin nukleotidiketjun,

selektiivinen kopioiminen on mahdollista. Täten tietyn proteiinin aminohappoketjua koodaavan nukleotidiketjun sisältävän mRNA-molekyylin eristäminen vastaa tämän saman ketjun, tai geenin eristämistä itse DNA:sta. Mikäli tämä mRNA kopioidaan uudestaan, jolloin saadaan sitä täydentävä DNA-ketju (cDNA) niin tällöin kyseinen DNA-ketju saadaan täsmällisesti muodostetuksi uudestaan, ja se voidaan asianmukaisilla menetelmillä istuttaa toisen organismin geneettiseen materiaaliin. Nämä kaksi tietyn ketjun toisiaan täydentävää ja vastaavaa versiota voidaan näin ollen muuttaa toinen toisikseen, ja ne ovat toiminnallisesti täysin toistensa kaltaisia.

DNA- ja RNA-molekyylien nukleotidiyksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa fosfodiesterisidoksilla, jotka ovat muodostuneet yhden nukleotidisokerin 5'-aseman ja sen viereisen naapurin 3'-aseman välille. Kun tällainen sidos toistuu, muodostuu lineaarinen polynukleotidi, joka on polaarinen siinä suhteessa, että sen toinen pää voidaan erottaa toisesta päästä. 3'-päässä voi olla vapaa 3'-hydroksyyliryhmä, tai tämä hydroksyyliryhmä voi olla substituoitunut fosfaatilla tai muulla monimutkaisemmalla rakenteella. Sama pätee 5'-päähän. Eukarioottisissa organismeissa, eli organismeissa, joissa on täsmällinen tuma ja mitoottinen välineistö, toiminnallisen mRNA-molekyylin synteesiin liittyy tavallisesti polyadenyylihapon kytkeytyminen mRNA-molekyylin 3'-päähän. Näin ollen lähetti-RNA voidaan erottaa muista, eukarioottisesta organismista eristetyistä RNA-lajeista kolonnikromatografisesti selluloosalla, johon on kiinnitetty polytymidyylihappoa. Katso julkaisu Aviv, H. ja Leder, P., Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 1408 (1972). Sopivia ovat samoin muut kromatografiset menetelmät, joissa käytetään hyväksi poly A-yhdisteen emäksiin kohdistuvaa parinmuodostamisaffiniteettia, joka kohdistuu kromatografisiin pakkausmateriaaleihin, jotka pakkausmateriaalit sisältävät yhdisteitä oligo-dT, poly-U tai poly-T:n ja poly-U:n yhdistelmiä, esimerkiksi poly-U-Sepharose-geeliä.

Käänteiskopioija-entsyymi katalysoi mallina toimivaa RNA-juostetta täydentävän DNA-molekyylin synteesiä tällaisen RNA-mallin

länsäollessa, jolloin primeerinä voi olla mikä tahansa täydentävä oligo- tai polynukleotidi, jossa on 3'-hydroksyyli sekä neljä deoksinukleosiditrifosfaattia dATP, dGTP, dCTP ja dTTP. Tämä reaktio käynnistyy siten, että oligodeoksinukleotidin muodostama primeeri liittyy muuten kuin kovalenttisesti mRNA-molekyylin 3'-pään läheisyyteen, jonka jälkeen asianmukaiset, mRNA-nukleotidiketjussa olevien emästen määrittämät deoksinukleotidit liittyvät toinen toisensa jälkeen kasvavan ketjun 3'-päähän. Muodostuvan molekyylin voidaan kuvata muodostavan hiusneulan kaltaisen rakenteen, jossa alkuperäinen RNA muodostaa vetysidosten avulla parin täydentävän DNA-juosteen kanssa, joka juoste on toisesta päästään taittunut osittain itsensä suhteen taaksepäin. Nämä RNA- ja DNA-juosteet eivät ole liittyneet toisiinsa kovalenttisesti. Käänteiskopioija kykenee myöskin katalysoimaan samankaltaisen reaktion yksijuosteista DNA-mallia käytettäessä, jossa tapauksessa tuloksena saadaan kaksijuosteinen, rakenteeltaan hiusneulamainen DNA, jossa on yksijuosteiset DNA-ketjut toisiinsa liittävistä päistä muodostuva silmukka. Katso julkaisut Aviv H. ja Leder, P., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 1408 (1972) sekä Efstradiadis, A., Kafatos, F.C., Maxam, A.M. ja Maniatis, T., Cell, 7, 279 (1976).

Restriktioendonukleaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät hydrolysoimaan DNA-molekyylin fosfodiesterisidoksia, jolloin jatkuva DNA-juoste katkeaa. Mikäli DNA on suljetun silmukan muodossa, tämä silmukka muuttuu lineaariseksi rakenteeksi. Restriktioentsyymin tärkeimpänä piirteenä on se, että sen hydrolyyttinen vaikutus kohdistuu ainoastaan sellaiseen kohtaan, jossa esiintyy tietty nukleotidien ketju. Tätä ketjua kutsutaan tämän restriktioendonukleaasin restriktiokohdaksi. Restriktioendonukleaaseja on eristetty useista eri lähteistä ja niiden tunnusomaiset piirteet on selvitetty, ajatellen niiden restriktiokohdassa esiintyvää nukleotidiketjua. Vaikuttaessaan kaksijuosteiseen DNA-ketjuun jotkut restriktioendonukleaasit hydrolysoivat fosfodiesterisidoksia molempien juosteiden samassa kohdassa, jolloin muodostuu epäaktiivisia päitä. Toiset katalysoivat toisistaan muutaman nukleotidin päässä olevien sidosten hydrolyysiä, jol-

loin pilkotun molekyylin kumpaankin päähän muodostuu yksijuosteisia alueita. Tällaiset yksijuosteiset päät täydentävät itse itsensä, eli ne ovat tarttuvia päitä, ja niitä voidaan käyttää hydrolysoituneen DNA-ketjun kokonaiseksi saattamiseen. Koska jokaisen DNA-molekyylin, johon tällaisen entsyymin pilkkomisvaikutus kohdistuu, täytyy sisältää sama tunnistamiskohta, niin pilkkomisessa muodostuu myös samanlaisia tarttuvia päitä, joten restriktioendonukleaasilla käsiteltyjä heterogeenisia DNA-ketjuja voidaan liittää muihin samalla tavalla käsiteltyihin ketjuihin. Katso julkaisu Roberts, R.J., Crit. Rev. Biochem., 4, 123 (1976).

On havaittu, että tietyn entsyymin restriktiokohdat ovat suhteellisen harvinaisia, ja ne ovat jakautuneet epätasaisesti. Tietyn restriktiokohdan olemassaolo tietyssä kappaleessa on selvitettävä kokeellisesti. Lukuisista eri lähteistä eristettyjen restriktioendonukleaasien, joiden tunnistamiskohdan spesifisyys vaihtelee, lukumäärä on suuri ja kasvaa koko ajan, joten se todennäköisyys, että tietty tuhat nukleotidiä käsittävä kappale sisältää yhden tai useamman restriktiokohdan, on kohtuullisen suuri.

Yleisselvitystä asiasta on löydettävissä julkaisuista Watson, J.D., The Molecular Biology of the Gene, 3, laitos, Benjamin, Menlo Park, Calif., (1976); Davidson, J.N., The Biochemistry of the Nucleic Acids, 8. laitos., uudistus: Adams, R.L.P., Burdon, R.H., Campbell, A.M. ja Smellie, R.M.S., Academic Press, New York, (1976); sekä Hayes, W., The Genetics of Bacteria and Their Viruses, Studies in Basic Genetics and Molecular Biology, 2. laitos, Blackwell Scientific Pub., Oxford (1968).

Näin ollen tämän keksinnön tavoitteena on saada aikaan mikro-organismi, jonka avulla voidaan tuottaa käyttökelpoisia määriä apoaequoriinia.

Lisäksi tämän keksinnön tavoitteena on saada aikaan yhdistelmä-DNA-vektori, joka voidaan istuttaa mikro-organismiin, ja joka ilmentää apoaequoriinia.

Edelleen tämän keksinnön tavoitteena on saada aikaan rakenteeltaan tietynlainen DNA-kappale, joka voidaan valmistaa synteettisesti tai joka voidaan eristää luonnollisista lähteistä, ja jota voidaan käyttää tällaisten toivottujen yhdistelmä-DNA-vektoreiden valmistamiseksi.

Edelleen tämän keksinnön tavoitteena on saada aikaan peptidi, jota voidaan tuottaa synteettisesti laboratoriossa tai mikroorganismin avulla, ja joka jäljittelee luonnollisen apoaequoriinin aktiivisuutta.

Tämän keksinnön nämä ja myös muut tavoitteet, jotka ilmenevät tästä julkaisusta, on saavutettu sellaisella homogeenisella peptidillä, joka valitaan (1) yhdisteistä,
(a) joilla on ensimmäinen kaava

V K L T P D F N N P K W I G R H K H M F N F L D V
N H N G K I S L D E M V Y K A S D I V I N N L G A
T P E Q A K R H K D A V E A F F G G A G M K Y G V
E T D W P A Y I E G W K K L A T D E L E K Y A K N
Q I T L I R I W G D A L F D I I D K D Q N G A I T
L S E W K A Y T K S A G I I Q T S E E C E E T F R
V C D I D E S G Q L D V D E M T R Q H L G F W Y T
M D P A C E K L Y G G A V P-COOH

missä A on alaniini, C on kysteiini, D on aspartaatti, E on glutamaatti, F on fenyylialaniini, G on glysiini, H on histidiini, I on isoleusiini, K on lysiini, L on leusiini, M on metioniini, N on asparagiini, P on proliini, Q on glutamiini, R on arginiini, S on seriini, T on reoniini, V on valiini, W on tryptofaani ja Y on tyrosiini;

(b) joilla on toinen kaava, missä P_5 on korvautunut aminohapolla S, N_8 on korvautunut aminohapolla D, K_{11} on korvautunut aminohapolla R, D_{78} on korvautunut aminohapolla E, A_{81} on korvautunut aminohapolla E, K_{88} on korvautunut aminohapolla R, D_{92} on korvautunut aminohapolla C tai E, K_{96} on korvautunut aminohapolla R, A_{98} on korvautunut aminohapolla S, Q_{101} on korvautunut amino-

hapolla E, I_{102} on korvautunut aminohapolla P, I_{107} on korvautunut aminohapolla L, I_{116} on korvautunut aminohapolla V, S_{127} on korvautunut aminohapolla D, S_{135} on korvautunut aminohapolla A, T_{141} on korvautunut aminohapolla S, tai E_{144} on korvautunut aminohapolla D mainitussa ensimmäisessä kaavassa, missä alaindeksit tarkoittavat aminohapon asemaa mainitun ensimmäisen kaavan aminopäästä lukien;

(c) joilla on kolmas kaava, jossa mainitun ensimmäisen kaavan tai mainitun toisen kaavan joko aminopäästä, karboksipäästä tai kummastakin päästä puuttuu 1-15 aminohappojäännöstä;

(d) neljäs kaava, jossa mainitun ensimmäisen kaavan tai mainitun toisen kaavan aminopäähän, karboksipäähän tai molempiin päihin on liittynyt peräkkäin 1-10 muuta aminohappojäännöstä; sekä

(2) mainittujen kaavojen mukaisten yhdisteiden suoloista, jolloin mainittu peptidi kykenee sitoutumaan coelenterate-lusiferiiniin, ja se kykenee emittoimaan valoa Ca^{2+}-ionien läsnäollessa.

Tässä keksinnössä saadaan myöskin aikaan sellaisia DNA-molekyylejä, yhdistelmä-DNA-vektoreita ja muunnettuja mikro-organismeja, jotka käsittävät nukleotidiketjun

GTL_1 AAJ_2 XTY_3 ACL_4 /$\overline{C}$CL tai QR$\underline{S}$/$_5$ GAK_6 TTK_7
/$\overline{A}$AK tai GA$\underline{K}$/$_8$ AAK_9 CCL_{10} /$\overline{A}$AJ tai WG$\underline{Z}$/$_{11}$ TGG_{12} ATM_{13}
GGL_{14} WGZ_{15} CAK_{16} AAJ_{17} CAK_{18} ATG_{19} TTK_{20} AAK_{21} TTK_{22}
XTY_{23} GAK_{24} GTL_{25} AAK_{26} CAK_{27} AAK_{28} GGL_{29} AAJ_{30} ATM_{31}
QRS_{32} XTY_{33} GAK_{34} GAJ_{35} ATG_{36} GTL_{37} TAK_{38} AAJ_{39} GCL_{40}
QRS_{41} GAK_{42} ATM_{43} GTL_{44} ATM_{45} AAK_{46} AAK_{47} XTY_{48} GGL_{49}
GCL_{50} ACL_{51} CCL_{52} GAJ_{53} CAJ_{54} GCL_{55} AAJ_{56} WGZ_{57} CAK_{58}
AAJ_{59} GAK_{60} GCL_{61} GTL_{62} GAJ_{63} GCL_{64} TTK_{65} TTK_{66} GGL_{67}
GGL_{68} GCL_{69} GGL_{70} ATG_{71} AAJ_{72} TAK_{73} GGL_{74} GTL_{75} GAJ_{76}

/ĀGAK tai GAJ/$_{78}$ TGG$_{79}$ CCL$_{80}$ /ĀGCL tai GAJ/$_{81}$ TAK$_{82}$ ATM$_{83}$ GAJ$_{84}$ GGL$_{85}$ TGG$_{86}$ AAJ$_{87}$ /ĀAJ tai WGZ/$_{88}$ XTY$_{89}$ GCL$_{90}$ ACL$_{91}$ /ĀGAK, GAJ tai TGK/$_{92}$ GAJ$_{93}$ XTY$_{94}$ GAJ$_{95}$ /ĀAJ tai WGZ/$_{96}$ TAK$_{97}$ /ĀGCL tai QRS/$_{98}$ AAJ$_{99}$ AAK$_{100}$ /ĀCAJ tai GAJ/$_{101}$ /ĀTM tai CCL/$_{102}$ ACL$_{103}$ XTY$_{104}$ ATM$_{105}$ WGZ$_{106}$ /ĀTM tai XTY/$_{107}$ TGG$_{108}$ GGL$_{109}$ GAK$_{110}$ GCL$_{111}$ XTY$_{112}$ TTK$_{113}$ GAK$_{114}$ ATM$_{115}$ /ĀTM tai GTL/$_{116}$ GAK$_{117}$ AAJ$_{118}$ GAK$_{119}$ CAJ$_{120}$ AAK$_{121}$ GGL$_{122}$ GCL$_{123}$ ATM$_{124}$ ACL$_{125}$ XTY$_{126}$ /ĀQRS tai GAK/$_{127}$ GAJ$_{128}$ TGG$_{129}$ AAJ$_{130}$ GCL$_{131}$ TAK$_{132}$ ACL$_{133}$ AAJ$_{134}$ /ĀQRS tai GCL/$_{135}$ GCL$_{136}$ GGL$_{137}$ ATM$_{138}$ ATM$_{139}$ CAJ$_{140}$ /ĀCL tai QRS/$_{141}$ QRS$_{142}$ GAJ$_{143}$ /ĀGAJ tai GAK/$_{144}$ TGK$_{145}$ GAJ$_{146}$ GAJ$_{147}$ ACL$_{148}$ TTK$_{149}$ WGZ$_{150}$ GTL$_{151}$ TGK$_{152}$ GAK$_{153}$ ATM$_{154}$ GAK$_{155}$ GAJ$_{156}$ QRS$_{157}$ GGL$_{158}$ CAJ$_{159}$ XTY$_{160}$ GAK$_{161}$ GTL$_{162}$ GAK$_{163}$ GAJ$_{164}$ ATG$_{165}$ ACL$_{166}$ WGZ$_{167}$ CAJ$_{168}$ CAK$_{169}$ XTY$_{170}$ GGL$_{171}$ TTK$_{172}$ TGG$_{173}$ TAK$_{174}$ ACL$_{175}$ ATG$_{176}$ GAK$_{177}$ CCL$_{178}$ GCL$_{179}$ TGK$_{180}$ GAJ$_{181}$ AAJ$_{182}$ XTY$_{183}$ TAK$_{184}$ GGL$_{185}$ GGL$_{186}$ GCL$_{187}$ GTL$_{188}$ CCL$_{189}$

missä

A on deoksiadenyyli;

G on deoksiguanyyli;

C on deoksisytosyyli;

T on deoksitymidyyli;

J on A tai G;

K on T tai C;

L on A, T, C tai G;

M on A, C tai T;

X on T tai C, mikäli seuraava Y on A tai G, ja C, mikäli seuraava Y on C tai T;

Y on A, G, C tai T, mikäli seuraava X on C, ja A tai G, mikäli seuraava X on T;

W on C tai A, mikäli seuraava Z on G tai A, ja C, mikäli seuraava Z on C tai T;
Z on A, G, C tai T, mikäli edeltävä W on C, ja A tai G, mikäli edeltävä W on A;
QR on TC, mikäli seuraava S on A, G, C tai T, ja AG, mikäli seuraava S on T tai C;
S on A, G, C tai T, mikäli edeltävä QR on TC, ja T tai C, mikäli edeltävä QR on AG; ja
alaindeksit tarkoittavat aminohappojäännöksen asemaa apoaequoriinissa, jota nukleotidiketju vastaa geneettisen koodin mukaan, jolloin aminohappojäännösten numerointi on aloitettu aminopäästä, tai edellä mainittua peptidiä koodaava nukleotidiketju, joilla voidaan toteuttaa tämän keksinnön, joka liittyy tällaisten peptidien tuottamiseen yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla, edullisimmat suoritusmuodot.

Liitteenä olevilla kuvilla ja piirustuksilla havainnollistetaan spesifisissä esimerkeissä saatuja tuloksia, jotka esimerkit havainnollistavat tätä keksintöä, mutta jotka eivät rajoita sitä.

Kuva 1 on valokuva, jossa nähdään autoradiografinen analyysi in vitro luetuista proteiineista, Aequorea-meduusasta eristettyä poly(A^+)RNA:ta käyttäen. Tämä luenta toteutettiin Aequorea-meduusasta saatavan poly(A^+)RNA:n puuttuessa (ura 1) tai sen läsnäollessa (ura 3). Näistä kahdesta reaktiosta saadut, anti-aequoriini-immunosaostetut proteiinit istutettiin uriin 2 ja 4, vastaavasti. Oikealla nähdään proteiinin molekyylipainon arviointiin käytettyjen standardien, fosforylaasi b, BSA, ovalbumiini, karbonianhydraasi, SBTl ja lysotsyymi, asemat. Luonnollisen aequoriinin asema on myös merkitty näkyviin.

Kuva 2(a) on Aequorea victoria-meduusasta eristetyn geenin restriktiokartta, joka geeni sisältää apoaequoriinia koodaavan DNA-ketjun kun taas kuva 2(b) esittää kuvassa 2(a) esitetyn, plasmidiin lac-promoottorin suhteen alavirran puolelle istutetun kappaleen restriktiokarttaa.

