

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 911367 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 911367

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

C12N 15/63

C12N 15/31

C12N 1/21

C12P 21/00

C07K 13/00

C07K 15/04

C07K 3/28

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 20.03.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 20.03.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 23.09.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

22.03.1990 GB 9006400

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • CIBA-GEIGY AG, TOWN UNKNOWN, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Suri, Bruno, Switzerland, SVEITSI, (CH)

2 • Schmitz, Albert, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

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

Bakteerivektorit

Bakterievektorer

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

5803 DSM

5804 DSM

5805 DSM

Bakteerivektorit

5 Keksintö koskee geenitekniikan alaa ja tarjoaa uusia DNA-
molekyylejä, jotka käsittävät multifunktionaalisia repli-
kaation aloituskohtia ja/tai DNA-sekvenssin, joka koodaa
Lactococcus lactis-viljelmien supernatantissa olevaa yleis-
sintä proteiinia, jota nimitetään tämän jälkeen pääeritys-
10 tuotteeksi, Major Secretion Product (MSP), sen signaali-
peptidiä ja/tai promoottoria. Uusia DNA-molekyylejä käyte-
tään uusien sukkulavektorien tuottamiseen DNA:n kloonauk-
seen ainakin E. colissa ja Lactococcus spec.'ssä tai uu-
sien vektorien tuottamiseen homologisten tai heterologis-
ten geenien ilmentämiseksi ja eritettyjen geenituotteiden
15 tuottamiseksi gram-positiivisissa bakteereissa kuten Lac-
tococcus spec. ja Bacillus spec.

Vaikka geenitekniikassa tunnetaan jo lukuisia prokaryoot-
tisia vektori-isäntä-systeemejä heterologisten tai homo-
20 logisten geenien kloonaukseen, on jatkuva tarve uusille
systeemeille, joilla voi olla etuja tunnettuihin syste-
meihin nähden.

Useimmat työt yhdistelmä-DNA-tekniologiassa on suoritettu
25 bakteereilla kuten Escherichia coli tai Bacillus subtilis.
Maitohappobakteerit ovat kuitenkin paljon mielenkiintoi-
sempia teollisesti. Tästä syystä on tehty useita yrityksiä
plasmidivektorien kehittämiseksi homologisten ja heterolo-
gisten geenien kloonaukseen ja ilmentämiseen maitohappo-
30 bakteereissa, erityisesti Lactobacillus spec. ja Lactococ-
cus spec. [katso PCT WO 85/03945, Gasson ja Anderson
(1985), EP-A-0 316 677, Bates et al. (1989), Jos et al.
(1985) ja Chassy'n (1987) ja De Vos'in (1987) katsausar-
tikkelit]. Lactococcus spec. oli aikaisemmin nimetty
35 Streptococcus spec.'nä.

Tähän mennessä tutkituilla lactococcal-kannoilla on tyy-

pillinen plasmidikomplementti, joka koostuu useista erilaista plasmideista. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää erottamisessa useiden erilaisten laktococcal-kantojen välillä (Davies et al., 1981). Geneettisiä tutkimuksia varten plasmidivapaita kantoja on rakennettu toistetulla parantamiskäsittelyllä plasmidifunktion tutkimuksissa (De Vos, 1987).

Esimerkiksi L. lactis 712:n plasmidikomplementti, tämän jälkeen kutsuttu myös nimellä L. lactis LL712, käsittää 5 plasmidia, joilla on molekyylipainot 1,8 Md, 2,5 Md, 5,2 Md, 9 Md ja 33 Md, jotka on vastaavasti nimetty nimillä pSH71, pSH72, pSH73, pSH74 ja pLP712, (Gasson, 1983).

Perustuen L. lactisin plasmidiin pSH71 ja läheiseen L. cremoris-plasmidiin pWV01 (Otto et al., 1982) on rakennettu erilaisia kloonausvektoreita. Kloonausvektorit on tuotettu joko insertoimalla geneettisiä markkereita kuten antibioottiresistenssigeenejä plasmideihin tai valikoimalla plasmidien fragmenteista replikaation aloituskohtafunktiota, so. kykyä pitää käynnissä valittujen DNA-fragmenttien replikaatiota. Jälkimmäisen menetelmän mukaisesti tuotettu kloonausvektori on pNZ12, joka sisältää pSH71:n 1,7 kbp:n ClaI-restriktiofragmentin käsittäen replikaation aloituskohdan (Gasson ja Anderson, 1985). pSH71:n replikaation aloituskohta on myös toimiva muissa gram-positiivisissa bakteereissa kuten Bacillus spec.'ssa ja gram-negatiivisessa Escherichia colissa.