Kuva 3 esittää käyrästöä, jossa nähdään Ca^{2+}-ioneista riippuvan fotoproteiinin aktiivisuuden riippuvuus ajasta ja happipitoisuu-

desta pAEQ1-uutteissa. Käytetyt olosuhteet: (a) Käyrissä 1 ja 2 0,5 millilitran suuruinen määrä aktiivista fraktiota tehtiin 2 mM β-merkaptoetanolin suhteen ja 0,1 mM coelenteraatti-lusiferiinin suhteen, ja inkuboitiin 4°C:n lämpötilassa esitetyn pituisen ajan. Asianmukaisten ajanjaksojen kuluttua näytteistä poistettiin 5 µl, josta määritettiin fotoproteiinin aktiivisuus. (b) Käyrän 2 tapauksessa liuenneen hapen taso alennettiin kuplittamalla seoksen läpi Ar-kaasua, ja seos saatettiin hapen kanssa kosketuksiin esitetyllä ajanhetkellä. (c) Käyrän 3 tapauksessa inkuboitavassa seoksessa käytettiin luonnollista apoaequoriinia pAEQ1-uutteen asemesta.

Kuva 4 on käyrä, joka esittää pAEQ1-uutteista syntyneen, Ca^{2+}-ioneista riippuvan fotoproteiinin aktiivisuutta geelisuodatuksessa saatuna profiilina. Ca^{2+}-ioneista riippuvan fotoproteiinin aktiivisuuden kehittämiseen käytettiin pAEQ1-uutteista saadun, osittain puhdistetun apoaequoriinin aktiivisuutta, ja aktiivisuus kehitettiin kuvan 3 yhteydessä esitetyllä tavalla. Tämän jälkeen tämä fotoproteiinin fraktio (50 µl) laitettiin erittäin hienoon G-75-40-kolonniin (petin tilavuus 30,7 ml), joka oli tasapainotettu 10 mM EDTA-liuoksella, 15 mM Tris-liuoksella, pH 7,5, sekä 100 mM KCl-liuoksella. Molekyylipainon arvioinnissa käytettyjen erilaisten merkitsimien eluoitumisasema on merkitty näkyviin.

Tässä keksinnössä saadaan aikaan ensimmäisen kerran sellainen yhdistelmä-DNA-vektori, joka kykenee ilmentämään apoaequoriiniproteiinia mikro-organismissa, ja tässä keksinnössä on lisäksi ensimmäisen kerran tunnistettu apoaequoriinin aminohappoketju, joten käytettäväksi on saatu homogeenista apoaequoriinia. Tämän informaation perusteella käytettävissä on lukuisia sellaisia yhdistelmä-DNA-vektoreita, joiden avulla voidaan saada homogeenista apoaequoriinia kohtuullisina määrinä. Muita yhdistelmä-DNA-vektoreita voidaan tuottaa yhdistelmä-DNA-tekniikassa tunnettujen standardimenetelmien avulla. Apoaequoriinia ilmentävä transformantti on samoin muodostettu esimerkkinä tästä tekniikasta.

Apoaequoriinin aminohappoketju on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3

Aminohappojäännösten järjestys apoaequoriinissa

```
        (S)   (D)   (R)
V K L T P D F N N P K W I G R H K H M F N F L D V N H N G K I S L D E M V Y K A S D I V I N N L G A
1                 10                  20                  30                  40                  50

                                                                                  (C)
                                                                                  (E)
T P E Q A K R H K D A V E A F F G G A G M K Y G V E T D W P A Y I E G W K K L A T D E L E K Y A K N
                  60                  70                  80                  90                  100

←(E)                                                                                                  (S)
Q I T L I R I W G D A L F D I I D K D Q N G A I T L S E W K A Y T K S A G I I Q T S E E C E E T F R
  (P)                 110                 120                 130                 140                 150

V C D I D E S G Q L D V D E M T R Q H L G F W Y T M D P A C E K L Y G G A V P-COOH
                  160                 170                 180
```

Apoaequoriinin aminohappoketju esitetään edellä käyttäen erillisistä aminohapoista yksikirjaimista koodia. Tässä ketjussa esiintyvät mikro-heterogeenisyyden asemat on merkitty suluissa olevin kirjaimin. Kaikki esitetyt aminohappojen korvautumiset vastaavat biologisesti toiminnallista aequoriinia

Aminohapoista käytetyt lyhenteet:

A alaniini	F fenyylialaniini	K lysiini	P proliini
C kysteiini	G glysiini	L leusiini	Q glutamiini
D aspartaatti	H histidiini	M metioniini	R arginiini
E glutamaatti	I isoleusiini	N asparagiini	S seriini
T treoniini	V valiini	W tryptofaani	Y tyrosiini

Koska peptidissä esiintyvän aminohapon ja tätä peptidiä koodaavan DNA-ketjun välillä on tunnettu, ja täysin määrätty riippuvuus, niin apoaequoriinia (tai mitä muuta jäljempänä tarkasteltavaa peptidiä tahansa) koodaavan DNA- tai RNA-molekyylin nukleotidijärjestys voidaan johtaa helposti tästä aminohappojäännösten ketjusta, ja tällainen nukleotidiketju on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4

Apoaequoriinia koodaavan DNA-molekyylin yhdessä juosteessa esiintyvien nukleotidien järjestys. Numeroilla viitataan aminohappoketjuun, ja vastaava DNA-kodoniketju alkaa proteiinin aminopäästä. Tämä DNA-ketju vastaa mRNA-ketjua, paitsi että mRNA-molekyylissä U korvaa T:n.

				5
Val	Lys	Leu	Thr	/Pro tai Ser/
GTL	AAJ	XTY	ACL	/CCL tai QRS/
Asp	Phe	/Asn tai Asp/	Asn	10 Pro
GAK	TTK	/AAK tai GAK/	AAK	CCL
/Lys tai Arg/	Try	Ile	Gly	15 Arg
/AAJ tai WGZ/	TGG	ATM	GGL	WGZ
His	Lys	His	Met	20 Phe
CAK	AAJ	CAK	ATG	TTK
Asn	Phe	Leu	Asp	25 Val
AAK	TTK	XTY	GAK	GTL
Asn	His	Asn	Gly	30 Lys
AAK	CAK	AAK	GGL	AAJ
Ile	Ser	Leu	Asp	35 Glu
ATM	QRS	XTY	GAK	GAJ

Met	Val	Tyr	Lys	Ala
ATG	GTL	TAK	AAJ	GCL
Ser	Asp	Ile	Val	Ile
QRS	GAK	ATM	GTL	ATM
Asn	Asn	Leu	Gly	Ala
AAK	AAK	XTY	GGL	GCL
Thr	Pro	Glu	Gln	Ala
ACL	CCL	GAJ	CAJ	GCL
Lys	Arg	His	Lys	Asp
AAJ	WGZ	CAK	AAJ	GAK
Ala	Val	Glu	Ala	Phe
GCL	GTL	GAJ	GCL	TTK
Phe	Gly	Gly	Ala	Gly
TTK	GGL	GGL	GCL	GGL
Met	Lys	Tyr	Gly	Val
ATG	AAJ	TAK	GGL	GTL
Glu	Thr	/Āsp tai Glu/	Try	Pro
GAJ	ACL	/ḠAK tai GAJ/	TGG	CCL
/Āla tai Glu/	Tyr	Ile	Glu	Gly
/ḠCL tai GAJ/	TAK	ATM	GAJ	GGL
Try	Lys	/Lys tai Arg/	Leu	Ala
TGG	AAJ	/ĀAJ tai WGZ/	XTY	GCL
Thr	/Āsp, Glu tai Cys/	Glu	Leu	Glu
ACL	/ḠAK, GAJ tai TGK/	GAJ	XTY	GAJ

				100
/Lys tai Arg/	Tyr	/Ala tai Ser/	Lys	Asn
/AAJ tai WGZ/	TAK	/GCL tai QRS/	AAJ	AAK
				105
/Gln tai Glu/	/Ile tai Pro/	Thr	Leu	Ile
/CAJ tai GAJ/	/ATM tai CCL/	ACL	XTY	ATM
				110
Arg	/Ile tai Leu/	Try	Gly	Asp
WGZ	/ATM tai XTY/	TGG	GGL	GAK
				115
Ala	Leu	Phe	Asp	Ile
GCL	XTY	TTK	GAK	ATM
				120
/Ile tai Val/	Asp	Lys	Asp	Gln
/ATM tai GTL/	GAK	AAJ	GAK	CAJ
				125
Asn	Gly	Ala	Ile	Thr
AAK	GGL	GCL	ATM	ACL
				130
Leu	/Ser tai Asp/	Glu	Try	Lys
XTY	/QRS tai GAK/	GAJ	TGG	AAJ
				135
Ala	Tyr	Thr	Lys	/Ser tai Ala/
GCL	TAK	ACL	AAJ	/QRS tai GCL/
				140
Ala	Gly	Ile	Ile	Gln
GCL	GGL	ATM	ATM	CAJ
				145
/Thr tai Ser/	Ser	Glu	/Glu tai Asp/	Cys
/ACL tai QRS/	QRS	GAJ	/GAJ tai GAK/	TGK
				150
Glu	Glu	Thr	Phe	Arg
GAJ	GAJ	ACL	TTK	WGZ
				155
Val	Cys	Asp	Ile	Asp
GTL	TGK	GAK	ATM	GAK
				160
Glu	Ser	Gly	Gly	Leu
GAJ	QRS	GGL	CAJ	XTY

				165
Asp	Val	Asp	Glu	Met
GAK	GTL	GAK	GAJ	ATG
				170
Thr	Arg	Gln	His	Leu
ACL	WGZ	CAJ	CAK	XTY
				175
Gly	Phe	Try	Tyr	Thr
GGL	TTK	TGG	TAK	ACL
				180
Met	Asp	Pro	Ala	Cys
ATG	GAK	CCL	GCL	TGK
				185
Glu	Lys	Leu	Tyr	Gly
GAJ	AAJ	XTY	TAK	GGL
			189	
Gly	Ala	Val	Pro-COOH	
GGL	GCL	GTL	CCL	

Koska tämän geenin DNA-ketju on täysin tunnistettu, niin tällainen DNA-geeni voidaan valmistaa täydellisesti kemiallisella synteesillä, jonka jälkeen tämä geeni voidaan istuttaa mihin tahansa monista käytettävistä DNA-vektoreista yhdistelmä-DNA-tekniikassa tunnettuja menetelmiä käyttäen. Näin ollen tämä keksintö voidaan toteuttaa sellaisilla reagensseilla, plasmideilla ja mikro-organismeilla, jotka ovat vapaasti yleisön käytettävissä tämän patenttihakemuksen jättämishetkellä.

Esimerkiksi 100 emäsparia pitemmät nukleotidiketjut voidaan syntetoida helposti yhtiön Applied Biosystems DNA-syntetisaattorilla, malli 380A, kuten tämän laitteen mainoksista ilmenee (esimerkiksi julkaisussa Genetic Engineering News, marras/joulukuu 1984, sivu 3). Tällaiset oligonukleotidit voidaan pilkkoa helposti, esimerkiksi tässä hakemuksessa myöhemmin esitettäviä menetelmiä käyttäen, jolloin saadaan ohessa kuvatun kaltaisia nukleotidiketjuja.

Lisäksi saatavilla on myöskin sellaisia automaattisia laitteita, joiden avulla kaikkien ohessa kuvattujen peptidien suora syn-

tetoiminen onnistuu vaivattomasti. Edellä mainitun julkaisun, Genetic Engineering News samassa numerossa mainostetaan kaupallisesti saatavaa automaattista peptidisyntetisaattoria, jolla kytkeytymisen tehokkuudeksi saadaan yli 99 % (sivu 34). Tällaisten laitteiden avulla tämän keksinnön mukaisia peptidejä on vaivattomasti saatavana, joko suoran synteesin avulla, tai siten, että ensin syntetoidaan joukko kappaleita, jotka voidaan tämän jälkeen kytkeä toisiinsa muilla tunnetuilla menetelmillä.

Taulukossa 3 esitettyjen spesifisten peptidiketjujen lisäksi myöskin muilla, näihin ketjuihin perustuvilla peptideillä, jotka ovat muuntuneet vähäisessä määrin näihin ketjuihin verrattuna, on apoaequoriinin biologista aktiivisuutta. Esimerkiksi mainitun ketjun jommasta kummasta tai molemmista päistä voi puuttua korkeintaan 15 aminohappoa ilman, että ketju menettää kykynsä sitoa lusiferiinia ja kalsiumia. Samoin jompaan kumpaan tai molempiin päihin voi liittyä jopa 10 ylimääräistä aminohappoa. Nämä muunnelmat ovat mahdollisia, koska lusiferiinin ja kalsiumin sitoutumiskohdat käsittävät mainituissa ketjuissa keskellä sijaitsevia aminohappoja. Esimerkiksi lusiferiinin sitoutumiskohta vaikuttaa käsittävän aminohapot 40-100. Koska ketjujen päät ovat suhteellisen merkityksettömiä biologisen aktiivisuuden suhteen, niin suhteellisen merkityksetöntä on myöskin se, minkälaisia muita aminohappoja ketjuun on liittynyt, ja nämä aminohapot voivat olla mitä tahansa edellä mainittuja aminohappoja.

Käytettävissä on kokeellista tietoa siitä, etteivät ketjun aminopäähän liittyneet aminohapot vaikuta merkittävästi bioluminesenssiin. Kuitenkin edullisimmat yhdisteet ovat yhdisteitä, jotka vastaavat mahdollisimman tarkoin esitettyjä spesifisiä kaavoja, jolloin ketjun jommasta kummasta päästä voi puuttua 10 tai sitä vähemmän, mieluummin 5 tai sitä vähemmän aminohappoa, tai ketjun jompaan kumpaan päähän on voinut liittyä 7 tai sitä vähemmän, mieluummin 4 tai sitä vähemmän ylimääräistä aminohappoa.

Molekyylin keskiosassa aminohappojen korvautuminen on paljon rajoitetumpaa, jotta biologinen aktiivisuus säilyisi. Kuitenkin kaikki taulukossa 3 tai taulukossa 4 esitetyt mikroheterogeenisyyden kohdat vastaavat biologisesti toiminnallisia korvautumisia, ja esitettyjen korvautumisten kaikki yhdistelmät johtavat toiminnalliseen molekyyliin. Molemmissa taulukoissa pääasiallisen rivin merkintä (taulukko 3) tai ensimmäisenä esitetty merkintä (taulukko 4) vastaa todennäköisemmin tässä kohdassa esiintyvää aminohappoa tai nukleotidiä, ja on suositeltavampi.

Tämän lisäksi edellä mainituista peptideistä ja DNA-molekyyleistä vähäisillä muunnoksilla saatujen molekyylien katsotaan vastaavan ohessa yksityiskohtaisemmin esitettäviä peptidejä ja DNA-molekyylejä, mikä on selvää alan asiantuntijalle. Esimerkiksi on perusteltua olettaa, ettei leusiinin erillinen korvautuminen isoleusiinilla tai valiinilla, aspartaatin erillinen korvautuminen glutamaatilla, treoniinin erillinen korvautuminen seriinillä tai jokin muu tällainen aminohapon korvautuminen rakenteellisesti samankaltaisella aminohapolla vaikuta paljoa tuloksena olevan molekyylin biologiseen aktiivisuuteen, erityisesti mikäli tämä korvautuminen ei käsitä sitoutumiskohdan aminohappoja. Se, tuottaako aminohapon korvautuminen toimivan peptidin, voidaan määrittää helposti inkuboimalla tuloksena olevaa peptidiä lusiferiinin kanssa, jonka jälkeen se saatetaan kosketuksiin kalsiumionien kanssa. Esimerkkejä tästä menetelmästä esitetään yksityiskohtaisemmin jäljempänä. Mikäli valoa emittoituu, niin tämä korvautuminen on epäolennainen, ja testattava molekyyli on samanlainen kuin taulukossa 3 esitetyt molekyylit. Sellaisia peptidejä, joissa on tapahtunut enemmän kuin yksi korvautuminen, voidaan testata vaivattomasti tällä samalla tavalla.

Tällaisia peptidejä koodaavat DNA-molekyylit voidaan määrittää helposti taulukossa 1 esitetyn kodoniluettelon avulla, ja niiden katsotaan samoin vastaavan taulukossa 4 esitettyä DNA-ketjua. Itse asiassa, koska DNA-kodonien ja peptidissä esiintyvien amino-

happojen välillä vallitsee 1:1-riippuvuus, niin tässä hakemuksessa esitetyt, peptidissä esiintyvät korvautumiset tai muut muutokset ovat täysin sovellettavissa vastaavaan DNA-ketjuun, tai tämän ketjun käsittävään DNA-molekyyliin, yhdistelmä-DNA-vektoriin tai transformoituun mikro-organismiin (ja kääntäen).

Taulukossa 4 lueteltujen spesifisten nukleotidien lisäksi tämän keksinnön mukaisissa DNA-molekyyleissä (tai vastaavissa RNA-molekyyleissä) voi olla ylimääräisiä nukleotidejä, jotka sijaitsevat ennen erityisesti lueteltuja nukleotidejä tai niiden jälkeen. Esimerkiksi poly A on voinut liittyä 3'-päähän, kumpaan tahansa päähän on voinut liittyä lyhyt (esimerkiksi alle 20 nukleotidin) ketju, jolloin saadaan aikaan päässä sijaitseva, restriktioendonukleaasin kohtaa vastaava ketju, pysäytyskodoni voi sijaita peptidiketjun jälkeen, jolloin kopioituminen saadaan päätetyksi, ja niin edelleen. Lisäksi voidaan tuottaa sellaisia DNA-molekyylejä, jotka sisältävät promoottorialueen tai jonkin muun säätelevän alueen ylävirran puolella tämän geenin suhteen. Kaikki tämän keksinnön mukaisia ketjuja sisältävät DNA-molekyylit ovat käyttökelpoisia siinä suhteessa, että niitä kaikkia voidaan fragmentoida mahdollisimman vähäisessä määrin, jolloin saadaan tässä hakemuksessa jäljempänä kuvatun tyyppisiä oligonukleotidikoettimia.

Tämän keksinnön mukaisia peptidejä voidaan ensimmäisen kerran valmistaa homogeenisina seoksina, joko suoraan syntetoimalla, tai käyttäen ohessa kuvattua kloonattua geeniä. Peptidin tai DNA-ketjun yhteydessä käytetyllä käsitteellä "homogeeninen" tarkoitetaan sitä, että tarkasteltavassa seoksessa olennaisesti kaikkien läsnäolevien molekyylien pääasiallinen molekyylirakenne (primäärirakenne; eli aminohappojen tai nukleotidien muodostama ketju) on sama. Edellisessä lauseessa käytetyllä käsitteellä "olennainen" tarkoitetaan mieluummin vähintään 95 paino-%, mieluiten vähintään 99 paino-%, ja kaikkein mieluiten vähintään 99,8 paino-%. Homogeenisen peptidin kokonaisesta molekyylistä tai DNA-ketjusta peräisin olevien kappaleiden läsnäoloa, mikäli niitä on läsnä alle 5 paino-%, mieluummin 1 paino-%, ja mieluiten 0,2 paino-%, ei huomioida homogee-

nisyyttä määritettäessä, sillä käsite "homogeeninen" viittaa kokonaisten molekyylien (ja niiden kappaleiden) läsnäoloon, joilla molekyyleillä on yksi ainoa, täysin määrätty rakenne, kun taas seoksissa (joita esiintyy esimerkiksi luonnollisen apoaequoriinin tapauksessa) on läsnä lukuisia molekyylipainonsa suhteen samankaltaisia molekyylejä, joiden primäärinen molekyylirakenne poikkeaa kuitenkin toisistaan. Ohessa käytetyllä käsitteellä "eristetty" tarkoitetaan puhdasta peptidiä, DNA:ta tai RNA:ta, joka on erotettu muista peptideistä, DNA- ja RNA-molekyyleistä, vastaavasti, ja jotka esiintyvät ainoastaan liuottimen, puskurin tai ionin, tai näiden aineiden biologisessa liuoksessa tavallisesti esiintyvän muun komponentin läsnäollessa (tai ilman niitä). Käsite "eristetty" ei kata luonnollisessa tilassaan olevia luonnon materiaaleja eikä sellaisia luonnon materiaaleja, jotka on erotettu komponenteikseen (esimerkiksi akryyliamidigeelillä), mutta joita ei olla saatu puhtaana aineena eikä puhtaina liuoksina. Ohessa käytetyllä käsitteellä "puhdas" on mieluiten samat numeeriset rajat kuin välittömästi edellä esitetyllä käsitteellä "olennainen". Ohessa käytetyllä sanonnalla "korvautuu" tai "korvautuminen" ei välttämättä tarkoiteta todella tapahtuvaa muutosta, vaan sillä viitataan peptidiin, joka on olemassa, ja jossa merkitty "korvautunut" aminohappo sijaitsee siinä samassa asemassa kuin se aminohappo, jonka esitetään olevan läsnä toisessa kaavassa (esimerkiksi seriinin ollessa läsnä asemassa 5 proliinin asemesta).

Kaikkien ohessa kuvattujen peptidien suoloja esiintyy luonnostaan, kun näistä peptideistä on tehty vesiliuoksia, joiden pH vaihtelee (tai kun nämä peptidit on eristetty tällaisista vesiliuoksista). Näiden peptidien kaikkien, biologiselta aktiivisuudeltaan samanlaisten suolojen katsotaan kuuluvan tämän keksinnön piiriin. Esimerkkeinä mainittakoon karboksyylihappojäännösten alkali-, maa-alkali- ja muut metallisuolat, aminojäännösten ja happojen (esim. HCl) väliset additiosuolat, sekä zwitterionit, jotka ovat muodostuneet samassa molekyylissä karboksyylihapon ja aminojäännösten välisillä reaktioilla.

Tässä keksinnössä on tarkasteltu spesifisesti peptidin tai nukleotidin jokaista sellaista mahdollista muunnosta, joka voidaan saada aikaa taulukossa 3 ja taulukossa 4 lueteltujen, mahdollisten aminohappojen ja kodonien erilaisilla yhdistelmillä, ja kaikki tällaiset muunnokset katsotaan erillisinä julkaistuiksi.

Tämän keksinnön edullisessa suoritusmuodossa mRNA-molekyyliksi koodautunutta geneettistä informaatiota saadaan Aequorea-meduusasta, ja sitä käytetään DNA-geenin muodostamiseen, jota DNA-geeniä käytetään puolestaan tämän keksinnön mukaisen peptidin tuottamiseen.

On suositeltavaa, että mRNA:n lähteenä käytetään Aequorea-meduusan valoa emittoivista elimistä saatavaa solu-uutetta, vaikkakin meduusan koko ruumiista saatavaa solu-uutetta voidaan myös käyttää. Tyypillisesti meduusa, tai siitä saadut osat leikataan pieniksi paloiksi (hienonnetaan), ja nämä palat jauhetaan, jolloin saadaan ensimmäinen solujen raakasuspensio. Tätä solususpensiota sonikoidaan tai sitä käsitellään muulla tavalla solukalvojen hajottamiseksi, jolloin saadaan solujen raakauute. Ensimmäinen puhdistaminen voidaan toivottaessa suorittaa biokemiassa tunnetuilla menetelmillä (esimerkiksi edullinen proteiinien saostaminen). Tätä solujen raakauutetta, tai siitä saatua osittain puhdistettua RNA-osaa käsitellään tämän jälkeen siten, että RNA saadaan edelleen erotetuksi. Esimerkiksi solujen raakauutetta voidaan kerrostaa suuruudeltaan 2,54 cm x 8,9 cm olevassa nitroselluloosaputkessa tilavuudeltaan 5 millilitraa olevan kerroksen päälle, joka kerros käsittää 5,7 M CsCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, ja sentrifugoida SW27 roottorissa (Beckman Instruments Corp., Fullerton, Kalif.) nopeudella 27 000 rpm 16 tuntia 15°C:n lämpötilasa. Sentrifugoinnin jälkeen putken sisältö dekantoidaan, putki kuivataan ja putken pohjalla sijaitseva 1/2 cm paksuinen, kirkkaan RNA-kasauman käsittävä kerros leikataan irti partakoneen terällä. Tämä kasauma siirretään pulloon, ja liuotetaan 20 millilitraan liuosta, joka käsittää 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 5% sarkosyyliä ja 5% fenolia. Tämän jälkeen liuos tehdään 0,1 molaariseksi NaCl:n suhteen,

ja sitä ravistellaan 40 millilitralla seosta, joka sisältää 1:1 fenolia ja kloroformia. RNA saostetaan vesifaasista etanolilla 0,2 M Na-asetaatin läsnäollessa (pH 5,5), ja otetaan talteen sentrifugoimalla. Tämän menetelmän asemesta voidaan käyttää mitä tahansa muuta menetelmää, jolla RNA voidaan eristää solulähteestä.

Ohessa voidaan käyttää RNA:n eri muotoja, kuten polyadenyloitua, raakaa tai osittain puhdistettua lähetti-RNA:ta, joka voi olla heterogeenistä ketjunsa ja molekyylikokonsa suhteen. RNA:n eristämiseksi käytetyn menetelmän selektiivisyyttä voidaan parantaa millä tahansa sellaisella menetelmällä, joka johtaa toivotun mRNA:n rikastumiseen eristetyn mRNA:n heterodisperssiin populaatioon. Mitä tahansa tällaista esipuhdistusmenetelmää voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisen geenin valmistuksessa, edellyttäen, ettei tässä menetelmässä mRNA pilkkoudu endonukleolyyttisesti.

Esipuhdistaminen toivottujen mRNA-ketjujen rikastamiseksi voidaan myös toteuttaa menetelmillä, joita tavallisesti käytetään RNA:n fraktioimiseen sen jälkeen, kun se on ensin eristetty solusta. Mitä tahansa sellaista menetelmää, joka ei johda RNA:n vaurioitumiseen, voidaan käyttää. Erityisen soveltuvia ovat preparatiivinen sedimentointi sakkaroosigradienttiin sekä geelielektroforeesi.

mRNA on eristettävä lähteenä toimivista soluista sellaisissa olosuhteissa, joissa mRNA ei vahingoitu. Erityisesti RNaasientsyymien vaikutusta on vältettävä, koska nämä entsyymit kykenevät pilkkomaan RNA-nukleotidiketjun hydrolyyttisesti. Sopivassa menetelmässä RNaasi-entsyymin vaikutuksen inhiboimiseksi soluista uuttamisen aikana käytetään 4 M guanidiniumtiosyanaattia ja 1 M merkaptoetanolia solujen hajottamisvaiheessa. Lisäksi alhaisella lämpötilalla ja lähellä arvoa 5,0 olevalla pH:lla voidaan edelleen vähentää RNaasin aiheuttamaa eristetyn RNA:n hajoamista.

Yleisesti ottaen mRNA valmistetaan siten, että se on olennaisesti vapaata kontaminoivasta proteiinista, DNA:sta, polysakkarideista ja lipideistä. Alalla tunnetaan hyvin standardimenetelmiä tällaisen puhdistamisen toteuttamiseksi. Täten eristetty RNA sisältää sekä lähetti-RNA:ta että lähetti-RNA:sta poikkeavaa RNA:ta. Vaivaton menetelmä eukariooteista saadun mRNA:n erottamiseksi on kromatografointi oligo-dT-substituoidulla selluloosakolonnilla, tai muita oligonukleotideillä substituoituja kolonnimateriaaleja, kuten poly U-Sepharosegeeliä käyttäen, jolloin voidaan käyttää hyväksi eukarioottisen mRNA:n 3'-päässä läsnäolevan polyadenyylihapon aiheuttamaa vetysidosten muodostumisspesifisyyttä.

Seuraavana vaiheena useimmissa menetelmissä on eristettyjä heterogeenisiä mRNA-ketjuja täydentävän DNA:n muodostaminen. Tähän reaktioon valitaan entsyymiksi käänteiskopioijaentsyymi, vaikkakin reaktiossa voitaisiin myös periaatteessa käyttää mitä tahansa sellaista entsyymiä, joka kykenee muodostamaan tästä mRNA-mallista sitä täydentävän DNA-kopion. Tämä reaktio voidaan toteuttaa alalla aikaisemmin esitetyissä olosuhteissa, käyttäen mRNA:ta mallina, ja neljän deoksinukleosidi-trifosfaatin dATP, dGTP, dCTP ja dTTP seosta DNA-juosteen prekursorina. On tavallista, että yksi näistä deoksinukleosidi-trifosfaateista merkitään radioisotoopilla, esimerkiksi ^{32}P-isotoopilla, alfa-asemastaan, jolloin reaktion etenemistä voidaan seurata vaivattomasti, jolloin tuote voidaan ottaa talteen tämän merkkiaineen avulla erotustoimenpiteiden, kuten kromatografian tai elektroforeesin jälkeen, ja jotta saanto voitaisiin arvioida kvantitatiivisesti. Katso edellä mainittu Efstratiadis'n et al. julkaisu.

Käänteiskopioija-entsyymillä toteutetussa reaktiossa tuotetut cDNA-kopiot ovat jossain määrin heterogeenisiä 5'-päässä ja 3'-päässä sijaitsevien ketjujensa suhteen, mikä johtuu siitä, että erillisten kopioiden käynnistymis- ja päättämispisteet vaihtelivat mRNA-malliin verrattuna. 5'-päässä esiintyvän vaihtelevuuden oletetaan johtuvan siitä, että synteesin käynnistämiseen käytetty oligo-dT-primeeri kykenee sitoutumaan

moniin eri kohtiin, jotka sijaitsevat mRNA-molekyylin polyadenyloitua aluetta pitkin. cDNA-kopioiden synteesi alkaa määrittämättömästä pisteestä poly-A-alueessa, ja vaihtelevan pituinen kappale poly-A-alueesta kopioituu, oligo-dT-primeerin alkuperäisestä sitoutumiskohdasta riippuen. Tämä epämääräisyys voidaan välttää käyttämällä sellaista primeeriä, joka sisältää oligo-dT-alueen lisäksi yksi tai kaksi nukleotidiä itse RNA-ketjusta, jolloin saadaan aikaan primeeri, jolla on ensisijainen ja määrätty sitoutumiskohta kopiointireaktion käynnistämiseksi.

cDNA-kopion 3'-päässä esiintyvä epämääräisyys johtuu lukuisista, käänteiskopioija-entsyymin reaktioon vaikuttavista tekijöistä, sekä RNA-mallin osittaisesta mahdollisesta hajoamisesta. Mahdollisimman pitkien spesifisten cDNA-kopioiden eristämistä helpotetaan huomattavasti, mikäli käänteiskopioija-entsyymin reaktioon valitaan sellaiset olosuhteet, jotka eivät ainoastaan suosi täysipituisten molekyylien muodostumista, vaan jotka myöskin tukahduttavat lyhyiden DNA-ketjujen synteesiä. Lintujen myeloblastosis-viruksen käänteiskopioija-entsyymin edulliset olosuhteet on esitetty US-patenttijulkaisun 4 363 877 esimerkkiosassa, ja tämä osa liitetään oheiseen hakemukseen tällä viittauksella. Niitä erityisiä parametrejä, joita vaihtelemalla saadaan aikaan pitkäketjuisten luotettavien DNA-kopioiden mahdollisimman tehokas muodostuminen, ovat reaktion lämpötila, suolapitoisuus, entsyymin määrä, primeerin pitoisuus malliin verrattuna, ja reaktioaika.

Olosuhteet lämpötilan ja suolapitoisuuden suhteen valitaan siten, että oligo-dT-primeerin ja RNA-mallin polyadenyloidun osan välistä emäsparien spesifistä muodostumista optimoidaan. Sopivasti valituissa olosuhteissa primeeri kykenee sitoutumaan RNA-mallin polyadenyloituun alueeseen, mutta epäspesifinen käynnistyminen, joka johtuu primeerin sitoutumisesta muihin kohtiin mallissa, esimerkiksi lyhyisiin A-rikkaisiin ketjuihin, estetään olennaisesti. Lämpötilan ja suolan vaikutukset riippuvat toinen toisistaan. Korkeat lämpötilat ja alhaiset suolapitoisuudet alentavat spesifisten emäsparien muodostumi-

sen stabiilisuutta. Reaktioaika pidetään mahdollisimman lyhyenä, jotta epäspesifiset käynnistymiset estettäisiin, ja jotta hajoamisen mahdollisuus saataisiin mahdollisimman alhaiseksi. Reaktioajat riippuvat lämpötilasta, alhaisempien lämpötilojen vaatiessa pitempiä reaktioaikoja. Kun lämpötila on 42°C, niin reaktion sopiva kesto on 1-10 minuuttia. Primeeriä tulisi olla läsnä 50-500-kertaisena molaarisena ylimääränä RNA-malliin verrattuna, ja entsyymiä tulisi olla läsnä yhtä suurena molaarisena ylimääränä RNA-malliin verrattuna. Entsyymin ja primeerin ylimäärien käyttö edistää reaktion käynnistymistä ja cDNA-ketjun kasvua, jolloin pitkäketjuisia cDNA-kopioita muodostuu tehokkaasti lyhyiden inkubointiaikojen puitteissa.

Useissa tapauksissa cDNA:n puhdistaminen edelleen on mahdollista käyttäen mRNA:sta kopioituja, yksijuosteisia cDNA-ketjuja. Kuitenkin joissakin tapauksissa, kuten jäljempänä esitetään, toivottu restriktioentsyymi on sellainen, että sen vaikutus kohdistuu ainoastaan kaksijuosteiseen DNA-molekyyliin. Näissä tapauksissa edellä kuvatulla tavalla valmistettua cDNA:ta voidaan käyttää mallina kaksijuosteisen DNA:n synteesissä, käyttämällä DNA-polymeraasia, kuten käänteiskopioijaentsyymiä, sekä nukleaasia, joka kykenee hydrolysoimaan yksijuosteista DNA:ta. Menetelmiä kaksijuosteisen DNA:n valmistamiseksi tällä tavalla on esitetty alalla aikaisemmin. Katso esimerkiksi julkaisu Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J ja Goodman, H.M., Science 196, 1313 (1977). Toivottaessa cDNA:ta voidaan puhdistaa edelleen US-patenttijulkaisussa 4 363 877 esitetyllä menetelmällä, vaikkakaan tämä ei ole oleellista. Tässä menetelmässä heterogeenista cDNA:ta joka on valmistettu kopioimalla heterogeenisia mRNA-ketjuja, käsitellään yhdellä tai kahdella restriktioendonukleaasilla. Käytettävän endonukleaasin valinta riippuu ensisijaisesti edeltä käsin suoritetusta määrityksestä, jolla todetaan, että tämän entsyymin tunnistamiskohtia on läsnä eristettävässä cDNA-ketjussa. Tämä menetelmä riippuu kahden tällaisen kohdan olemassaolosta. Mikäli nämä kohdat ovat identtiset, niin yhden entsyymin käyttö riittää. Toivottu ketju pilkkoutuu molemmilta puolilta, jolloin heterogeenisyys koon suhteen eliminoituu

toivotun cDNA-ketjun tapauksessa, ja jolloin muodostuu molekyylien, eli kappaleiden populaatio, joka sisältää toivotut, pituudeltaan homogeeniset ketjut. Mikäli nämä restriktiokohdat ovat erilaisia, niin toivottujen, pituudeltaan homogeenisten kappaleiden muodostamiseksi tarvitaan kaksi entsyymiä.

Niiden restriktioentsyymien, jotka kykenevät tuottamaan optimaalisen pituisia, koko toivottua proteiinia, tai toivotun proteiinin osaa koodaavia nukleotidiketjun kappaleita, valinta on tehtävä empiirisesti. Mikäli toivotun proteiinin aminohappoketju tunnetaan, niin restriktioendonukleaasilla pilkkomalla tuotettujen, pituudeltaan yhtenäisten nukleotidikappaleiden nukleotidiketjua voidaan verrata tämän ketjun koodaamaan aminohappoketjuun, käyttäen elämän kaikille muodoille yhteisen geneettisen koodin tunnettua suhdetta. Toivotun proteiinin täydellinen aminohappoketju ei kuitenkaan ole välttämätön, sillä kohtalaisen täsmällinen tunnistaminen voidaan toteuttaa ketjun osan perusteella. Kun nyt aminohappoketju toivotussa proteiinissa tunnetaan, niin restriktioendonukleaaseilla pilkkoen tuotettuja, pituudeltaan yhdenmukaisia polynukleotidejä voidaan käyttää koettimina, jotka kykenevät tunnistamaan toivotun proteiinin synteesin asianmukaisessa, proteiinien in vitro syntetointijärjestelmässä. Vaihtoehtoisesti mRNA voidaan puhdistaa affiniteettikromatografisesti. Alan asiantuntijoille tutut muut tekniikat soveltuvat samoin tähän tarkoitukseen.