Näiden plasmidien pohjalta on kehitetty kloonausvektoreita, jotka ovat käyttökelpoisia homologisten tai heterologisten geenien sisäänviemisessä ja ilmentämisessä maitohappobakteereissa. Kloonausvektoreiden kehittäminen tuotti transformoituja laktococcal-kantoja, joilla on parempia ominaisuuksia ja jotka ovat käyttökelpoisia elintarvike-

ja rehuteollisuudessa, esimerkiksi bakteriofagiresistentti L. lactis-kanta (EP-A-0 316 677) tai L. lactis-kanta, joka tuottaa naudan prokymosiinia (PCT WO 85/03945). Kloonausvektoreiden kehittäminen homologisten tai heterologisten geenituotteiden tuottamiseen ei ole pelkästään mielenkiinnon kohteena parantuneiden maitohappobakteerisolujen tuottamisen takia vaan myös yhdistelmäproteiinien tuottamisen vuoksi. Yksi suurimmista ongelmista heterologisten proteiinien tuottamisessa mikrobisissa ilmentämisyhteisöissä on ollut tuotteen puhdistus. Intraselulaaristen proteiinien puhdistus on aikaa vievää ja usein tuottaa huonoja saantoja. Puhdistusta voidaan helpottaa olennaisesti, jos tuote erittyy isäntäsolusta. Bakteereissa ilmennettyjen tuotteiden puhdistuksen ongelmien välttämiseksi vektorisäntä-systeemit supernatanttiin erittyvien yhdistelmäproteiinien tuottamiseen voivat olla käyttökelpoisia.

Toinen eritettyjen proteiinien etu voi olla, että niillä voi olla natiivi ja biologisesti aktiivinen rakenne, koska siten uudelleenlaskostusprosessia ei tarvita. Uudelleenlaskostus on tavallisesti tarpeellista, jos polypeptidi on sijoittunut intraselulaarisesti.

Proteiinin erittyminen vaatii tavallisesti primaarisen translaatiotuotteen aminopäässä signaalipeptidin, joka ohjaa proteiinin erittymisreaktiotielle. On edullista, jos signaalipeptidi lohkaistaan entsymaattisesti proteiinista solumembraanin läpi tapahtuvan translokaation aikana. Tämä ei kuitenkaan aina ole tilanne.

Keksinnön kohteena on tarjota uusia hybridivektoreita, jotka voivat replikoitua gram-positiivisissa ja gram-negatiivisissa bakteereissa ja/tai jotka sallivat homologisten tai heterologisten geenien ilmentämisen ja stabiilien proteiinituotteiden erittymisen supernatanttiin.

Erityisesti tämä kohde on saavutettu tämän keksinnön mukaisilla hybridivektoreilla, jotka käsittävät uuden DNA-insertin, joka käsittää promoottorialueen, DNA-sekvenssin, joka koodaa signaalipeptidiä ja koodausalueen tähän asti tuntemattomalle geenille, joka koodaa polypeptidiä, joka on runsain proteiini L. lactisin supernatantissa kuten pääteltiin supernatantin TCA-saostuksen, saostettujen proteiinien SDS-polyakryyliamidielektroforeesin ja geelin värjäämisen Coomassie brilliant blue:lla jälkeen ja jota kutsutaan tässä pääeritystuotteeksi (Major Secretion product, MSP).

Toinen keksinnön kohde ovat uudet hybridivektorit, jotka käsittävät replikaation aloituskohdan, joka on johdettu L. lactis LL712:n 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista, tai sille läheisen replikaation aloituskohdan, joka on toimiva gram-positiivisissa kuten myös gram-negatiivissa bakteereissa.

Vastaavasti keksinnön kohteena on vielä tarjota uusia hybridivektoreita, jotka käsittävät promoottorialueen, DNA-sekvenssin, joka koodaa signaalipeptidiä ja/tai MSP-geenin tai läheisen geenin koodausalueen ja replikaation aloituskohdan, joka on johdettu L. lactis LL712:n 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista tai sille läheisen replikaation aloituskohdan.

Keksintö koskee myös uusien DNA-inserttien tai replikaation aloituskohtien per se funktionaalisia fragmentteja. Ne ovat käyttökelpoisia uusien ilmentämisvektoreiden valmistamiseksi homologisten tai heterologisten proteiinien erittämiseksi maitohappobakteereista.

Keksintö tarjoaa edelleen menetelmän uusien DNA-molekyylien ja hybridivektoreiden valmistamiseksi, ja menetelmän

eritettyjen geenituotteiden tuottamiseen keksinnön mukaisella uudella hybridivektorilla transformoitujen isäntien avulla.

5 Keksintö tarjoaa myös MSP-proteiinin puhtaassa muodossa.

DNA-molekyylit

Keksintö koskee hybridivektoria, joka käsittää

10 a) plasmidin pUCRS likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertin, tai sen funktionaalisen fragmentin, tai

b) DNA-sekvenssin, joka hybridisoituu mainitun insertin kanssa tai sen funktionaalisen fragmentin kanssa, tai käsittää promoottorialueen, joka on luonnollisesti operatiivisesti liittynyt sellaiseen hybridisoituvaan DNA-sekvenssiin, tai

15

c) sellaisen DNA-sekvenssin, joka kuuluu a):han tai b):hen ja joka koodaa signaalipeptidiä, degeneraattisekvenssin tai

20

d) sellaisen DNA-molekyylin, joka kuuluu a):han, b):hen tai c):hen, johdannaisen ja/tai

25

e) (I) L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidin replikaation aloituskohdan, tai (II) L. lactis LL712:n 5,2 Md:n plasmidin replikaation aloituskohdan, tai (III) saman inkompatibleettiryhmän kuin L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidi tai 5,2 Md:n plasmidi, plasmidin replikaation aloituskohdan.