Sopivien restriktioendonukleaasien lukumäärä riippuu siitä, käytetäänkö yksijuosteista vai kaksijuosteista cDNA:ta. Edullisimmat entsyymit ovat niitä, jotka kykenevät vaikuttamaan yksijuosteiseen DNA-molekyyliin, joka on välitön reaktiotuote mRNA:n käänteisessä kopioinnissa. Niiden restriktioendonukleaasien, joista tällä hetkellä tiedetään, että ne kykenevät vaikuttamaan yksijuosteiseen DNA-molekyyliin, lukumäärä on rajallinen. Tällä hetkellä tiedetään, että entsyymit HaeIII, HhaI ja Hin(f)I ovat sopivia. Lisäksi entsyymi MboII saattaa vaikuttaa yksijuosteiseen DNA:han. Mikäli lisätutkimukset osoittavat, että jotkut muutkin

restriktioentsyymit voivat vaikuttaa yksijuosteiseen DNA:han, niin tällaiset muut entsyymit voidaan asianmukaisesti sisällyttää edullisten entsyymien luetteloon. Muita sopivia entsyymejä ovat kaksijuosteiselle cDNA-molekyylille spesifiset entsyymit. Tällaiset entsyymit eivät ole suositeltavia, sillä ylimääräisiä reaktioita tarvitaan kaksijuosteisen cDNA:n tuottamiseen, jolloin se todennäköisyys kasvaa, että pitkiä ketjuja menetetään, ja että muuta häviötä tapahtuu epätäydellisen talteenoton seurauksena. Kaksijuosteisen cDNA:n käytön muuna teknisenä haittana on se, että myöhemmin toteutettava ketjun analyysi mutkistuu ja vaatii paljon työtä. Näistä syistä johtuen yksijuosteisen cDNA:n käyttö on suositeltavaa, mutta kaksijuosteisen cDNA:n käyttö on myös mahdollista. Itse asiassa, alun perin tämän keksinnön mukaisessa käytännössä käytettiin vain kaksijuosteista cDNA:ta.

Restriktioendonukleaasilla käsittelyä varten muokattu cDNA voidaan merkitä radioaktiivisesti, jotta se olisi ilmaistavissa myöhempien erotusvaiheiden jälkeen. Edullinen tekniikka on radioaktiivisen merkkiaineen, kuten ^{32}P-isotoopin, istuttaminen alfa-asemaan jossakin neljässä prekursorina toimivassa deoksinukleosidi-trifosfaatissa. Suurimpaan aktiivisuuteen päästään, kun radioaktiivisen prekursorin pitoisuus on suuri radioaktiivisella aineella merkitsemättömän muodon pitoisuuteen verrattuna. Kuitenkin jokaisen deoksinukleosidi-trifosfaatin kokonaispitoisuuden tulisi olla suurempi kuin 30 /uM, jotta käänteiskopioija-entsyymillä toteutettavassa reaktiossa saataisiin mahdollisimman pitkiä cDNA-molekyylejä. Katso julkaisu Efstratiadis, A., Maniatis, T., Kafatos, F.C., Jeffrey, A., ja Vournakis, J.N., Cell 4, 367 (1975). cDNA-molekyylin nukleotidiketjun määrittämiseksi 5'-päät voidaan vaivattomasti merkitä ^{32}P-isotoopilla polynukleotidikinaasi-entsyymin katalysoimalla reaktiolla. Katso julkaisu Maxam, A.M., ja Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74, 560 (1977).

Restriktioentsyymillä tai kahden restriktioentsyymin yhdistelmällä tuotetut kappaleet voidaan erottaa toisistaan ja heterodisperseistä ketjuista, joista tunnistamiskohdat puuttuvat, jokaisella sellaisella sopivalla menetelmällä, jolla polynukleo-

tidejä voidaan erottaa toisistaan niiden pituuden perusteella. Näihin menetelmiin kuuluu monia elektroforeettisia tekniikoita ja sedimentointitekniikoita ultrasentrifugia käyttäen. Geelielektroforeesi on suositeltava, koska sillä päästään parhaaseen erotuskykyyn, kun erottaminen perustuu polynukleotidin pituuteen. Lisäksi tällä menetelmällä erottuneiden materiaalien kvantitatiivinen talteenotto onnistuu helposti. Vaivattomia geelielektroforeettisia menetelmiä esitetään julkaisuissa Dingman, C.W., ja Peacock, A.C., Biochemistry 7, 659 (1968) sekä Maniatis, T., Jeffrey, A ja van de Sande, H., Biochemistry, 14, 3787 (1975).

Ennen restriktioendonukleaaseilla käsittelyä useimmista lähteistä saatavat cDNA-kopiot todetaan pituutensa suhteen heterodisperseiksi. Asianmukaisesti valitun restriktioendonukleaasin tai endonukleaasiparin vaikutuksen avulla toivotun ketjun sisältävät polynukleotidiketjut pilkotaan vastaavista restriktiokohdistaan, jolloin saadaan pituudeltaan yhdenmukaisia polynukleotidikappaleita. Geelielektroforeesissa todetaan selvän vyöhykkeen muodostuminen. Riippuen siitä, käsittävätkö muut ketjut restriktiokohtia, vai puuttuuko muista ketjuista restriktiokohdat, myöskin muita erillisiä vyöhykkeitä voi muodostua, joiden muiden vyöhykkeiden muodostuminen perustuu mitä todennäköisimmin ketjuihin, joiden pituus eroaa toivotun ketjun pituudesta. Näin ollen, restriktioendonukleaasin vaikutuksen seurauksena geelielektroforeesissa saatu kuvio paljastaa yhden tai useamman vyöhykkeen ilmaantumisen, kun taas cDNA:n loppuosa pysyy heterodisperssinä. Siinä tapauksessa, että toivottu cDNA-ketju käsittää suurimman läsnäolevan polynukleotidilajin, niin elektroforeesissa saatu kuvio paljastaa, että suurin osa cDNA:sta on läsnä tässä erillisessä vyöhykkeessä.

On epätodennäköistä, että restriktioentsyymit pilkkovat kaksi erilaista ketjua siten, että saadaan olennaisesti samanpituisia kappaleita, mutta kuitenkin on suotavaa, että käytettävissä on menetelmä määrätyn pituisten kappaleiden puhtauden määrittämiseksi. Elektroforeettisen vyöhykkeen sisältämien ketjujen analyysiä voidaan käyttää sellaisten epäpuhtauksien ilmaisemiseksi,

jotka epäpuhtaudet muodostavat 10 % tai enemmän vyöhykkeen sisältämästä materiaalista. Menetelmä epäpuhtauksien alhaisempien pitoisuuksien ilmaisemiseksi on kehitetty, ja se noudattaa ensimmäisessä erotusmenetelmässä sovellettuja periaatteita. Tämän menetelmän edellytyksenä on, että toivotun nukleotidiketjun käsittävä kappale sisältää sellaisen restriktioendonukleaasin tunnistamiskohdan, jota endonukleaasia ei käytetty ensimmäisessä eristysvaiheessa. Geelielektroforeesissa saadusta vyöhykkeestä eluoidun polynukleotidimateriaalin käsittely sellaisella restriktioendonukleaasilla, joka kykenee vaikuttamaan sisäisesti toivottuun ketjuun, johtaa toivotun ketjun pilkkoutumiseen kahdeksi alikappaleeksi, jotka mitä todennäköisimmin ovat eri pituiset. Nämä alikappaleet tuottavat elektroforeesilla kaksi erillistä vyöhykettä asemiin, jotka vastaavat alikappaleiden pituuksia, vastaavasti, ja näiden pituuksien summa on yhtäsuuri kuin polynukleotidin pituus ennen sen pilkkomista. Alkuperäisen vyöhykkeen sisältävien kontaminanttien, joihin restriktioentsyymi ei vaikuta, voidaan odottaa liikkuvan alkuperäiseen asemaansa. Entsyymin yhden tai useamman tunnistamiskohdan sisältävien kontaminanttien voidaan odottaa muodostavan kaksi tai useampia alikappaleita. Koska tunnistamiskohtien jakauman uskotaan olevan olennaisesti satunnainen, niin se todennäköisyys, että myöskin jokin kontaminantti tuottaa sellaisia alikappaleita, jotka ovat saman kokoisia kuin toivotun ketjun kappaleen alikappaleet, on erittäin alhainen. Radioaktiivisesti merkityn polynukleotidin muodostamassa vyöhykkeessä läsnäolevan materiaalin määrä voidaan määrittää mittaamalla kvantitatiivisesti kussakin vyöhykkeessä läsnäolevan radioaktiivisuuden määrä, tai millä tahansa muulla asianmukaisella menetelmällä. Kvantitatiivinen mitta toivotusta ketjusta saatujen kappaleiden puhtaudesta voidaan saada vertaamalla toivotun ketjun alikappaleita vastaavissa vyöhykkeissä läsnäolevia suhteellisia ainemääriä koko ainemäärään.

Edellä esitetyn erotusvaiheen jälkeen, tai minkä tahansa muun, toivotun geenin eristävän menetelmän jälkeen, sen ketju voidaan palauttaa ennalleen. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää entsyymiä DNA-ligaasi, joka katalysoi DNA-kappaleiden liittymistä toi-

siinsa päästä päähän. Toivotun ketjun alikappaleita edustavat, geelielektroforeesilla saadut vyöhykkeet voidaan eluoida toisistaan erillään, ja ne yhdistetään asianmukaisissa olosuhteissa DNA-ligaasin läsnäollessa. Katso julkaisu Sgaramella, V., Van de Sande, J.H., ja Khorana, H.G., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 67, 1468 (1970). Kun toisiinsa liitettävien ketjujen päät eivät ole epäreaktiivisia ("blunt"), niin E. coli-bakteerista saatua ligaasia voidaan käyttää Modrich, P., ja Lehman, I.R., J. Biol. Chem., 245, 3626 (1970).

Tehokkuutta alkuperäisen ketjun palauttamisessa restriktioendonukleaaseilla toteutetussa käsittelyssä muodostuneita alikappaleita käyttäen voidaan parantaa huomattavasti, mikäli käytetään sellaista menetelmää, jolla estetään epäasianmukaisten ketjujen muodostuminen. Tämä epätoivottu tulos estetään siten, että toivotun ketjun pituudeltaan homogeenista cDNA-kappaletta käsitellään aineella, joka kykenee poistamaan 5'-pään fosfaattiryhmät cDNA-molekyylistä ennen homogeenisen cDNA:n pilkkomista restriktioendonukleaasilla. Edullinen entsyymi on alkalinen fosfataasi. 5'-päiden fosfaattiryhmät ovat rakenteellinen edellytys myöhemmin pilkottujen alikappaleiden ennalleenpalauttamisessa käytetyn DNA-ligaasin liittävälle vaikutukselle. Täten, päitä, joista puuttuu 5'-terminaalinen fosfaatti, ei voida liittää toisiinsa kovalenttisesti. DNA-alikappaleet voidaan liittää ainoastaan niistä päistään, jotka käsittävät 5'-fosfaatin, joka syntyi restriktioendonukleaasilla toteutetussa, eristettyyn DNA-kappaleeseen kohdistuvassa pilkkomisessa.

Suurin osa cDNA-kopioista on saatu, edellä kuvatuissa olosuhteissa, mRNA-mallin 5'-pään sisältävän mRNA-alueen perusteella siten, että tähän sama malli varustetaan spesifisesti primeerinä toimivalla kappaleella, joka saatiin restriktioendonukleaasilla pilkkomalla. Tällä tavalla edellä kuvattua menetelmää voidaan käyttää sekä toivottua proteiinia vastaavan spesifisen nukleotidiketjun kappaleiden saamiseksi että mielenkiinnon kohteena olevaa proteiinia koodaavan, koko nukleotidiketjun saamiseksi. Eristetyn

cDNA:n päihin voidaan liittää kaksijuosteisia, kemiallisesti syntetoituja oligonukleotidikytkijöitä, jotka sisältävät restriktioendonukleaasin tunnistamiskohdan, jolloin helpotetaan geeniosan myöhemmin toteutettavaa entsymaattista poistamista vektori-DNA:sta. Katso julkaisu Scheller, R.H., et al. Science 196, 177 (2977). Vektori-DNA muunnetaan jatkuvasta silmukasta lineaariseen muotoon käsittelemällä sitä asianmukaisella restriktioendonukleaasilla. Tällöin muodostuneita päitä käsitellään alkalisella fosfataasilla 5'-pään fosfaattiryhmien poistamiseksi, joten tämä vektori-DNA ei voi muodostaa uudestaan jatkuvaa silmukkaa DNA-ligaasilla toteutetussa reaktiossa, mikäli siihen ei ensin liitetä osaa apoaequoriini-DNA:sta. cDNA, johon on liitetty kytkijöinä toimivia oligonukleotidejä, sekä käsitelty vektori-DNA sekoitetaan yhdessä DNA-ligaasientsyymiin cDNA:n liittämiseksi tähän vektori-DNA:han, jolloin muodostuu yhdistelmä-DNA-vektorin jatkuva silmukka, joka sisältää cDNA:n. Käytettäessä plasmidivektoria suljettu silmukka on tavallisesti ainoa muoto, jolla voidaan transformoida bakteeri. Alalla yleisesti, ja ohessa käytetyllä käsitteellä "transformaatio" tarkoitetaan prosessia, jossa mikro-organismin omaan geneettiseen järjestelmään yhdistyy solun ulkopuolista DNA:ta. Täten bakteeriin voidaan istuttaa suljetun silmukan muotoista plasmidi-DNA:ta sopivissa ympäristön olosuhteissa. Istutettu, suljetun silmukan muotoinen plasmidi replikoituu (monistuu) transformoidussa solussa, ja nämä replikoituneet kopiot jakautuvat jälkeläissoluihin solun jakaantuessa. Tuloksena saadaan uusi solusukupolvi, joka sisältää plasmidin sekä sen geneettiset määräävät tekijät. Tällä tavalla plasmidin avulla toteutetun transformaation, jossa plasmidin geenit säilyvät solusukupolvessa plasmidin replikoitumisen seurauksena, esiintymistiheys on suuri, mikäli transformoiva plasmidi-DNA on suljetun silmukan muodossa, ja transformaatiota ei tapahdu lainkaan, tai se tapahtuu harvoin, mikäli käytetään lineaarista plasmidi-DNA:ta. Sen jälkeen, kun yhdistelmä-DNA-vektori on saatu valmistetuksi, sopivan mikro-organismin transformointi on vaivaton prosessi, ja apoaequoriinin geenin sisältävät uudet mikro-organismikannat on helposti eristettävissä asianmukaisia valikointimenetelmiä käyttäen, kuten alalla on tunnettua.

Yhteenvetona esitettäköön, että geneettistä informaatiota voidaan saada Aequorea-meduusasta, se muunnetaan cDNA:ksi, istutetaan vektoriin, jota käytetään mikro-organismin transformoimiseen, ja apoaequoriinia ilmentyy seuraavasti:

1. Poly(A^+)RNA eristetään Aequorea-meduusasta.

2. Yksijuosteista cDNA:ta syntetoidaan in vitro, ja tämän jälkeen kaksijuosteista cDNA:ta syntetoidaan in vitro käänteiskopioija-entsyymiä käyttäen.

3. Yksijuosteinen alue pilkotaan S1-nukleaasilla.

4. Kaksijuosteinen cDNA fraktioidaan koon perusteella geelisuodatuksen avulla.

5. cDNA hännitetään terminaalitransferaasia ja dCTP:tä käyttäen.

6. Plasmidi pBR322 pilkotaan entsyymillä PstI, jonka jälkeen tämä lineaarinen DNA hännitetään terminaalitransferaasilla ja dGTP:llä.

7. dC-hännitetty cDNA-kappale ja dG-hännitetty plasmidi pBR322 liitetään toisiinsa.

8. E. coli-bakteeri SK1592 transformoidaan. Tetrasykliinille vastustuskykyiset pesäkkeet valikoidaan.

9. Transformantit seulotaan ampisilliinille herkkyyden perusteella. tet^R amp^S-pesäkkeet sisältävät yhdistelmä-DNA-plasmideja. Niitä säilytetään -80°C:n lämpötilassa.

10. Oligonukleotidien seoksesta muodostuva koetin merkitään radioaktiivisesti (määrätystä aminohappoketjusta johdettua ketjua käyttäen).

11. Aequorea-meduusan cDNA-pankin yksilöitä kasvatetaan nitroselluloosasuodattimilla. Pesäkkeet hajotetaan, ja DNA kiinnitetään näille suodattimille.

12. ^{32}P-isotoopilla merkitty oligonukleotidien seos hybridisoidaan nitroselluloosasuodattimille. ^{32}P-koetin hybridisoituu aequoriinin cDNA-ketjun sisältävistä E. coli-yhdistelmistä peräisin olevaan plasmidi-DNA:han.

13. Liiallinen ^{32}P-koetin huuhdotaan pois suodattimilta.

14. Röntgensädefilmi valotetaan näillä suodattimilla.

15. Plasmidi-DNA otetaan talteen Aequorea-meduusan cDNA-pankista tunnistetuista yhdistelmistä.

16. ^{32}P-merkitty oligonukleotidi hybridisoidaan plasmidi-DNA:han (Southern'in täplä) hybridisoitumisen varmistamiseksi.

17. Näiden yhdistelmien osoitetaan sisältävän aequoriinin DNA-ketju valmistamalla uutteet EDTA-pitoisiin puskureihin pH 7,2. Ilmentynyt apoproteiini saatetaan varautuneeseen tilaan lisäämällä siihen coelenteraatti-lusiferiinia ja β-merkaptoetanolia, ja inkuboimalla tätä seosta yön yli 4°C:n lämpötilassa. Sininen valonvälähdys emittoituu Ca^{2+}-ioneja lisättäessä niistä näytteistä, jotka ilmentävät aequoriinin apoproteiinia.

Vaikka edellä esitetyillä peräkkäisillä vaiheilla voidaankin helposti eristää toivottu geeni, ja tätä toivottua geeniä voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-vektoreissa, kun nämä vaiheet toteutetaan yhdistelmä-DNA-tekniikan yleisen tietämyksen mukaisesti, niin kuitenkin myös muita, samaan tulokseen johtavia menetelmiä tunnetaan, ja niitä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisten yhdistelmä-DNA-vektoreiden valmistamiseen.

Apoaequoriinin ilmentymistä voidaan parantaa sisällyttämällä transformoituun isäntään apoaequoriinin geenin useita kopioita siten, että valikoidaan sellainen vektori, jonka tiedetään lisääntyvän isännässä, jolloin muodostuu suuria määriä ulkopuolista, istutettua DNA:ta (kuten pUC8, ptacl2, tai pIN-III-ompA1, 2 tai 3) vastaavaa proteiinia, tai käyttämällä mitä tahansa tunnettua menetelmää peptidin ilmentymisen parantamiseksi.

Joka tapauksessa apoaequoriini ilmentyy, kun tämä DNA-ketju istutetaan toiminnallisesti vektoriin. Käsitteellä "toiminnallinen istuttaminen" tarkoitetaan asianmukaista lukukehystä sekä suuntautumista, mikä on selvää alan asiantuntijalle. Apoaequoriinin geeni istutetaan tyypillisesti alavirran puolelle promoottorin suhteen, ja sitä seuraa pysäytyskodoni, vaikka toivottaessa voidaankin käyttää hybridiproteiinin muodostumista, joka hybridiproteiini pilkotaan myöhemmin.

Edellä esitettyjen yleismenetelmien, joita voidaan käyttää yhdistelmä-DNA-molekyylien ja transformoitujen yksisoluisten organismien valmistamiseksi tämän keksinnön suoritusmuotojen mukaisesti, lisäksi myös muita tunnettuja tekniikoita ja niiden muunnelmia voidaan käyttää tämän keksinnön suoritusmuotojen totetuttamiseen. Erityisesti yhdistelmä-DNA-tekniikkaan liittyvät menetelmät ovat viime aikoina kehittyneet räjähdyksenomaisesti, ja niiden määrä on lisääntynyt. Monissa US-patenttijulkaisuissa esitetään plasmideja, geneettisesti muunnettuja mikro-organismeja sekä yhdistelmä-DNA-tekniikkaan soveltuvia menetelmiä, joita voidaan käyttää tämän keksinnön suoritusmuotojen toteuttamiseksi. Esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 4 273 875 esitetään plasmidi ja menetelmä sen eristämiseksi. US-patenttijulkaisussa 4 304 863 esitetään menetelmä bakteerien tuottamiseksi yhdistelmä-DNA-tekniikan keinoin, jossa menetelmässä hybridiplasmidi muodostetaan, ja sitä käytetään isäntänä toimivan bakteerin transformointiin. US-patenttijulkaisussa 4 362 867 esitetään yhdistelmä-cDNA:n muodostamismenetelmiä sekä näillä menetelmillä tuotettuja hybridinukleotidejä, joita voidaan käyttää kloonausprosesseissa. US-patenttijulkaisussa 4 403 036 esitetään geneettiset reagenssit DNA-kappaleiden lukuisia kopioita sisältävien plasmidien tuottamiseksi. US-patenttijulkaisussa 4 363 877 esitetään yhdistelmä-DNA-tekniikassa käyttökelpoisia siirtovektoreita. US-patenttijulkaisussa 4 356 270 esitetään yhdistelmä-DNA:n kloonausväline, ja tämä julkaisu on erityisen käyttökelpoinen sellaisille henkilöille, joilla on vain vähän kokemusta yhdistelmä-DNA-tekniikan alalta, sillä siinä määritellään yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettyjä käsitteitä sekä esitetään alalla käytettyjä perusprosesseja. US-patenttijulkaisussa 4 336 336 esitetään yhteensulautunut geeni, sekä menetelmä sen valmistamiseksi. US-patenttijulkaisussa 4 349 629 esitetään plasmidivektoreita, sekä niiden valmistaminen ja käyttö. US-patenttijulkaisussa 4 332 901 esitetään yhdistelmä-DNA-tekniikassa käyttökelpoinen kloonaava vektori. Vaikka jotkut näistä patenttijulkaisuista kohdistuvatkin sellaisen erityisen geenituotteen valmistamiseen, joka geenituote ei kuulu tämän keksinnön puitteisiin, niin kuitenkin niissä esitettyjä menetelmiä voidaan muuntaa helpos-

ti tämän keksinnön suoritusmuotoihin sopiviksi, jotka suoritusmuodot yhdistelmä-DNA-tekniikan asiantuntijat kuvaavat tässä julkaisussa.

Kaikki nämä patenttijulkaisut, sekä myöskin kaikki muut tässä julkaisussa mainitut patenttijulkaisut ja muut julkaisut osoittavat tämän alan, johon tämä keksintö kohdistuu, asiantuntijoiden tietämyksen tason, joiden julkaisujen sisältöön viitataan.

Tämän keksinnön seuraukset ovat merkitykselliset, sillä sen avulla käyttöön saadaan rajoittamattomia määriä apoaequoriinia, jota voidaan käyttää luminesenssiin perustuvien immunokokeiden kehittämiseen tai minkä tahansa muuntyyppisissä kokeissa, joissa aequoriinia käytetään merkitsimenä. Apoaequoriinin eristetyn cDNA:n siirtäminen muihin ilmentäviin vektoreihin tuottaa muodosteita, jotka parantavat apoaequoriini-polypeptidin ilmentymistä E. coli-bakteerissa, tai jotka ilmentävät apoaequoriinia muissa isännissä. Lisäksi käytettäessä apoaequoriinin cDNA:ta tai sen kappaletta hybridisaation koettimena, rakenteellisesti samankaltaisia, muista bioluminesoivista coelenteraateista ja muista organismeista, kuten kalmareista (nilviäiset), kaloista (Pisces) ja äyriäisistä, löydettyjä geenejä voidaan helposti kloonata. Näihin geeneihin kuuluvat ne, jotka koodaavat organismien Renilla, Stylatula, Ptilosarcus, Cavernularia ja Acanthoptilum lusiferaasia, niiden geenien lisäksi, jotka geenit koodaavat organismeista Hydrozoan Obelia ja ctenophores Mnemiopsos ja Beroe löydettyjä fotoproteiineja.

Erityisen tarkastelun kohteena on näistä ja niiden kaltaisista organismeista peräisin olevien geenien eristäminen, jotka geenit ilmentävät fotoproteiineja ohessa esitettyihin pääasiallisiin ja vaihteleviin nukleotidiketjuihin perustuvia, oligonukleotidistä muodostuvia koettimia käyttäen. Tällaiset koettimet voivat olla huomattavasti lyhyempiä kuin koko ketju, mutta niiden tulisi olla vähintään 10, mielellään vähintään 14 nukleotidin pituisia. Pitemmätkin oligonukleotidit ovat käyttökelpoisia, aina koko geenin täyteen pituuteen saakka. Sekä RNA- että DNA-koettimia voidaan käyttää.

Näitä koettimia käytettäessä ne on tyypillisesti merkitty ilmaistavissa olevalla tavalla (eli ^{32}P-isotoopilla, ^{3}H-isotoopilla, biotiinilla tai avidiinilla) ja niitä inkuboidaan siitä organismista, josta geeniä etsitään, peräisin olevan yksijuosteisen DNA:n tai RNA:n kanssa. Hybridisaatio ilmaistaan merkkiaineen avulla, sen jälkeen, kun yksijuosteinen ja kaksijuosteinen (hybridisoitunut) DNA (tai DNA/RNA) on erotettu (tavallisesti nitroselluloosapaperia käyttäen). Hybridisaatiotekniikat, jotka soveltuvat käytettäviksi oligonukleotidien kanssa, ovat alalla hyvin tunnettuja.

Vaikka koettimia tavallisesti käytetäänkin yhdessä ilmaistavissa olevan merkkiaineen kanssa, jonka merkkiaineen avulla tunnistaminen on helppoa, niin kuitenkin merkitsemättömät oligonukleotidit ovat myös käyttökelpoisia, sekä merkittyjen koettimien prekursoreina, että sellaisissa menetelmissä, joilla kaksijuosteinen DNA (tai DNA/RNA) on suoraan ilmaistavissa. Näin ollen käsite "oligonukleotidin muodostama koetin" viittaa sekä merkittyyn että merkitsemättömään muotoon.

Erityisen edullisia ovat ne oligonukleotidit, jotka on saatu ohessa kuvattujen peptidiketjujen aminohappoja 40-110 koodaavasta alueesta, sillä nämä aminohapot liittyvät lusiferiinin sitoutumiseen.

Coelenteraatti-lusiferiinia on löydetty kaikista taulukossa 5 luetelluista organismeista, ja se sitoutuu kaikista näistä organismeista peräisin oleviin fotoproteiineihin, ja oletetaan, että ohessa kuvatut koettimet ovat käyttökelpoisia koettimia eristettäessä fotoproteiinin geenejä kaikista näistä lajeista.

Taulukko 5

Coelenteraatti-tyyppisen lusiferiinin jakautuminen

1. Cnidaria (coelenteraatit)

A. Anthozoa

Renilla (kolme lajia)[a]

Stylatula

Ptilosarcus

Cavernularia[b]

Acanthoptilum

B. Hydrozoa

Aequorea[b]

Obelia

2. Ctenophora

Mnemiopsis

Beroe

3. Mollusca (nilviäiset)

Watasenia (kalmari)[a]

4. Pisces (kalat)

Neoscopelus microchir[a]

Diaphus

5. Crustacea (äyriäiset)

A. Decapods (simpukka)

Acanthephyra eximia

Acanthephyria purpurea

Oplophorus spinosus[a]

Heterocarpus grimaldii

Heterocarpus laevigatus[a]

Systellaspis cristata

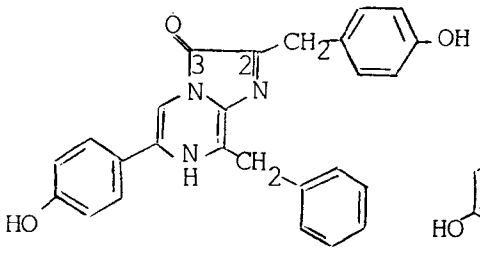
Systellaspis debilis

B. Mysidacea (opossumi-simpukka)

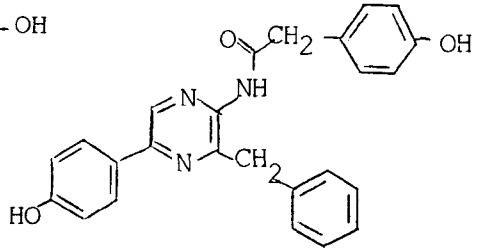
Gnathophausia ingens

[a]Rakenteellisesti identtinen (I):n kanssa, perustuen uutettujen lusiferiinien kemiallisiin ja fysikaalisiin määrityksiin. Kaikki muut määritykset perustuvat lusiferiini-lusiferaasin ristikkäisreaktioihin sekä kineettisiin ja bioluminesenssin emissiospektrien vertailuihin.

[b]Lisätodistusaineistoa siitä, että tämä lusiferiini on identtinen kaavan (I) kanssa, on saatu eristetyn emittoijan kemiallisista ja fysikaalisista määrityksistä, joka eristetty emittoija on osoitettu identtiseksi kaavan (II) kanssa.



coelenteraatti-tyyppinen lusiferiini (I)



coelenteraatti-tyyppinen oksilusiferiini (II)

Täten tämä keksintö on kuvattu yleisesti, ja se on edelleen helpommin ymmärrettävissä seuraavien esimerkkien avulla, joiden esimerkkien tarkoitus on ainoastaan havainnollistaa tätä keksintöä, ja ne eivät pyri rajoittamaan keksintöä, ellei niin mainita.

Esimerkki 1

Luonnollisen aequoriinin puhdistaminen

Aequoriini puhdistettiin Blinks'in et al. menetelmällä /Blinks, J.R., P.H. Mattingly, B.R. Jewell, M. van Leeuwen G.C. Harrer ja D.G. Allen, Methods Enzymol. 57, 292-328 (1978)/, paitsi että toisessa geelisuodatusvaiheessa käytettiin Sephadex G-75-geeliä (erittäin hieno). Aequoriinin puhdistaminen toteutettiin seuraavasti:

1. Aequorea-organismeja kerättiin alueelta Friday Harbor, Washington, ja suuaukkoa ympäröivä kudos (fotosyytit) otettiin talteen.

2. Proteiinit uutettiin näistä fotosyyteistä EDTA-puskurissa toteutetun hypotonisen lysoinnin avulla.

3. Fotosyyttiuute jaettiin fraktioihin ammoniumsulfaatilla (0-75 %).

4. $(NH_4)_2SO_4$-saostuma sentrifugoitiin; näytteitä säilytettiin -70°C:n lämpötilassa keräyskohteesta kuljetuksen aikana, ja sen jälkeen.

5. Geelisuodatus Sephadex G-50-geelillä (hieno).

6. Ioninvaihto QAE-Sephadex-geelillä siten, että eluutiossa käytettiin pH-porrasta ja suolagradienttia.

7. Geelisuodatus Sephadex G-75-geelillä (erittäin hieno).

8. Ioninvaihto DEAE-Sephadex-geelillä siten, että eluutiossa käytettiin pH-porrasta ja suolagradienttia.

9. Puhdas aequoriini lyofilisoitiin (EDTA-puskurista) ja sitä säilytetään -80°C:n lämpötilassa.

Vaiheet 1-4 suoritettiin keräyspisteessä, Friday Harbor. Organismien keräämistä ja suuaukkoa ympäröivän kudoksen talteenottamista lukuunottamatta kaikki vaiheet toteutettiin 0-4°C:n lämpötilassa. Vaiheesta 4 saatua lopullista tuotetta säilytettiin hiilihappojäässä, 250 millilitran sentrifugipulloissa. Materiaali kuljetettiin tässä muodossa.

Aequoriinin ja vihreän fluoresoivan proteiinin (GFP) puhdistaminen toteutettiin Athens-kaupungissa, Georgia (vaiheet 5-9). Kaikki nämä vaiheet suoritettiin 0-4°C:n lämpötilassa. Aequoriinia sisältäviä fraktioita säilytettiin -80°C:n lämpötilassa vaiheiden välillä; aequoriini vaikuttaa olevan stabiilisitä pakastettaessa ja sulatettaessa, proteiinin pitoisuudesta riippumatta.

Vaihe 5. Geelisuodatus Sephadex G-50-geelillä (hieno). Kolonnin ulottuvuudet: 5,8 cm x 97 cm; 2563 ml. Kolonnia eluoitiin 10 mM EDTA-liuoksella, pH 5,5 (EDTA-liuosten valmistamiseen käytettiin dinatriumsuolaa), virtausnopeudella 75 ml/h. GFP ja aequoriini eluoituivat yhdessä tästä kolonnista. 65-75 % aequoriinin aktiivisuudesta yhdistettiin myöhempää puhdistamista varten. Sivufraktiot yhdistettiin myös, ja niitä säilytetään myöhempää puhdistamista varten. Aequoriinin saanto tässä vaiheessa vaihteli alueella 50-80 %; tavallisesti saanto oli 65-75 %. Kolonnin kapasiteetti oli suurin piirtein 1000 mg (Bradford) 75 millilitrassa; tavallisesti kolonnia kuormitettiin pienemmillä tilavuuksilla, mikäli vain mahodllista.

Vaihe 6. Ioninvaihto QAE-Sephadex-geelillä. Kolonnin ulottuvuudet: halkaisija 5 cm. Tässä vaiheessa käytettiin 15 grammaa kuivaa Sephadex-geeliä; petitilavuus kolonnissa vaihteli kromatografian aikana, puskurin ionivahvuuden ja koostumuksen mukaan.

Yleisesti ottaen tämän kolonnin läpi johdettiin 6-10 ensimmäisestä G-50-vaiheesta saatu, yhdistetty materiaali. Näin meneteltäessä kokonaissaanto ja tehokkuus paranivat. Tämä vaihe

toteutettiin täsmälleen Blinks'in et al. (1978) esittämällä tavalla. Sen jälkeen, kun näyte oli kaadettu kolonniin, GFP eluoitiin selektiivisesti pH-vaiheessa (5 mM Na-asetaattia, 5 mM EDTA, pH 4,75). Tämän jälkeen aequoriini eluoitiin lineaarisella NaCl-gradientilla 10 mM EDTA-puskurissa, pH 5,5 (kokonaistilavuus 500 ml). GFP tehtiin 10 mM Tris-puskurin suhteen, ja pH nostettiin arvoon 8,0 -80°C:n lämpötilassa säilytystä varten, kunnes sitä puhdistettaisiin edelleen. Yhdistetty aequoriini tiivistettiin ultrasuodattamalla (Amicon YM-10-kalvo) seuraavaa vaihetta varten. Aequoriinin saanto: 80 %.

Vaihe 7: Geelisuodatus Sephadex G-75-geelillä (erittäin hieno). Kolonnin ulottuvuudet; 2,8 cm x 150 cm; 924 ml. Kolonnia eluoitiin 10 mM EDTA-puskurilla, pH 5,5 virtausnopeudella 10 ml/h. Aequoriinin saanto: 60-80 %.

Vaihe 8: Ioninvaihto DEAE-Sephadex-geelillä.
Vaiheessa 7 saatu, yhdistetty aequoriini johdettiin suoraan tähän kolonniin, ja tätä kolonnia eluoitiin täsmälleen QAE-Sephadex-kolonnin tavoin. Aequoriinin saanto oli tavallisesti 75-80 %. Tämä vaihe 1 on tarpeeton useimmissa aequoriinin valmistuksissa. Vaiheesta 7 saatu materiaali on tavallisesti puhdasta, SDS-PAGE-määrityksen perusteella, joka määritys toteutetaan 12 % akryyliamidilla.

Vaihe 9: Aequoriini lyofilisoitiin, ja saanto oli tällöin yli 95 %, edellyttäen, että läsnä oli jonkin verran EDTA-puskuria. Saannot vaihtelivat alueella 0-95 % EDTA:n puuttuessa (katso Blinks et al., 1978).

Esimerkki 2

Aequoriinin ketjun määrittämisessä käytetty sekvenssointimenetelmä

Aminohappoketjun analysointi (sekvenssointi) suoritettiin automaattisella Edman Degradation-laitteella (Edman ja Begg, 1967). Proteiinin tai peptidin suhteellisten suurien määrien tapauksessa (10 nanomoolia tai enemmän) ketjun analyysi toteutettiin Beckman-ketjuanalysaattorilla, malli 890 B (Duke University), jota oli

uudistettu Bhown'in et al. julkaisussa (1980) esitetysti ja jossa käytettiin 0,55 M Quadrol-ohjelmaa polybreenin kanssa (Tarr et al., 1978). Kahden peptidin, M3 ja M5, jotka olivat pieniä tai jotka vaikuttivat huuhtoutuvan ulos kammiosta Quadrol-menetelmässä, ketjut määritettiin ohjelmalla, joka oli sovitettu dimetyyli-allyyliamiinipuskurille ja polybreenille, kuten julkaisussa Klapper et al., (1978) esitetään. Aminohappojen fenyylitio-hydantoiini (PTH-)-johdannaiset tunnistettiin HPLC-kromatografisesti käänteisfaasia käyttäen, DuPont Zorbay ODS-kolonnilla, olennaisesti julkaisussa Hunkapiller ja Hood (1978) esitetyllä tavalla. Niiden peptidien, joita oli käytettävissä 2-10 nanomoolia, ketjut analysoitiin Beckman-ketjuanalysaattorilla, malli 890 C (Washington'in Yliopisto), ohjelmalla, jossa käytettiin 0,1 M Quadrol'ia (Brauer et al., 1975) ja polybreeniä. PTH-aminohapot tunnistettiin Ericsson'in et al. julkaisussa (1977) esitetyllä HPLC-järjestelmällä käänteisfaasia käyttäen. Niissä tapauksissa, joissa peptidiä oli käytettävänä alle 1,5 nanomoolia, ketjun analyysiin käytettiin sovellettua Biosystems-analysaattoria, malli 470 A, joka käytti hyväkseen kaasufaasia (Washington'in Yliopisto; Hunkapiller et al., 1983). Tästä kaasufaasia hyväksikäyttävästä instrumentista saadut PTH-aminohapot tunnistettiin IBM Syanokolonnilla, julkaisussa Hunkapiller ja Hood (1983) esitetyllä tavalla.

Kirjallisuutta:

Edman, P. ja Begg, G. Eur. J. Biochem. 1, 80-91 (1967).

Bhown, A.G., Cornelius, T.U., Mole, J.E., Lynn, J.D., Tidwell, W. A. ja Bennett, J.C. Anal. Biochem. 102, 35-38 (1980).

Tarr, G.E., Beechner, J.F., Bell, M. ja McKean, D. J. Anal. Biochem. 84, 622-627 (1978).