30

Plasmidin pUCRS likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertti käsittää MSP-geenin promoottorialueen, DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä, ja koodausalu-

35

een MSP:lle. MSP siihen kiinnittyneen signaalipeptidin kanssa on nimetty tämän jälkeen esi-MSP:nä. EcoRI/SalI-insertti käsittää 1920 bp:n pituisen DNA-sekvenssin SEQ ID No. 1:llä, joka on kuvattu sekvenssilistauksessa sellaisessa orientaatioissa, että emäsasema 1 on lähinnä EcoRI-kohtaa.

Koodausalue MSP:lle ulottuu SEQ ID No. 1:n sekvenssin emäsasemasta 492 emäsasemaan 1793.

DNA-sekvenssi, joka koodaa 27 aminohapon pituisen MSP-signaalipeptidiä, ulottuu tämän jälkeen määritellyn promoottorialueen lopusta sen DNA-sekvenssin alkuun, joka koodaa kypsää MSP:tä, so. sekvenssin SEQ ID No. 1 emäsasemasta 411 asemaan 491. MSP-signaalipeptidi tai sen funktionaalinen fragmentti saa aikaan proteiinin erittymisen isäntäsolusta, esimerkiksi maitohappobakteerista, kuten Lactococcus lactis'sta, tai Bacillus spec.'stä, kuten B. thuringiensis'sta, jos proteiinin N-pää on kovalenttisesti liittynyt signaalipeptidin C-päähän. MSP-signaalipeptidin C-pään ja proteiinin, jota eritetään isäntäsolusta, N-pään kovalenttinen sidos voidaan saada tuottamalla fuusiogeeni, jolloin koko MSP-signaalipeptidiä koodaava DNA-sekvenssi tai sen osa, joka koodaa MSP-signaalipeptidin funktionaalista fragmenttia ja sisältää C-pään, liitetään oikeassa lukukehyksessä sen rakennegeenin 5'-päähän, joka koodaa haluttua proteiinia. Sellainen fuusiogeeni on esimerkiksi DNA-molekyyli SEQ ID No. 2, joka käsittää DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä ja hirudiinin rakennegeeniä.

MSP-signaalipeptidin ja MSP:n aminohapposekvenssit on annettu myös sekvenssissä SEQ ID No. 1.

MSP-geenin promoottorialue sijaitsee DNA-sekvenssin, joka

koodaa MSP-signaali-peptidiä, yläpuolella ja käsittää jopa noin 1500, edullisesti noin 100 - 1000 nukleotidiä. pUCRS-plasmidin likimäärin 3,5 kbp:tä pitkässä EcoRI/SalI L. lactis-insertissä promoottorialue ylittää insertin EcoRI-leikkauspäästä, joka sijaitsee ylöspäin emäksestä, joka vastaa DNA-sekvenssin SEQ ID No. 1:n asemaa 1, emäsasemaan 411. Erityisemmin, promoottorialue ulottuu ensimmäisestä HindIII-restriktiokohdasta, joka sijaitsee ylöspäin emäksestä, joka vastaa asemaa 1, emäkseen 411. Promoottorialue voi sitoa RNA-polymeraasia sekä säätelyproteiineja ja voi kontrolloida siihen operatiivisesti liittyneen rakennegeenin ilmentymistä.

Termi funktionaalinen fragmentti sisältää ne DNA-fragmentit, jotka pitävät sisällään promoottori-, signaali-peptidi- ja/tai rakennefunktiot.

Edullisia funktionaalisia fragmentteja ovat ne, jotka sisältävät MSP-promoottorialueen, DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaali-peptidiä, tai promoottorialueen ja DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaali-peptidiä. Keksinnön mukaiset fragmentit koostuvat myös pienemmistä fragmenteista, joissa on säilynyt MSP-promoottoriaktiivisuus ja/tai jotka koodaavat peptidiä, jolla on signaali-peptidiaktiivisuutta.

Fragmentteja, joilla on promoottorifunktio, ovat esimerkiksi ne, jotka alkavat ensimmäisellä emäksellä likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertin EcoRI-leikkauspäästä, tai erityisesti ne, jotka alkavat HindIII-kohdasta ja ulottuvat emäkseen asti, joka vastaa sekvenssin SEQ ID No. 1 noin asemaa 410. Muut promoottorifunktion omaavat fragmentit valitaan fragmettien ryhmästä, jotka alkavat millä tahansa emäksellä EcoRI- ja HindIII-paikan välistä ja loppuvat emäkseen sekvenssin SEQ ID No. 1 noin asemassa 410.

Myös lyhyemmissä promoottorialueen fragmenteissa on promoottoriaktiivisuus säilynyt.

5 DNA-fragmentti, joka koodaa signaalipeptidiä, yltää esimerkiksi sekvenssin SEQ ID No. 1 noin emäksestä 411 emäkseen 491. Se voidaan ulottaa 5' päähän promoottorialueen fragmentilla, joka ei pidä sisällään promoottoriaktiivisuutta.