Klapper, D.G., Wilde, C.E., III ja Capra, J.D. Anal. Biochem. 85, 126-131 (1978).

Hunkapiller, M. W. ja Hood, L. E. Biochemistry 17, 2124-2133 (1978).

Brauer, A.W., Margolies, M.N. ja Haber, E. Biochemistry 13, 3029-3035 (1975).

Ericsson, L.H., Wade, R.D., Gagnon, J., McDonald, R. R ja Walsh, K.A. teoksessa Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis (Previero, A. ja ColeHi-Previero, M.A., toim.) sivut 137-142, Elsevier/North Holland, Amsterdam (1977).

Hunkapiller, M.W., Hewick, R.M., Dreyer, W.J. ja Hood, L.E. Methods Enzymol. 91, 399-413 (1983).

Hunkapiller, M.W. ja Hood, L.E. Methods Enzymol. 91, 486-493 (1983).

Esimerkki 3

Homogeenista apoaequoriinia koodaavan cDNA:n kloonaaminen ja ilmentyminen

Materiaalit ja menetelmät

Restriktioentsyymit hankittiin yhtiöistä Bethesda Research Laboratories, New England Bio Labs sekä International Biotechnologies, Inc., ja niitä käytettiin entsyymien toimittajien esittämien olosuhteiden mukaisesti. RNaasi ja käänteiskopioija-entsyymi saatiin yhtiöistä Biotech ja Life Sciences, vastaavasti. Terminaalitransferaasi hankittiin yhtiöstä PL Biochemicals. Coelenteraatti-lusiferiinia syntetoitiin menetelmällä, joka esitetään julkaisuissa /Hori, K. Anderson, J.M., Ward, W.W. ja Cormier, M.J. Biochemistry 14, 2371-2376 (1975); Hori, K. Charbonneau, H., Hart, R.C., ja Cormier, M.J., Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA 74, 4285-4287 (1977); Inouye, S., Sugiura, H., Kakoi, H., Hasizuma, K., Goto, T. ja Iio, H., Chem. Lett., 141-144 (1975)/ ja sitä säilytettiin lyofilisoituna jauheena käyttöhetkeen saakka.

RNA:n eristäminen ja in vitro luenta

Aequorea victoria-meduusoja saatiin Washington'in Yliopiston meribiologian laboratoriosta University of Washington Marine Biology Laboratory, Friday Harbor, Washington. Meduusan suuaukon ympäriltä leikattiin rengasmaisia paloja, jotka jäädytettiin välittömästi hiilihappojäästä ja metanolista muodostuvassa hauteessa. Näitä kudosnäytteitä pidettiin -70°C:n lämpötilassa käyttöhetkeen saakka.

RNA eristettiin Kim'in et al. menetelmällä /Kim, Y-J., Shuman, J., Sette K. ja Przybyla, A., J. Cell. Biol. 96, 393-400 (1983)/, ja poly(A^+)RNA valmistettiin aikaisemmin kuvattua tekniikkaa käyttäen /Aviv, H. ja Leder, P., PNAS 69, 1408-1412 (1972)/.

Poly(A^+)RNA (1 /ug) ja poly(A^-)RNA (20 /ug) luettiin käyttämällä kaniinin retikulosyytin in vitro luentajärjestelmää /Pelham, H.R.B., ja Jackson, R.J., Eur. J. Biochem., 247 (1976); Merrick, W.C., teoksessa Methods in Enz. 101(c), 606-615 (1983)/. Tästä lysaatista poistettiin sen endogeeninen mRNA mikrokokeista saadulla nukleaasilla. Kutakin luentavaihetta (kokonaistilavuus 62 /ul) inkuboitiin 90 minuuttia 25°C:n lämpötilassa ^{35}S-metioniinin (38 /uCi) läsnäollessa. Kustakin luentanäytteestä otettiin kaksi /ul elektroforeettista analyysiä varten. Apoaequoriini immunosaostettiin lisäämällä 50 mikrolitraan kutakin luentaseosta antiaequoriinia (2 /ul) ja Staph. auerus-soluja. Useiden huuhtelujen jälkeen vasta-aineen ja apoaequoriinin muodostama kompleksi hajoitettiin lämmittämällä sitä SDS-liuoksen läsnäollessa. Luennan läpikäyneet tuotteet analysoitiin SDS-polyakryyliamidi (13 %)-geelillä. Elektroforeesin jälkeen geeli värjättiin Coomassie R-250-aineella proteiinistandardien tunnistamiseksi, jonka jälkeen geeli kyllästettiin PPO:lla DMSO-liuoksessa. Fluorografia suoritettiin -70°C:n lämpötilassa.

Yhdistelmä-DNA-tekniikat

Kaksijuosteinen cDNA syntetoitiin Aequorea-meduusan koko poly(A^+) RNA:sta menetelmällä, joka esitetään julkaisussa /Wickens, M.P., Buell, G.N. ja Schimke, R.T., J. Biol. Chem. 253, 2483-2495 (1978)/. Homopolymeeristen dC-häntien lisäämisen jälkeen kaksijuosteinen cDNA liitettiin dG-hännitettyyn, PstI-pilkottuun plasmidiin pBR322 /Villa-Komaroff, L., Efstradiadis, A., Broome, S., Lomedico, P., Tizard, R., Naber, S.P., Chick, W.L. ja Gilbert, PNAS, 75, 3727-3731 (1978)/, ja sillä transformoitiin E.coli-kanta SK1592. Tetrasykliinille vastustuskykyiset, ampisilliinille herkät pesäkkeet siirrettiin mikrotiitterilevyille, ja pakastettiin -70°C:n lämpötilassa.

Aequorea-meduusan cDNA-kirjasto seulottiin aequoriinin cDNA:n löytämiseksi synteettistä oligonukleotidiseosta käyttäen. Tämä oligonukleotidiseos saatiin tutkijoilta Charles Cantor ja Carlos Argarana (Columbia Yliopisto). Sen jälkeen, kun nämä 17-meerit oli puhdistettu polyakryyliamidilla elektroforeettisesti /Maniatis, T. ja Efstratidis, A., Meth. in. Enz. 65, 299-305 (1980)/, ne merkittiin radioaktiivisesti käyttäen polynukleotidikinaasia ja γ-^{32}P-ATP:tä /Maxam, A.M., ja Gilbert, W., Meth. in Enz. 65, 499-559 (1980)/. Sitoutumaton ^{32}P-isotooppi poistettiin ioninvaihtokromatografisesti DEAE-selluloosaa käyttäen.

Aequorea-meduusan cDNA-pankki seulottiin seuraavasti: E. coli-yhdistelmät siirrettiin jäisistä viljelmistä nitroselluloosasuodattimille, (7 x 11 cm), jotka oli sijoitettu Luria-agaria sisältäville maljoille. Pesäkkeitä kasvatettiin 12 tuntia 37°C:n lämpötilassa, ne hajotettiin, jonka jälkeen DNA kiinnitettiin julkaisussa /Taub, F. ja Thompson, E.B., Anal. Biochem. 126, 222-230 (1982)/ esitetyllä tavalla Whatman 541-paperia käyttäen. Suodattimia kuumennettiin vakuumissa 2 tuntia, sen jälkeen, kun ne oli ensin kuivattu ilmassa.

Suodattimia inkuboitiin 55°C:n lämpötilassa 12-20 tuntia, käyttäen suodatinta kohden 3 ml esihybridisointiliuosta (10X NET, 0,1 % SDS, 3X Denhart'in liuos), sen jälkeen, kun ne oli ensin kasteltu 1X SSC-liuoksella. Liuos kaadettiin ulos hybridisaatiopussista ja se korvattiin suodatinta kohden 1 millilitralla hybridisointiliuosta (10X NET, 0,1 % SDS, 3X Denhardt'in liuos, 1 x 10^{6} tuiketta minuutissa ^{32}P-isotoopilla merkittyjä 17-meerejä suodatinta kohden). Hybridisaation annettiin edetä 24 tunnin ajan 37°C:n lämpötilassa, minkä jälkeen suodattimia pestiin neljästi 10X SSC-liuoksella 4°C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan. Suodattimet kuivattiin ilmassa, jonka jälkeen ne kiedottiin muoviin. Näillä suodattimilla valotettiin Kodak XAR-5-filmiä -70°C:n lämpötilassa, käyttäen yhtiön DuPont voimakkuutta lisäävää Cronex-varjostinta.

E. coli-bakteereiden kasvattaminen ja uuttamismenetelmät

E. coli-bakteereita SK1592, jotka sisälsivät yhdistelmän pAEQ1-pAEQ6, kasvatettiin yön yli 25 millilitrassa Luria-ravintoalustaa 37°C:n lämpötilassa. Solut sentrifugoitiin, jonka jälkeen ne suspendoitiin uudestaan 5 millilitraan 10 % sakkaroosia, joka oli 50 mM Tris-puskurin, pH 8, suhteen. Solut hajotettiin lisäämällä niihin seuraavia: 7,2 µl 0,1 M fenyylimetyylisulfonyylifluoridia, 312 µl 0,2 M EDTA, 10 mg lysotsyymiä ja 10 µl RNaasia A pitoisuutena 10 mg/ml. Sen jälkeen, kun tätä seosta oli pidetty 45 minuuttia jäissä, sitä sentrifugoitiin nopeudella 43 500 g tunnin ajan. Supernatantti otettiin talteen.

Aequoriinin puhdistaminen ja analysointi

Aequoriini uutettiin ja puhdistettiin menetelmällä, joka esitetään julkaisussa /Blinks, J.R., Wier, W.G., Hess, P. ja Predergast, F.G., Prog. Biophys. Molec. Biol., 40, 1-114 (1982)/. Aequoriinin määrä, tai fotoproteiinin aktiivisuus mitattiin injektoimalla 5 µl näytettä 0,5 millilitraan 0,1 M CaC_2-liuosta, joka on 0,1 M Tris-puskurin, pH 8,0, suhteen, ja mittaamalla samanaikaisesti valon huippuintensiteetti ja fotonien kokonaismäärä. Tällaisiin mittauksiin soveltuvien fotometrien rakenne sekä instrumentin kalibrointi absoluuttisia fotonimääriä varten on kuvattu aikaisemmin /Anderson, J.M., Faini, G.J. ja Wampler, J.E., Methods in Enz. 57, 529-559 (1978); Charbonneau, H. ja Cormier, M.J., J. Biol. Chem. 254, 769-780 (1979)/.

Apoaequoriinin aktiivisuuden osittainen puhdistaminen pAEQ1-uutteista

Uutteet - Ilmentynyt apoaequoriini puhdistettiin osittain johtamalla 23 millilitraa pAEQ1-uutetta Whatman DE-22-petin (kokonaistilavuus 42 ml) läpi, joka peti oli tasapainoitettu 1 mM EDTA-, 1,5 mM Tris-puskurilla, pH 7,5. Eluutiossa käytettiin 800 millilitraa NaCl-gradienttia (0-1 M), ja aktiivinen apoaequoriini eluoitui 0,3 M NaCl-liuoksella. Piikkejä tuottaneet fraktiot yhdistettiin ja dialysoitiin sellaista liuosta vastaan, joka liuos käsitti 0,5 M KCl, 10 mM EDTA ja 15 mM Tris, pH 7,5, kuvassa 3 esitettyjä kokeita varten.

Tulokset ja niiden tarkastelu

Aequorea-meduusan poly(A^+)RNA:n in vitro-luenta

Kustakin grammasta pakastetun meduusan kudosta eristettiin noin 1,6 µg poly(A^+)RNA:ta. Aequorea-meduusan poly(A^+)RNA:n in vitro luennasta saadut tulokset esitetään kuvassa 1. Anti-aequoriinin kanssa reagoineet luennan tuotteet nähdään urassa 4. Immunosaostetut ^{35}S-tuikkeet vastasivat 0,3% kaikista, tässä luennassa hapoilla saostuvista tuikkeista, mikä osoittaa, että apoaequoriinin mRNA vastaa suurin piirtein 0,3% poly(A^+)mRNA:n koko populaatiosta. Tämä suhteellinen runsaus on yhtäpitävää koko proteiinin sen fraktion (0,5%) kanssa, joka fraktio vastaa aequoriinia Aequorea-meduusan suuaukon ympäriltä saatujen renkaiden raakauutteessa. Proteiineja ei immunosaostunut lainkaan, kun tämä in vitro luenta toteutettiin Aequorea-meduusan RNA:n puuttuessa (ura 2), tai Aequorea-poly(A^-)RNA:n läsnäollessa (ei esitetty).

Anti-aequoriinilla immunosaostuneet luennan primärituotteet liikkuivat SDS-PAGE-geelillä siten, että niiden ilmeinen molekyylipaino (23 400 daltonia, ura 4) oli hieman suurempi kuin Aequorea-meduusasta eristetyn luonnollisen aequoriinin ilmeinen molekyylipaino (22 800 daltonia, nähdään kuvassa 1). Nämä tiedot, ja kuvassa 4 esitetyt tiedot pitävät yhtä sen kanssa, että luennan primärituotteessa on läsnä suurin piirtein seitsemästä aminohaposta muodostunut esiketju.

Poly(A^+)RNA:n luennasta immunosaostetut proteiinit liikkuvat duplettina tai jopa triplettinä (ura 4, kuva 1), mikäli tarkastellaan alkuperäistä autoradiogrammia. Tämä tulos on tulkittavissa kahdella tavalla. Ensinnäkin, Aequorea victoria-meduusassa voi olla monia apoaequoriinin geenejä, ja niitä vastaavien esiproteiinien molekyylipainot poikkeavat toisistaan, koska niissä esiintyvien esiketjujen pituudet vaihtelevat. Aequoriini-isotsyymit [Blinks, J.R. ja Harrer, G.C., Fed. Proc. 34, 474 (1975)] saattavat olla osoituksena tällaisesta monen geenin muodostamasta perheestä. Toiseksi, Friday Harbor'ista saatu Aequorea victoria-meduusojen populaatio saattaa käsittää lukuisia Aequorea-lajeja.

Aequoriini-cDNA-molekyylien tunnistaminen

Käytetty Aequorea-meduusan cDNA-kirjasto käsitti 6000 yhdistelmää, joissa olevat istutteet olivat suurempia kuin 450 emäsparia. 25 satunnaisesti seulotusta yhdistelmästä yhdessäkään ei ollut alle 500 emäsparin pitusia istutteita, ja kaksi istutetta oli yli 3 kiloemäsparin suuruisia.

Aequorea-cDNA-pankki seulottiin seuraavalla, koettimena toimivalla synteettisten oligonukleotidien seoksella:

3' - ACCAT$^{A}_{C}$TG$^{A}_{\underset{C}{\underset{|}{G}}}$TACCT$^{A}_{G}$GG - 5'

Näiden oligonukleotidien DNA-ketjut määritettiin tarkastelemalla apoaequoriinin täydellistä amonihappoketjua. Nämä oligonukleotidit täydentävät sitä mRNA-molekyyliä, joka koodaa peptidiä Trp^{173}.Tyr.Thr.Met.Asp.Pro^{178} aequoriini-polypeptidin karboksipään alueessa. Nämä 17-meerit merkittiin ^{32}P-isotoopilla, ja hybridisoitiin Aequorea-meduusan cDNA-kirjastosta saatuun plasmidi-DNA:han, kuten menetelmissä esitetään.

Kuusi sellaista transformanttia tunnistettiin, jotka transformantit sisälsivät näihin synteettisiin oligonukleotideihin hybridisoituvia istutteita käsittäviä plasmideja. Kuvassa 2 esitetään suurimman PstI-istutteen, pAEQ1, sisältävän plasmidin restriktiokartta. Synteettisten oligonukleotidien hybridisoitumista ei tapahtuisi, mikäli pAEQ1 pilkottaisiin entsyymillä BamHI. Tarkasteltaessa 17-meeristä DNA-ketjua todetaan, että tämä hybridisaation koetin sisältää kuitenkin BamHI-tunnistamisketjun (GGATCC). Näin ollen istutteen pAEQ1 BamHI-kohtaa voitaisiin käyttää apoaequoriinia koodaavan ketjun 3'-alueen tunnistamiseen. Yhdistelmäplasmidi pAEQ1 sisältää todellakin apoaequoriinin cDNA:n, kuten sen ilmentyminen E. coli-bakteerissa osoittaa, kuten jäljempänä esitetään.

Apoaequoriinin ilmentyminen E. coli-bakteerissa

Jotta saataisiin selvitetyksi se, ilmentääkö yksikään näistä kuudesta transformantista biologisesti aktiivista apoaequoriinia, niin näistä kustakin, sekä isäntäkannasta, valmistettiin uute Menetelmät-osassa esitetyllä tavalla. 0,5 millilitraan

kutakin uutetta lisättiin 2 mM β-merkaptoetanolia ja 0,1 mM coelenteraatti-lusiferiinia, ja tätä seosta inkuboitiin 4°C:n lämpötilassa 20 tuntia. Tämän jälkeen tästä seoksesta määritettiin Ca^{2+}-ioneista riippuva foroproteiinin aktiivisuus, kuten Menetelmät-osassa esitetään. Ca^{2+}-riippuvaa luminesenssia havaittiin yhdistelmä-pAEQ1-organismeista valmistetuista uutteista, mutta tällaista luminesenssia ei havaittu lainkaan isäntäkannasta tehdystä uutteesta eikä niistä uutteista, jotka oli saatu jostakin muusta transformantista. Istutteet plasmideissa pAEQ1-6 ristihybridisoituivat, minkä perusteella voidaan olettaa, että ne sisältävät homologisia DNA-ketjuja. Kuitenkin mikäli cDNA-istutteet plasmideissa pAEQ2-6 eivät olleet riittävän pitkiä, tai mikäli ne olivat suuntautuneet plasmideissa epäasianmukaisesti, niin tällaisista uutteista ei tällöin ollut odotettavissa apoaequoriinin aktiivisuutta.

Kinetiikka fotoproteiinin aktiivisuuden muodostumisessa pAEQ1-uutteista on samankaltainen kuin luonnollisen apoaequoriiniseoksen tapauksessa todettu kinetiikka, kuten kuvassa 3 esitetään. Edellytykset fotoproteiinin aktiivisuuden muodostumiselle tässä uutteessa ovat samoin identtiset niiden edellytysten kanssa, jotka edellytykset on todettu todellista apoaequoriinia käytettäessä. Kuten kuvasta 3 nähdään, liuennutta happea (O_2) tarvitaan. Lisäksi joko β-merkaptoetanolin tai coelenteraatti-lusiferiinin poistaminen reaktioseoksesta johtaa siihen, että Ca^{2+}-ioneista riippuvan fotoproteiinin aktiivisuuden muodostuminen on nolla. Aktiivisen komponentin injektointi Ca^{2+}-ioneja sisältämättömiin puskureihin ei tuottanut lainkaan luminesenssia. Tämän jälkeen lisätyt Ca^{2+}-ionit tuottivat luminesenssivälähdyksen.