10 Fragmentti, joka pitää sisällään MSP-promoottorifunktiota ja koodaa signaalipeptidiä, ulottuu insertin EcoRI-pään lopusta, joka sijaitsee ylöspäin emäksestä, joka vastaa DNA-sekvenssin SEQ ID No. 1 asemaa 1, alas emäkseen asemassa 491. Toinen fragmentti, joka pitää sisällään MSP-

15 promoottorifunktiota ja koodaa signaalipeptidiä, ulottuu ensimmäisestä HindIII-restriktiopaikasta, joka sijaitsee ylöspäin emäksestä, joka vastaa DNA-sekvenssin SEQ ID No. 1 asemaa 1, ylöspäin noin emäkseen, joka vastaa asemaa 491. Muut fragmentit, jotka pitävät sisällään MSP-promoot-

20 torifunktoita ja jotka koodaavat signaalipeptidiä, valitaan fragmenttien ryhmästä, jotka alkavat mistä tahansa emäksestä mainittujen EcoRI- ja HindIII-paikkojen välillä ja loppuvat sekvenssin SEQ ID No. 1 emäkseen noin asemassa 491.

25 Fragmentit voivat sisältää linkkereitä, jotka tarjoavat onnistuneen sidoksen toisiin DNA-molekyyleihin. Sopivilla linkkereillä edellä oleviin fragmentteihin on DNA-sekvenssi, joka sopii DNA:n restriktiokohtaan, johon fragmentti

30 liitetään. Ne voivat myös sisältää edeltä määriteltäviä restriktiokohtia.

DNA-molekyyli, joka hybridisoituu mainitun insertin kanssa, hybridisoidaan tavanomaisissa olosuhteissa. Tavanomainen hybridisoimismenettely on kuvattu esimerkiksi viit-

35

teessä Benton ja Davis (1977). Sellainen hybridisoituva DNA-molekyyli käsittää esimerkiksi hybridisoituvana DNA-sekvenssin MSP:tä koodaavan rakennegeenin variantin. Sellaiseen hybridisoituvaan varianttiin viitataan tämän jälkeen myös rakennegeeninä, joka on MSP-geenin läheinen. Proteiiniin, jota sellainen läheinen geeni koodaa, viitataan proteiinina, joka on läheinen MSP:lle. Vastaavasti promoottorialue, joka on luonnollisesti operatiivisesti liitetty DNA-sekvenssiin, joka hybridisoituu mainitun insertin kanssa, on MSP:n läheisen geenin promoottorialue.

Rakennegeeni, joka on läheinen MSP-geenille, on esimerkiksi luonnollisesti esiintyvä variantti, joka on johdettu toisesta bakteerista kuin L. lactis, erityisesti toisesta maitohappobakteerista, esimerkiksi Lactobacillus spec.'stä tai Lactococcus spec.'stä, esimerkiksi L. cremoris tai L. thermophilus. Se on myös luonnollisesti esiintyvä variantti, jonka koodaa isogeeni kromosomissa tai plasmidissa, joka luonnollisesti esiintyy L. lactisissa.

DNA-molekyyli, joka käsittää geenin, joka on läheinen MSP-geenille, voidaan eristää tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Keksinnön mukaiset DNA-molekyylit ovat myös sellaisia, joilla on degeneroidut DNA-sekvenssit. Ne degeneroidaan geneettisen koodin merkityksen sisällä siten, että rajoittamaton määrä nukleotideja korvataan toisilla nukleotideilla muuttamatta aminohapposekvenssiä, jota ne koodaavat. Molekyylit, joilla on sellaiset degeneraatti-DNA-sekvenssit, voivat olla käyttökelpoisia niiden erilaisten restriktiokohtien vuoksi tai tietyissä isännässä edullisen kodonikäytön vuoksi. Edullisia ovat DNA-sekvenssien degeneroidut sekvenssit, jotka koodaavat MSP-signaalipeptidiä tai sen varianttia.

Termi johdannainen, kun sitä käytetään DNA-molekyylin, joka on kuuluu ryhmiin a), b) tai c), yhteydessä sisältää sellaisen DNA-molekyylin fragmentit, mutantit tai suurem-
 5 mat johdannaiset. Termi johdannainen sisältää myös frag-
 menttien suuremmat johdannaiset tai sellaisen DNA-molekyy-
 lin mutantit. Edullisia ovat fragmentit, jotka pitävät
 sisällään promoottori-, signaali- tai rakennefunctiot.
 Esimerkkejä sellaisista fragmenteista on annettu yllä.

10 Kohdissa a), b) tai c) kuvatun DNA-molekyylin mutantti on
 esimerkiksi DNA-molekyyli, jolla on deleetio-, insertio-,
 inversio- tai pistemutaatio, joka voi esiintyä luonnolli-
 sesti tai voidaan keinotekoisesti aikaansaada DNA-molekyy-
 liin in vivo tai in vitro tavanomaisten menetelmien mukai-
 15 sesti. Mutantilla voi olla muuttunut restriktiomalli.

Kohdissa a), b) tai c) kuvatun DNA-molekyylin suuremmat
 johdannaiset ovat esimerkiksi lohkaistavissa L. lactis'in
 genomista. Ne voidaan löytää L. lactis LM0230:n genomikir-
 20 jastosta, joka on saatu nukleiinihappojen fragmentoinnil-
 la, fragmenttien käsittelemisellä sopivalla restriktioent-
 syymillä, esimerkiksi Sau3AI, EcoRI, BamHI tai HindIII,
 ligatoimalla sopivaan vektoriin, esimerkiksi lambdafaagi
 λEMBL3 tai plasmidi pBR322, kloonamalla, esimerkiksi E.
 25 colissa, ja lohkaisemalla taas, samalla tai toisella res-
 triktioentsyymillä.

Kohtiin a), b) tai c) kuuluvan DNA-molekyylin suuremmat
 johdannaiset ovat myös rekombinantti-DNA-molekyylijä,
 30 joilla on oheissekvenssejä, esimerkiksi sellaisia, jotka
 käsittävät linkkereitä, jotka tarjoavat sopivia restriktio-
 tiokohtia tai jotka asettavat säätelysekvenssit, kuten
 promoottorin, DNA-sekvenssin, joka koodaa signaalipeptidiä
 tai terminaattorin, ja rakennegeenin oikeaan etäisyyteen
 35 tai lukukehykseen, tai sellainen, joka käsittää sekvensse-

jä, jotka on johdettu vektorista, esimerkiksi faagista tai plasmidista, joita on käytetty hybridivektorin rakentamisessa. Oheissekvenssit, jotka sisältyvät suurempiin johdannaisiin, voivat aikaansaada fuusiogeenien syntymisen.

5

Replikaation aloituskohta, joka on johdettu L. lactis LL712:n 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista tai plasmidista, jolla on sama inkompatibiliteettiryhmä kuin 2,5 Md:n plasmidissa tai 5,2 Md:n plasmidissa, voi aiheuttaa plasmidin replikoitumisen happobakteereissa, esimerkiksi lactococciissa, esimerkiksi L. lactis'ssa, L. lactis diasetylactis'ssa tai L. cremoris'ssa, ja E. colissa tai myös gram-negatiivisissa bakteereissa muissa kuin E. colissa tai grampositiivisissa bakteereissa muissa kuin maitohappobakteereissa, esimerkiksi Bacillus spec.'ssä kuten B. thuringiensis.

10

15

Replikaation aloituskohta, joka on johdettu L. lactis LL712:n 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista tai plasmidista, jolla on sama inkompatibiliteettiryhmä kuin 2,5 Md:n plasmidissa tai 5,2 Md:n plasmidissa, kuuluu esimerkiksi koko vastaavaan linearisoituun plasmidiin, joka on saatavissa sopivalla restriktioendonukleasilla käsittelyn jälkeen. Vastaavasti keksinnön mukainen hybridivektori on myös sellainen, joka käsittää 2,5 Md tai 5,2 Md:n plasmidin, tai plasmidin, jolla on sama inkompatibiliteettiryhmä kuin 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidissa, koko DNA-sekvenssin. Molemmat plasmidit voidaan eristää esimerkiksi kannasta L. lactis LL712, joka on talletettu DSM:ään DSM 5804:nä.

20

25

30

DNA-sekvenssi, joka toimii replikaation aloituskohtana, on myös minkä tahansa mainitun plasmidin fragmentti, joka pitää sisällään replikaatiofunktion aloituskohdan. Sellainen DNA-fragmentti voidaan saada esimerkiksi eristämällä se vastaavan plasmidin tai sen fragmentin fragmentoinnin

35

jälkeen esimerkiksi fysikaalisella voimalla, esimerkiksi jakamisvoimalla, tai kemiallisella lohkaisureaktioilla, tai entsyymeillä, jotka lohkaisevat DNA:ta kuten nukleaa-

5 si III, tai endonukleaaasit, esimerkiksi restriktioendonukleaa-

leaaasit. Erityisesti sellainen DNA-fragmentti on restriktio-

fragmentti, joka saadaan vastaavan plasmidin tai sen fragmentin yhdellä tai kahdella erilaisella restriktioen-

10 donukleaaasilla käsittelyn jälkeen, jotka endonukleaaasit

ovat 2,5 Md:n plasmidin tapauksessa esimerkiksi NdeI, SphI ja/tai EcoRV ja 5,2 Md:n plasmidin tapauksessa esimerkiksi Sau3A, NdeI, HindIII, AccI ja/tai EcoRI.

2,5 Md:n plasmidin replikaation aloituskohta paikallistetaan, esimerkiksi likimäärin 1,8 kbp:tä pitkällä NdeI/-

15 SphI-fragmentilla, likimäärin 3,1 kbp:tä pitkällä EcoRV/-SphI-fragmentilla, jota on saatavilla likimäärin 3,5 kbp:tä pitkän SphI-fragmentin osittaisen EcoRV pilkkomisen jälkeen, likimäärin 3,5 kbp:tä pitkällä SphI fragmentilla,

20 likimäärin 1,2 kbp:tä pitkällä NdeI/EcoRV-fragmentilla, arviolta 2,5 kbp:tä pitkällä EcoRV-fragmentilla, tai likimäärin 3,5 kbp:tä pitkällä EcoRV/SphI-fragmentilla, joka on saatavissa arviolta 3,5 kbp:tä pitkän SphI-fragmentin osittaisen EcoRV pilkkomisen jälkeen. Likimäärin 3,5

25 kbp:tä pitkä SphI ja muut edellä mainitut fragmentit sisältyvät myös pSC12:een. pSC12:n tuottaminen on kuvattu esimerkissä 1.2. Restriktiokartta on annettu kuviossa 2.