Jotta aktiivisen komponentin ominaisuuksia pAEQ1-istutteen sisältävistä transformanteista saaduissa uutteissa voitaisiin selvittää edelleen, niin tämän yhdistelmäplasmidin sisältävästä transformantista saatua uutetta käsiteltiin kromatografisesti DE-22-kolonnia käyttäen, kuten Menetelmät-osassa esitetään. Apoaequoriinin aktiivisuus eluoitui noin 0,3 M suolaliuoksella, mikä on

samankaltainen tulos todelliseen apoaequoriiniin verrattuna. Tämän jälkeen aktiivisia fraktioita inkuboitiin coelenteraatti-lusiferiinin, β-merkaptoetanolin ja hapen läsnäollessa foto-proteiinin aktiivisuuden kehittämiseksi, kuten kuvassa 3 esi-tetään. Sitten tämä seos ohjattiin geelisuodatukseen. Kuten kuvasta 4 nähdään, fotoproteiinin aktiivisuus, joka kehitettiin pAEQ1-uutteiden osittain puhdistetusta komponentista, eluoitui kolonnista siten että molekyylipainon arvo M_r oli 20 600, ver-rattuna luonnollisen aequoriinin arvoon 19 600. Samanlaisia tuloksia havaittiin in vitro luentakokeiden aikana (kuva 1). Kuvan 4 tietojen perusteella voitaisiin myös päätellä, että lusiferiini liittyy lujasti aktiiviseen komponenttiin pAEQ1-uutteissa käytetyissä varausolosuhteissa.

Kuvassa 4 esitetty, yhdistetty fotoproteiinin fraktio tuottaa luminesenssivälähdyksen, kun siihen lisätään Ca^{2+}-ioneja. Tämän välähdyksen kinetiikkaa ei voitu erottaa Ca^{2+}-ioneista riippuvan aequoriini-reaktion kinetiikasta. Muut yhdistelmä-plasmidit eivät ilmentäneet valoa emittoivaa proteiinia olles-saan läsnä transformanteissa, kuten alla olevasta taulukosta 6 nähdään.

Edellä esitettyjen tietojen perusteella nähdään, että plasmi-diin pAEQ1 istutettu cDNA vastaa apoaequoriinia koodaavaa, täys-pitkää cDNA-molekyyliä. Samoin näiden tietojen perusteella nähdään, että tämä cDNA ilmentyy pAEQ1-plasmidissa, ja että vastaava proteiinituote ei eroa biologisten ominaisuuksiensa suhteen luonnollisesta apoaquoriiniseoksesta. Ilmentymisen taso arvioitiin noin 0,01% koko liukoisesta proteiinista.

Taulukko 6

Apoaequoriinin varaaminen apoaequoriinin cDNA-klooneista saaduissa uutteissa

Klooni	Valon huippuintensiteetti (hv/s) uutteissa $+Ca^{2+}$	$-Ca^{2+}$
pAEQ1	5×10^6	0
pAEQ1	0	0
pAEQ3	0	0
pAEQ4	0	0
pAEQ5	0	0
pAEQ6	0	0
SK 1592 (Isäntäkanta)	0	0

0,5 millilitraan kutakin uutetta lisättiin merkaptoetanolia (2 mM) ja coelenteraatti-lusiferaania (0,015 mM). Seoksia inkuboitiin 4°C:n lämpötilassa 20 tuntia. 5 mikrolitran näyte otettiin seoksesta, se injektoitiin 0,5 millilitraan 0,1 mM Ca^{2+}-liuosta ja valon huippuintensiteetti mitattiin.

Esimerkki 4

Apoaequoriinin ilmentymisen parantaminen E. coli-bakteerissa indusoituvaa lac-promoottoria käyttäen

Apoaequoriinin ilmentymisen taso on suhteellisen alhainen plasmidin pAEQ1 sisältävissä E. coli-bakteereissa. Ilmentymisen tason nostamiseksi kloonista pAEQ1 saatu apoaequoriinin geeni alikloonattiin toiseen plasmidiin (pUC9) siten, että apoaequoriinin geenin kopioituminen paranee sen ansiosta, että geeni sijaitsee edullisesti indusoituvan lac-promoottorin suhteen.

0,75 kiloemäsparin suuruinen Pst I-kappale eristettiin kloonista pAEQ1, ja kloonattiin plasmidin pUC9 ainoaan Pst I-kohtaan. Tällöin saatiin kaksi erilaista plasmidia, pAEQ7 ja pAEQ8. Plasmidi pAEQ8 sisälsi Pst I-istutteen toivotulla tavalla suuntautuneena, mikä nähdään kuvassa 2(b). Plasmidi pAEQ7 sisälsi tämän kappaleen päin vastoin suuntautuneena.

Plasmidin pAEQ7 ja pAEQ8 sisältäviä E. coli-kantoja (isäntä: JM105) kasvatettiin toisistaan erillään 37°C:n lämpötilassa 20 millilitrassa Luria-ravintoalustaa, joka sisälsi ampisilliinia (50 µg/ml). Kun OD_{550} saavutti arvon 0,6, viljelmät tehtiin 1 mM 100 mM varastoliuoksella. Viljelmistä otettiin 5 millilitran näyte, ja jäljelle jäävää viljelmää ravistettiin edelleen. Näytteitä otettiin myös 1 ja 2 tunnin kuluttua. Välittömästi kunkin näytteen oton jälkeen solut sentrifugoitiin ja pakastettiin -20°C:n lämpötilassa, ja säilytettiin täten käyttöhetkeen saakka.

Kuudesta näytteestä saadusta uutteesta määritettiin apoaequoriinin aktiivisuus. E. coli-solut lysoitiin ensin suspendoimalla solut uudestaan 1 millilitraan 50 mM Tris-puskuria, pH 8, 10% sakkaroosia, 25 µg/ml lysotsyymiä ja 20 µg/ml RNaasia A. Kun näitä seoksia oli pidetty 45 minuuttia jäissä, seoksia sentrifugoitiin nopeudella 43 500 x g tunnin ajan. Supernatantti otettiin talteen. Tämän jälkeen supernatantteja (uutteita) inkuboitiin yön yli coelenteraatti-lusiferiinin ja merkaptoetanolin läsnäollessa (250 µl uutetta, 3 µl 5% merkaptoetanolia vedessä ja 3 µl coelenteraatti-lusiferiinia). Tämän jälkeen aequoriinin aktiivisuus näissä inkuboiduissa seoksissa määritettiin injektoimalla 5 mikrolitran näyte 0,5 millilitraan 0,1 M $CaCl_2$-liuosta, 0,1 M Tris, pH 8,0, ja mittaamalla samanaikaisesti valon huippuintensiteetti ja fotonien kokonaismäärä. Proteiinipitoisuus määritettiin Bradford-kokeella (Bio-Rad).

Taulukossa 7 esitetään tulokset, jotka saatiin kuudella, plasmidit pAEQ7 ja pAEQ8 sisältävistä kannoista valmistetulla uutteella, sekä vertailuna toimivasta E. coli-kannasta (SK1592) saadulla uutteella, ja yhdellä uutteella, joka saatiin plasmidin pAEQ1 sisältävästä kannasta.

Taulukko 7

Apoaequoriinin ilmentymisen tasot E. coli-kannoissa, jotka sisältävät plasmidit pAEQ1, pAEQ7 ja pAEQ8.

Plasmidi	Tuntia inkuboinnin jälkeen IPTG:n kanssa	Aequoriinin ominaisaktiivisuus (fotonia/mg)	Aequoriinin osuus (%) liukoisesta proteiinista	
			Olettaen varautumisen tehokkuudeksi 1 %	Olettaen varautumisen tehokkuudeksi 20 %
pAEQ7	0	≤0,02	-	0
	1	≤0,04	-	0
	2	≤0,02	-	0
pAEQ8	0	0,668	0,042 (11)*	0,002 (10)
	1	17,2	1,07 (268)	0,05 (263)
	2	38,4	2,40 (600)	0,12 (600)
pAEQ1	-	0,061	0,004	0,0002
Kanta SK1592	-	0	-	0

*Suluissa esitetyt numerot tarkoittavat aktiivisuuden moninkertoja plasmidin pAEQ1 sisältävistä uutteista todettuun aktiivisuuteen verrattuna.

Aequoriinin aktiivisuustaso näissä uutteissa riippuu varautumisen tehokkuudesta lusiferiinia käytettäessä. Varautumisen tehokkuutta ei voida kvantitoida raakauutteista. Havaittu varautumisen tehokkuus ei ollut 20 % korkeampi Aequorea-meduusasta eristettyä apoaequoriinia käytettäessä, ja tämä tehokkuus on todennäköisesti jonkin verran alhaisempi E. coli-uutteissa. Näin ollen taulukossa esitetään laskelmat, jotka perustuvat 1 % ja 20 % varautumisen tehokkuuteen.

Plasmidista pAEQ8 peräisin oleva ilmentyminen on merkittävästi korkeampaa kaksi tuntia induktion jälkeen (600-kertainen) plasmidista pAEQ1 peräisin olevaan ilmentymiseen verrattuna. Aequoriinin geenin indusoitumista ei todettu lainkaan plasmidin pAEQ7 tapauksessa, joka pAEQ7 sisältää aequoriinin geenin päin vastoin suuntautuneena plasmidiin pAEQ8 verrattuna.

Näiden tietojen perusteella nähdään, että apoaequoriinin ilmentymisen tasoa voidaan parantaa huomattavasti, mikäli cDNA-nukleotidiketju sijoitetaan asianmukaisesti 3'-asemaan indusoituvan promoottorin suhteen.

Esimerkki 5

Spesifisen apoaequoriinin geenin rakenteen määrittäminen

Kuvassa 2 esitetyn Pst I - Pst I-kappaleen, joka on läsnä plasmideissa pAEQ1, pAEQ7 ja pAEQ8, rakenne määritettiin geeniketjujen analysoinnissa tunnettuja standardimenetelmiä käyttäen. Geenin 3'-päässä on 69 nukleotidiä, jotka eivät käy läpi luentavaihetta. Luennan läpikäyneen alueen ilmentyminen johtaa N-päätteisessä päässään seitsemän ylimääräistä aminohappojäännöstä käsittävän proteiinin ilmentymiseen, kun aminohappojäännöksiä verrataan esimerkissä kuvatulla tavalla eristettyyn proteiiniin (apoaequoriini), jonka N-pää alkaa jäännöksellä VAL. Nämä seitsemän jäännöstä vaikuttavat irtoavan proteaasin vaikutuksesta esimerkissä 1 esitetyn eristämistoimenpiteen aikana. Aminohappojäännöstä PRO koodaavan C-pään kodonin jälkeen sijaitsee pysäytyskodoni, ja 12 muuta nukleotidiä, mikä osoittaa selvästi sen, että eristetty cDNA on täysimittainen. Koko kaksijuosteinen DNA ja aminohappoketjut esitetään seuraavassa:

CTT TGC ACC AAA ACA CCA CAT CAA ATC TCC AGT TGA TAA ACT AAA TCG TCC CAA CGG CAA
GAA ACG TGG TTT TGT GGT GTA GTT TAG AGG TCA ACT ATT TGA TTT AGC AGG GTT GCC GTT
1
-22

MET THR SER GLU GLN TYR SER VAL LYS LEU THR PRO ASP PHE ASP ASN PRO
CAG GCC AAC ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC CCA
GTC CGG TTG TAC TGG TCG CTT GTT ATG AGT CAG TTC GAA TGT GGT CTG AAG CTG TTG GGT
61
-2

LYS TRY ILE GLY ARG HIS LYS HIS MET PHE ASN PHE LEU ASP VAL ASN HIS ASN GLY ARG

AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC AAC CAC AAT GGA AGG

TTT ACC TAA CCT GCT GTG TTC GTG TAC AAA TTA AAA GAA CTA CAG TTG GTG TTA CCT TCC

121

18

ILE SER LEU ASP GLU MET VAL TYR LYS ALA SER ASP ILE VAL ILE ASN ASN LEU GLY ALA

ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA

TAG AGA GAA CTG CTC TAC CAG ATG TTC CGC AGG CTA TAA CAA TAT TTG TTA GAA CCT CGT

181

38

THR PRO GLU GLN ALA LYS ARG HIS LYS ASP ALA VAL GLU ALA PHE PHE GLY GLY ALA GLY

ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA

TGT GGA CTT GTT CGG TTT GCA GTG TTT CTA CGA CAT CTT CGG AAG AAG CCT CCT CGA CCT

241

58

MET LYS TYR GLY VAL GLU THR GLU TRY PRO GLU TYR ILE GLU GLY TRY LYS ARG LEU ALA

ATG AAA TAT GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG GCT

TAC TTT ATA CCA CAT CTT TGA CTT ACC GGA CTT ATG TAG CTT CCT ACC TTT TCT GAC CGA

301

78

SER GLU GLU LEU LYS ARG TYR SER LYS ASN GLN ILE THR LEU ILE ARG LEU TRY GLY ASP

TCC GAG GAA TTG AAA AGG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT CGT TTA TGG GGT GAT

AGG CTC CTT AAC TTT TCC ATA AGT TTT TTG GTT TAG TGT GAA TAA GCA AAT ACC CCA CTA

361

98

ALA LEU PHE ASP ILE ILE ASP LYS ASP GLN ASN GLY ALA ILE SER LEU ASP GLU TRY LYS

GCA TTG TTC GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA

CGT AAC AAG CTA TAG TAA CTG TTT CTG GTT TTA CCT CGA TAA AGT GAC CTA CTT ACC TTT

421

118

ALA TYR THR LYS SER ALA GLY ILE ILE GLN SER SER GLU ASP CYS GLU GLU THR PHE ARG

GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA

CGT ATG TGG TTT AGA CGA CCG TAG TAG GTT AGC AGT CTT CTA ACG CTC CTT TGT AAG TCT

481

138

VAL CYS ASP ILE ASP GLU SER GLY GLN LEU ASP VAL ASP GLU MET THR ARG GLN HIS LEU

GTG TGC GAT ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA

CAC ACG CTA TAA CTA CTT TCA CCT GTC GAG CTA CAA CTA CTC TAC TGT TCT GTT GTA AAT

541

158

GLY PHE TRY TYR THR MET ASP PRO ALA CYS GLU LYS LEU TYR GLY GLY ALA VAL PRO

GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA GCT GTC CCC TAA

CCT AAA ACC ATG TGG TAC CTA GGA CGA ACG CTT TTC GAG ATG CCA CCT CGA CAG GGG ATT

601

178

GAA ACT CTG CGC

CTT TGA GAC GCG

661

198

Tämän tunnistetun ketjun perusteella nähdään, että minkä tahansa taulukossa 3 esitetyn vaihtelevan aminohappoketjun valikointi tuottaa aktiivista apoaequoriinia, sillä edellä esitetty ketju sisältää sekä pääasiallisia että merkitykseltään vähäisempiä aminohappoja mikroheterogeenisyyden eri asemissa.

Tämän mukaisesti eri peptidejä koodaavien erilaisten geenien osoitetaan samalla tavoin edustavan biologisesti aktiivisia molekyylejä.

Tässä hakemuksessa aikaisemmin esitetty, muihin peptideihin, DNA-molekyyleihin, vektoreihin, jne. kohdistuva tarkastelu, joka perustuu tässä hakemuksessa julkaistuihin yleisiin ketjuihin, joissa ketjuissa esiintyy vähäisiä vaihteluita (jolloin niillä kuitenkin on apoaequoriinin biologista aktiivisuutta), on yhtä hyvin sovellettavissa tässä esimerkissä julkaistuihin spesifisiin ketjuihin. Tässä esimerkissä julkaistaan peptidi, tätä peptidiä koodaava DNA-ketju sekä kahden restriktiokohdan välissä sijaitseva täysimittainen DNA-ketju, muun muassa. Koodaava DNA-ketju (joka valinnaisesti sisältää terminaalisen pysäytyskodonin) julkaistaan täysimittaisesta DNA-ketjusta erillisenä kokonaisuutena, ja sitä tulee tarkastella tästä ketjusta erillään, muunnoksensa mukaan lukien. Tarkoitus on, että jokainen, kaksijuosteisena DNA-molekyylinä julkaistu DNA esittää myös tämän kaksijuosteisen DNA:n muodostamia erillisiä yksijuosteisia DNA-ketjuja, sekä näitä ketjuja kopiointiprosessin avulla vastaavia RNA-molekyylejä.

Tämä keksintö ei rajoitu näissä esimerkeissä esitettyihin spesifisiin vektoreihin eikä isäntinä toimiviin bakteereihin, vaikka esimerkkien vektoreita ja isäntiä käytetäänkin eräissä tämän keksinnön suositeltavimmista suoritusmuodoista. Kaikki käytetyt plasmidit ja bakteerit on helposti bioteknologian asiantuntijoiden saatavilla eri lähteistä. Esimerkiksi E. coli-bakteeri JM105 ja plasmidit pUC9 ja pBR322 ovat kaupallisesti saatavina yhtiöstä P.L. Biochemicals, Inc., 800 Centennial Avenue, Piscataway,

New Jersey, 08854 USA (yhtiön Pharmacia, Inc. tytäryhtiö), jossa niillä on luettelonumeroina 27-1550-01, 27-4918-01 ja 27-1750-01, vastaavasti. Lisäksi nämä ja muut mikro-organismit ja plasmidit, joita voidaan käyttää tätä keksintöä käytäntöön sovellettaessa, ovat saatavana kantakokoelmasta American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 USA. Edustavina esimerkkeinä mainittakoon tunnusnumeroineen: E. coli SK1592, ATCC n:o. 35106; E. coli JM105, ATCC n:o 53029; pUC9, ATCC n:o 37252; ja pBR322, ATCC n:o 31344.

Täten tämä keksintö on kuvattu täydellisesti, ja alan asiantuntijalle on selvää, että keksintöön voidaan tehdä lukuisia muutoksia ja muunnoksia ohessa julkaistun keksinnön tavoitteista ja luonteesta kuitenkaan poikkeamatta.