5,2 Md:tä pitkän plasmidin replikaation aloituskohta paikallistetaan, esimerkiksi, likimäärin 1,0 kbp:tä pitkällä

30 NdeI/HindIII-fragmentilla, likimäärin 2,2 kbp:tä pitkällä NdeI/AccI-fragmentilla, likimäärin 2,7 kbp:tä pitkällä NdeI/EcoRI-fragmentilla, likimäärin 3,1 kbp:tä pitkällä NdeI/Sau3A-fragmentilla, likimäärin 2,0 kbp:tä pitkällä

35 Sau3A/HindIII-fragmentilla, likimäärin 3,2 kbp:tä pitkällä

Sau3A/AccI-fragmentilla, likimäärin 3,7 kbp:tä pitkällä Sau3A/EcoRI-fragmentilla, tai likimäärin 4,1 kbp:tä pitkällä Sau3A-fragmentilla. Fragmentit, joilla on Sau3A katkaisupäät, ovat saatavissa 5,2 Md:n plasmidin, pSC18:n tai näiden plasmidien sopivien restriktiofragmenttien osittaisen Sau3A-pilkkomisen jälkeen. pSC18:n tuottaminen on kuvattu esimerkissä 1.3. Restriktiokartta on annettu kuviossa 3.

Plasmidit, joilla on sama inkompatibiliteettiryhmä, eivät voi stabiilisti esiintyä samassa solussa. Ne kantavat samankaltaisia replikaation aloituskohtia.

Yhdistelmä-DNA-molekyyli sisältää esimerkiksi linkkereiä ja/tai sekvenssejä, jotka on johdettu vektorista kuten faagista tai plasmidista, ja mahdollisesti markkerigeenejä kuten resistenttimarkkerigeeni, esimerkiksi erytromysiini-, ampicilliini- tai tetrasykliiniresistenttimarkkerigeeni tai vastaava. Yhdistelmä-DNA-molekyyli, joka käsittää tämän keksinnön mukaisen replikaation aloituskohdan, on esimerkiksi vektoriplasmidi maitohappobakteereille, edullisesti sukkulavektori, joka voi replikoitua ainakin maitohappobakteerissa ja E. colissa ja jossa keksinnön mukainen lactococcal-johdettu aloituskohta on ainut replikaation aloituskohta.

Edullinen sukkulavektori on pSC12, pSC12ΔP, pSC12ΔN, pSC12ΔNP, pSC18, pSC18AP tai pSC18ΔN. Edullinen sukkulavektori vieraan geenin ilmentämiseen maitohappobakteereissa on pSC12HIR, pSC12HIR-1 tai pSC12HIRTerm. Edulliset sukkulavektorit on kuvattu esimerkeissä.

DNA-sekvenssi, joka toimii replikaation aloituskohtana ainakin maitohappobakteereissa ja E. colissa, jonka on tarkoitettu kuuluvan edellä olevaan kohtaan e), on myös

edellä määritellyn DNA-sekvenssin inversio-, insertio-,
 deletio- tai pistemutaatio, joka pitää sisällään repli-
 kaation aloituskohdan funktion. Sellaisilla mutanteilla on
 muuttunut nukleotidisekvenssi DNA-sekvenssissä, joka reu-
 5 nustaa todellista replikaation aloituskohtaa, esimerkiksi
 pistemutaatiot, jotka aiheuttavat restriktiokartan muutok-
 sen, tai deletiomutantit kuten plasmidien pSC12 Δ P,
 pSC12 Δ N, pSC12 Δ NP, pSC18 Δ P tai pSC18 Δ N L. lactis-insertit
 (katso taulukko 1). Edellä mainitun replikaation todelli-
 10 sen aloituskohdan on tarkoitettu olevan pienin DNA-frag-
 mentti, joka toimii replikaation aloituskohtana.

Keksinnön mukaiset hybridivektorit ovat käyttökelpoisia
 kloonaukseen sellaisissa isännissä kuin sienet tai eri-
 15 tyisesti bakteereissa. Ne voidaan johtaa mistä tahansa
 vektorista, joka on käyttökelpionen geenitekniikan alalla,
 kuten faageista, kosmideista tai plasmideista. Ne ovat
 esimerkiksi faagi λ :n johdannaisia, esimerkiksi NM 989 tai
 EMBL 3, tai faagin M13, esimerkiksi M13mp18 tai M13mp19,
 20 bakteeriplasmidien, esimerkiksi pBR 322, pUC18 tai pUC19
 tai maitohappobakteerien plasmidien, tai hiivaplasmidien,
 esimerkiksi hiivan 2 μ plasmidi, tai myös epätäydellisten
 faagien tai epätäydellisten plasmidien auttajafaagin tai
 auttajaplasmidin läsnäollessa, jotka sallivat mainittujen
 25 epätäydellisten faagien tai plasmidien replikaation.

Keksinnön mukainen hybridivektori käsittää DNA-molekyylin,
 joka kuuluu kohtiin a), b), c) tai d), nukleotidisekvens-
 sin. Se käsittää erityisesti likimäärin 3,5 kbp:n Eco-
 30 RI/SalI L. lactis-insertin, sen fragmentin, joka koodaa
 MSP-signaalipeptidiä ja/tai MSP-geenin promoottoria. Riip-
 puen keksinnön mukaisen DNA-molekyylin tyypistä, joka on
 insertoitu hybridivektoriin, vektori voi käsittää hybridin
 ilmentymisenohjausekvenssin. Sellainen hybridi-ilmenty-
 35 misenohjausekvenssi koostuu osittain DNA-molekyylistä,

joka kuuluu ryhmiin a), b) tai c) ja osittain DNA-molekyylistä, joka on erilainen kuin DNA-molekyyli, joka kuuluu ryhmiin a), b) tai c). Esimerkiksi hybridivektori voi käsittää MSP-promoottorin yhdessä DNA-sekvenssin kanssa, joka koodaa ei-MSP signaalipeptidiä, DNA-fragmentin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä, yhdessä jonkun muun kuin MSP-promoottorin kanssa. Lisäksi keksinnön mukainen hybridivektori mahdollisesti käsittää transkriptionaalisen terminaattorialueen, esimerkiksi E. colin trpA-transkriptioterminaattorin.

Hybridivektorit, jotka sisältävät tämän keksinnön mukaista signaalipeptidiä koodaavan DNA-sekvenssin, so. sellaisen, joka on johdettu esi-MSP:n geenistä tai läheisestä geenistä, ovat käyttökelpoisia eritettyjen geenituotteiden tuottamisessa maitohappobakteereissa, erityisesti Lactococcus spec.'ssä, erityisesti L. lactis'ssa tai L. cremoris'ssa tai muissa bakteereissa, esimerkiksi Bacillus spec. kuten B. thuringiensis. Sellaiset hybridivektorit käsittävät promoottorin, joka toimii halutussa bakteerissa, esimerkiksi MSP-promoottori ilmentymiselle maitohappobakteerissa, ja mahdollisesti transkriptioterminaattorialueen, joka toimii halutussa bakteerissa. Terminaattorin käyttö voi kasvattaa rekombinanttigeenituotteen saantoa, jos se on toimivasti liitetty vastaavaan homologiseen tai heterologiseen rakennegeeniin. Esimerkiksi, jos E. colin trpA-terminaattori liitetään operatiivisesti hirudiinigeeniin, joka ilmentyy MSP-promoottorin ja MSP-signaalipeptidiä maitohappobakteereissa koodaavan DNA-molekyylin kontrollissa, desulfatohirudiinin tuottaminen kasvaa merkittävästi.

Keksinnön mukainen hybridivektori käsittää myös replikaation aloituskohdan, joka toimii halutussa isännässä, esimerkiksi maitohappobakteereissa ja/tai Bacillus spec.'ssä ja/tai E. colissa.

DNA-sekvenssi, joka kantaa replikaation aloituskohtaa, joka toimii ainakin maitohappobakteereissa, on esimerkiksi lactococcal-plasmidin pSH71 1,7 kbp:n ClaI-fragmentti (Gasson ja Anderson, 1985) tai yksi edellä määritetty DNA-
5 fragmentti, joka käsittää L. lactis LL712-plasmidin 2,5 Md:n plasmidin tai 5,2 Md:n plasmidin replikaation aloituskohdan.

Tämän keksinnön mukainen hybridivektori voi sisältää selektoitavia markkereita. Markkerin valinta riippuu isännästä, joka transformoidaan, selektoidaan ja kloonataan. Voidaan käyttää mitä tahansa markkerigeeniä, joka helpottaa transformanttien selektointia markkerin fenotyypillisestä ilmentymisestä johtuen. Sopivia markkereita ovat erityisesti ne, jotka ilmentävät antibioottista resistenssiä, esimerkiksi erytromysiiniä, tetrasykliiniä tai ampisilliiniä vastaan, tai auksotrofisten mutanttien tapauksessa, geenit, jotka komplementoivat isäntähaittoja, esimerkiksi laktoosin metaboloitireaktiotien geenit.

20 Tämän keksinnön mukaisia edullisia toteutusmuotoja ovat vektorit, jotka käsittävät homologisia tai heterologisia rakennegeenejä, esimerkiksi MSP tai erityisesti tämän jälkeen määriteltävän heterologisen rakennegeenin, joka on
25 operatiivisesti liitetty oikeassa lukukehyksessä DNA-sekvenssiin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä ja joka voidaan ilmentää MSP-promoottorin tai heterologisen promoottorin kontrollin alla.

30 Rakennegeenit voivat olla peräisin viruksista, prokaryoottisista soluista tai eukaryoottisista soluista ja voivat olla johdettu genomisesta DNA:sta tai cDNA:sta, joka on valmistettu mRNA-reitin kautta, tai voidaan syntetisoida kemiallisesti. Ne voivat koodata laajaa valikoimaa käyttö-
35 kelpoisia polypeptidejä, mukaanlukien glykosyloidut poly-

peptidit, erityisesti korkeampien eukaryoottisten, erityisesti nisäkkäiden, kuten eläinten tai erityisesti ihmisperäisiä, kuten entsyymit, joita voidaan käyttää, esimerkiksi, ravinneaineiden tuottamiseen ja entsyymaattisten reaktioiden suorittamiseen kemiassa, tai polypeptidejä, jotka ovat käyttökelpoisia ja arvokkaita ihmis- tai eläinsairauksien hoitoon tai niiden ehkäisyyn, esimerkiksi hormonit, polypeptidit, joilla on immunomodulatorisia, virusvastaisia tai kasvainten vastaisia ominaisuuksia, vasta-aineet, virusantigeenit, rokotteet, hyytymistekijät, ruokatavarat ja sellaiset.