Patenttivaatimukset

1. Homogeeninen peptidi, **tunnettu** siitä, että sillä on sekvenssi

VAL LYS LEU THR PRO ASP PHE ASP ASN PRO
LYS TRY ILE GLY ARG HIS LYS HIS MET PHE ASN PHE LEU ASP VAL ASN HIS ASN GLY ARG
ILE SER LEU ASP GLU MET VAL TYR LYS ALA SER ASP ILE VAL ILE ASN ASN LEU GLY ALA
THR PRO GLU GLN ALA LYS ARG HIS LYS ASP ALA VAL GLU ALA PHE PHE GLY GLY ALA GLY
MET LYS TYR GLY VAL GLU THR GLU TRY PRO GLU TYR ILE GLU GLY TRY LYS ARG LEU ALA
SER GLU GLU LEU LYS ARG TYR SER LYS ASN GLN ILE THR LEU ILE ARG LEU TRY GLY ASP
ALA LEU PHE ASP ILE ILE ASP LYS ASP GLN ASN GLY ALA ILE SER LEU ASP GLU TRY LYS
ALA TYR THR LYS SER ALA GLY ILE ILE GLN SER SER GLU ASP CYS GLU GLU THR PHE ARG
VAL CYS ASP ILE ASP GLU SER GLY GLN LEU ASP VAL ASP GLU MET THR ARG GLN HIS LEU
GLY PHE TRY TYR THR MET ASP PRO ALA CYS GLU LYS LEU TYR GLY GLY ALA VAL PRO;

jossa sekvenssissä vähintään yksi seuraavista aminohapoista on korvattu seuraavasti:

PRO^{5}	on korvattu aminohapolla	SER,
ASP^{8}	on korvattu aminohapolla	ASN,
LYS^{11}	on korvattu aminohapolla	ARG,
GLU^{78}	on korvattu aminohapolla	ASP,
GLU^{81}	on korvattu aminohapolla	ALA,
ARG^{88}	on korvattu aminohapolla	LYS,
GLU^{92}	on korvattu aminohapolla	ASP tai CYS,
ARG^{96}	on korvattu aminohapolla	LYS,
SER^{98}	on korvattu aminohapolla	ALA,
GLN^{101}	on korvattu aminohapolla	GLU,
ILE^{102}	on korvattu aminohapolla	PRO,
LEU^{107}	on korvattu aminohapolla	ILE,
ILE^{116}	on korvattu aminohapolla	VAL,
SER^{135}	on korvattu aminohapolla	ALA,
SER^{141}	on korvattu aminohapolla	THR,

joka mainittu peptidi kykenee sitomaan coelenterate-lusiferiinia ja emittoimaan valoa Ca^{2+}:n läsnäollessa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, **tunnettu** siitä, että 1-15 aminohappoa puuttuu joko aminoterminaalisesta tai karboksiterminaalisesta päästä tai molemmista päistä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, **tunnettu** siitä, että 1-10 aminohappoa on lisäksi liitetty peräkkäin aminopäähän, karboksipäähän tai molempiin päihin.

4. Oleellisesti puhdas polynukleotidimolekyyli, **tunnettu** siitä, että se käsittää nukleotidisekvenssin

ATG ACC AGC GAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA CCA GAC TTC GAC AAC CCA
AAA TGG ATT GGA CGA CAC AAG CAC ATG TTT AAT TTT CTT GAT GTC AAC CAC AAT GGA AGG
ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCG TCC GAT ATT GTT ATA AAC AAT CTT GGA GCA
ACA CCT GAA CAA GCC AAA CGT CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA
ATG AAA TAT GGT GTA GAA ACT GAA TGG CCT GAA TAC ATC GAA GGA TGG AAA AGA CTG GCT
TCC GAG GAA TTG AAA ACG TAT TCA AAA AAC CAA ATC ACA CTT ATT CGT TTA TGG GGT GAT
GCA TTG TTC GAT ATC ATT GAC AAA GAC CAA AAT GGA GCT ATT TCA CTG GAT GAA TGG AAA
GCA TAC ACC AAA TCT GCT GGC ATC ATC CAA TCG TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA
GTG TGC GAT ATT GAT GAA AGT GGA CAG CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA
GGA TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA GCT GTC CCC,

jossa sekvenssissä vähintään yksi seuraavista kodoneista on korvattu seuraavasti:

CCA^{12} on korvattu kodonilla, joka koodaa SER,
GAC^{15} on korvattu kodonilla, joka koodaa ASN,
AAA^{18} on korvattu kodonilla, joka koodaa ARG
GAA^{85} on korvattu kodonilla, joka koodaa ASP,
GAA^{88} on korvattu kodonilla, joka koodaa ALA,
AGA^{95} on korvattu kodonilla, joka koodaa LYS,
GAG^{99} on korvattu kodonilla, joka koodaa ASP tai CYS,
AGG^{103} on korvattu kodonilla, joka koodaa LYS,
TCA^{105} on korvattu kodonilla, joka koodaa ALA,
CAA^{108} on korvattu kodonilla, joka koodaa GLU,
ATC^{109} on korvattu kodonilla, joka koodaa PRO,
TTA^{114} on korvattu kodonilla, joka koodaa ILE,
ATT^{123} on korvattu kodonilla, joka koodaa VAL,

TCT^{142} on korvattu kodonilla, joka koodaa ALA,
TCG^{148} on korvattu kodonilla, joka koodaa THR,

joka sekvenssi koodaa peptidiä, joka kykenee sitomaan coelenterate-lusiferiinia ja emittoimaan valoa Ca^{2+}:n läsnäollessa.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen polynukleotidimolekyyli, **tunnettu** siitä, että 3'-päästä puuttuu 8-22 kodonia, jotka koodaavat 8-22 aminohappoa ja/tai 5'-päästä puuttuu 1-15 kodonia, jotka koodaavat 1-15 aminohappoa.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen polynukleotidimolekyyli, **tunnettu** siitä, että 3'-päähän on peräkkäin lisätty 1-3 kodonia, jotka koodaavat 1-3 aminohappoa ja/tai 5'-päähän on peräkkäin lisätty 1-10 kodonia, jotka koodaavat 1-10 aminohappoa.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 4-6 mukainen polynukleotidimolekyyli, **tunnettu** siitä, että molekyyli on yksisäikeinen DNA.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 4-6 mukainen polynukleotidimolekyyli, **tunnettu** siitä, että molekyyli on kaksisäikeinen DNA.

9. Yhdistelmä-DNA-vektori, **tunnettu** siitä, että vektori kykenee lisääntymään E. colissa ja käsittää jonkin patenttivaatimuksen 4-6 mukaisen nukleotidisekvenssin.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen yhdistelmävektori, **tunnettu** siitä, että nukleotidisekvenssiä edeltää lac-promoottori.

11. Geneettisesti manipuloitu E. coli, **tunnettu** siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukaisen yhdistelmävektorin.

12. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisen peptidin tuottamiseksi, **tunnettu** siitä, että joko ilmennetään mainittua peptidiä koodaavaa vektoria E. colissa tai syntetisoidaan kemiallisesti mainittu peptidi.

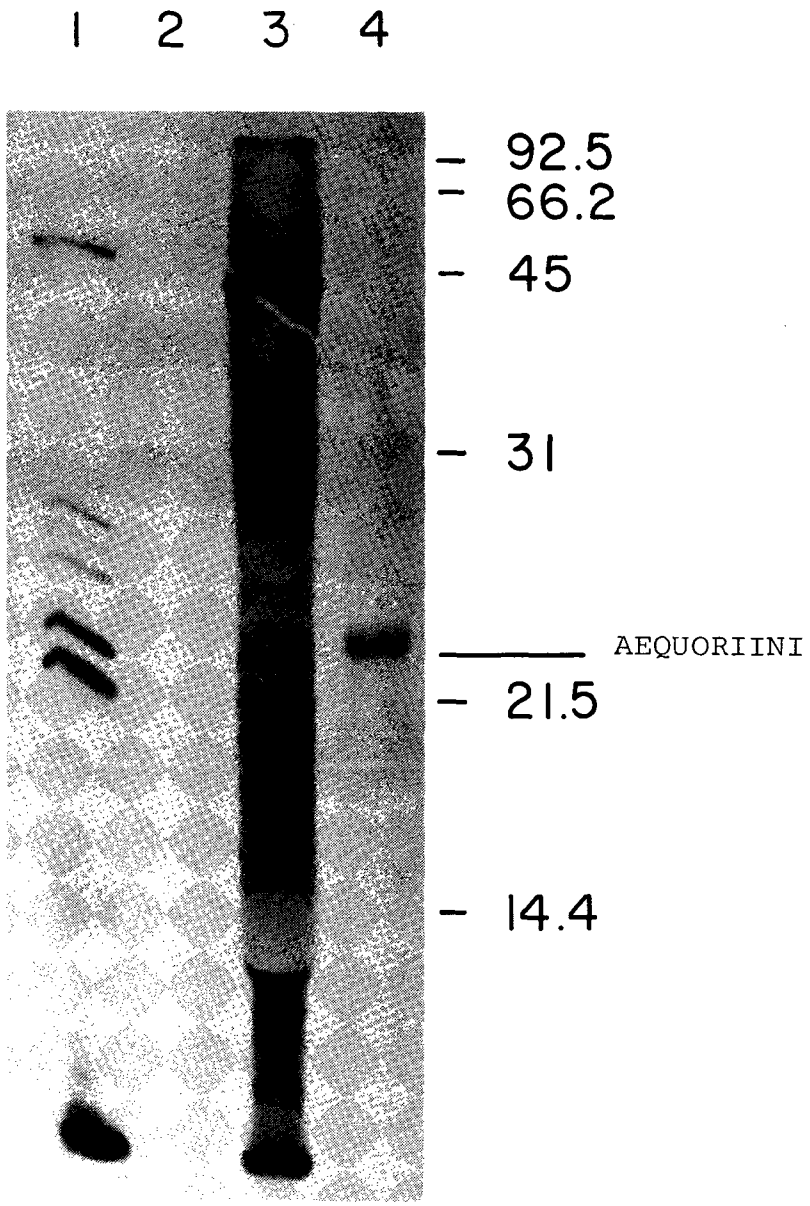


FIG. 1

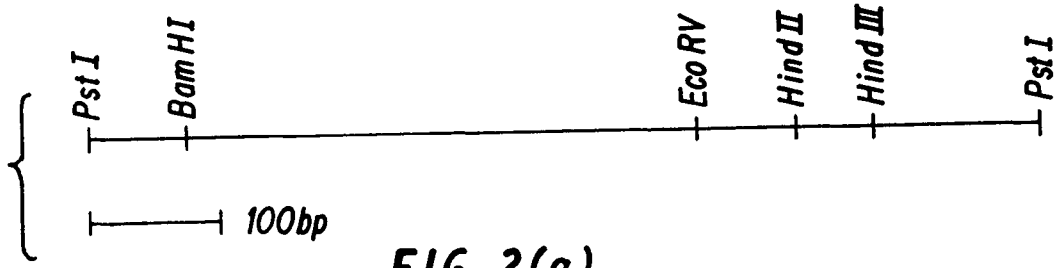

Pst I
Bam HI
Eco RV
Hind II
Hind III
Pst I
100bp

FIG. 2(a)

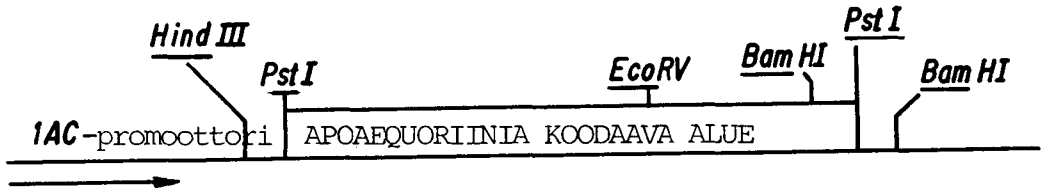

Hind III
Pst I
Eco RV
Bam HI
Pst I
Bam HI
1AC-promoottori
APOAEQUORIINIA KOODAAVA ALUE

FIG. 2(b)

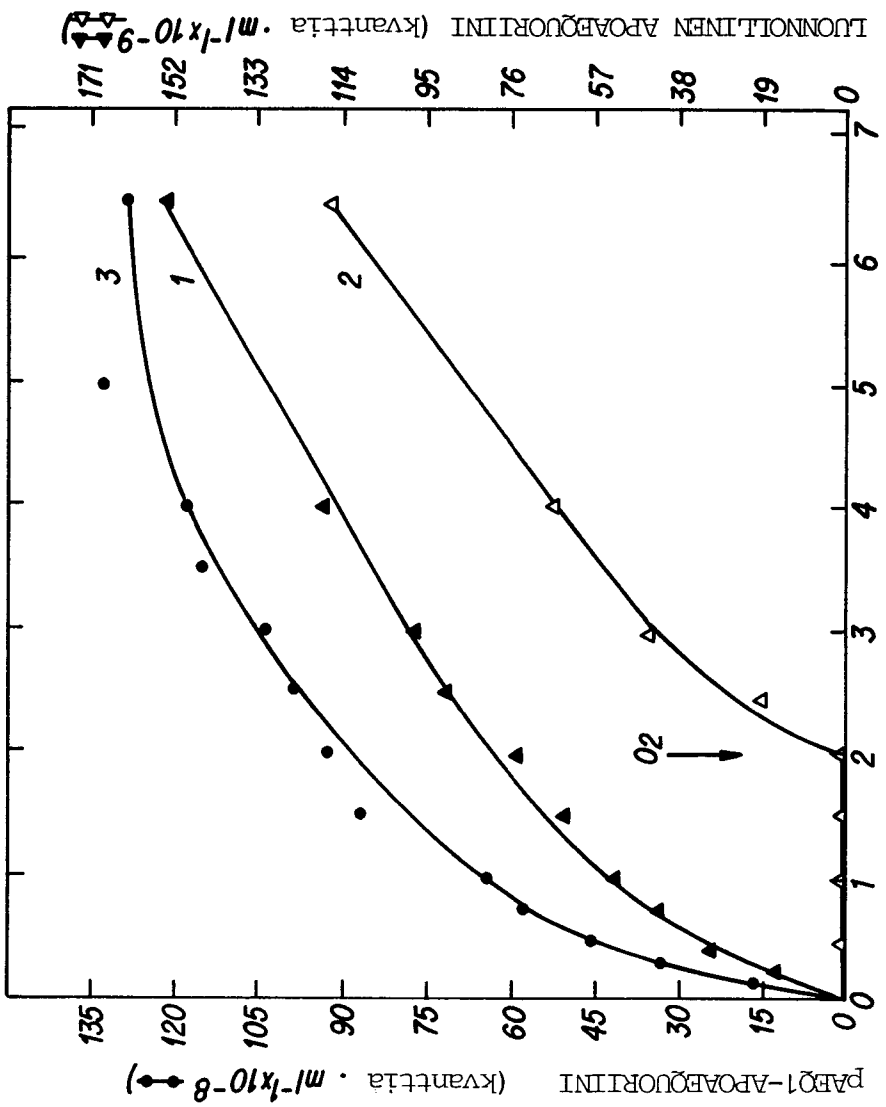

PÄÄQ1-APOAEQUORIINI (kvanttia · m²⁻¹x10⁻⁸)
LUONNOLLINEN APOAEQUORIINI (kvanttia · m²⁻¹x10⁻⁹)
AIKA (tuntia)
O2
1
2
3

FIG. 3

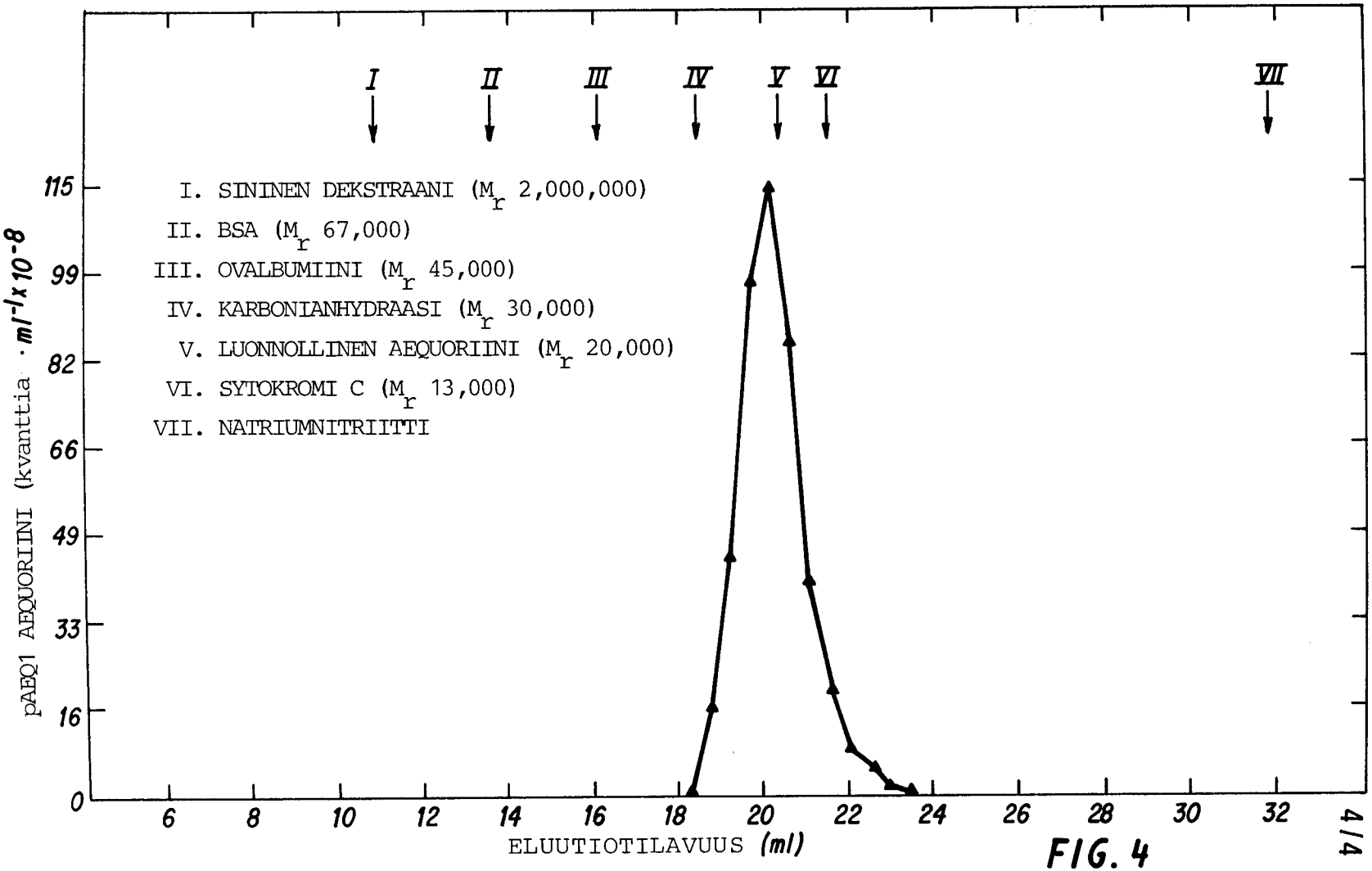

I
II
III
IV
V
VI
VII
I. SININEN DEKSTRAANI (M_r 2,000,000)
II. BSA (M_r 67,000)
III. OVALBUMIINI (M_r 45,000)
IV. KARBONIANHYDRAASI (M_r 30,000)
V. LUONNOLLINEN AEQUORIINI (M_r 20,000)
VI. SYTOKROMI C (M_r 13,000)
VII. NATRIUMNITRIITTI
pAEQ1 AEQUORIINI (kvanttia · $ml^{-1} \times 10^{-8}$)
115
99
82
66
49
33
16
0
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
ELUUTIOTILAVUUS (ml)

FIG. 4

Hak.n:o 855141

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.

Käännä Vänd

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts 71 (1969) 119 661x
89 (1978) 142 171t
96 (1981) 30 280r

29.3.94 Nina Lindholm

Allekirjoitus