Esimerkkejä sellaisista heterologisista rakennegeeneistä ovat esimerkiksi ne, jotka koodavat hormoneita kuten sekretiini, tymosiini, relaksiini, kalsitoniini, luteinisoiva hormoni, paratyroidihormoni, adrenokortikotropiini, melanosyytti-stimuloiva hormoni, β -lipotropiini, urogastroni tai insuliini, kasvutekijät, kuten epidermaalinen kasvutekijä, insuliinin kaltainen kasvutekijä (IGF), esimerkiksi IGF-I ja IGF-II, sauvasolukasvutekijä, hermokasvutekijä, hermotukikudos-johdettu hermosolukasvutekijä, tai transformoiva kasvutekijä (TGF), kuten TGF β , kasvuhormonit, kuten ihmisen tai nauden kasvuhormonit, interleukiini, kuten interleukiini-1 tai -2, ihmisen makrofagien liikkumista inhiboiva tekijä (MIF), interferonit, kuten ihmisen α -interferoni, esimerkiksi interferoni- α A, α B, α D tai α F, β -interferoni, γ -interferoni tai hybridi-interferoni, esimerkiksi α A- α D- tai α B- α D-hybridi-interferoni, erityisesti hybridi-interferoni BDBB, proteinaasi-inhibiittorit kuten α_1 -antitrypsiini, SLPI ja sellaiset, hepatiitti-virusantigeenit, kuten hepatiitti B -virus pinta- tai ydin-antigeeni tai hepatiitti A -virusantigeeni, tai hepatiitti eiA-eiB-antigeeni, plasminogeeniaktivaattorit, kuten kudospasminogeeniaktivaattori tai urokinaasi, kasvain-nekroositekijä, somatostatiini, reniini, β -endorfiini, im-

munoglobuliinit, kuten immunoglobuliinin D, E tai G kevyt ja/tai raskas ketju, tai ihmis-hiiri hybridi-immunoglobuliinit, immunoglobuliinin sitoutumistekijät, kuten immunoglobuliini E sitoutumistekijä, esimerkiksi sCD23, kalsitoniini, ihmisen kalsitoniinin sukuinen peptidi, veren hyytymistekijät, kuten tekijät IX tai VIIIC, erytropoietiini, egliini, kuten egliini C, hirudiini, desulfatohirudiini, kuten desulfatohirudiinivariantti HV1, HV2, HV3, [Leu¹, Thr²]-HV1, [Lys⁴⁷]-HV2 tai PA, ihmisen superoksidi dismutaasi, viraalinen tymidiinikinaasi, β-laktamaasi, glukoosi-isomeraasi. Edullinen geeni on se, joka koodaa desulfatohirudiinia, esimerkiksi varianttia HV1. Tämän keksinnön mukaisissa hybridivektoreissa esillä oleva promoottori ja/tai DNA-molekyyli, joka koodaa MSP-signaali-peptidiä, on operatiivisesti liittynyt polypeptidiä koodaavaan alueeseen, siten että varmistetaan tehokas polypeptidin ilmentyminen.

Edullisia hybridivektoreita ovat pUCRS, M13 mp18RS, M13 mp19H, pVAHIR, pVAHIR-1, pSC12HIR, pSC12HIR-1, ja erityisesti pSC12HIRTerm. Hybridivektorit on kuvattu tämän jälkeen esimerkeissä.

Keksintö koskee myös DNA-molekyyliä, joka

25

a) on plasmidin pUCRS likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertti, tai sen funktionaalinen fragmentti, tai

30

b) hybridisoituu mainitun insertin kanssa tai sen funktionaalisen fragmentin kanssa, tai käsittää promoottori-alueen, joka on luonnollisesti toimivasti liittynyt sellaiseen hybridisoituvaan DNA-sekvenssiin, tai

35

c) on DNA-sekvenssin, joka kuuluu ryhmään a) tai b), degeneraatti sekvenssi ja joka koodaa signaali-peptidiä, tai

d) on DNA-molekyylin, joka kuuluu ryhmään a), b) tai c), johdannainen, ja/tai

e) käsittää (I) L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidin, tai
5 (II) L. lactis LL712:n 5,2 Md:n plasmidin, tai (III) saman inkompabiliteettiryhmän plasmidin kuin L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidi tai 5,2 Md:n plasmidi, replikaation aloituskohdan sellaisenaan.

10 Nämä DNA-molekyylit ovat käyttökelpoisia keksinnön mukais- ten hybridivektoreiden valmistuksessa tai DNA-geenikirjas- tojen tai mRNA:n seulomiseen toisten samanlaisten DNA:iden tai mRNA:iden suhteen.

15 Menetelmä DNA-molekyylien ja MSP:n valmistamiseksi

Toinen tämän keksinnön kohde on menetelmä keksinnön mukai- sen DNA-molekyylin valmistamiseksi, so. hybridivektorin tai DNA-molekyylin, joka on määritetty edellä, jossa mene-
20 telmässä

A) viljellä isäntää, joka sisältää keksinnön mukaisen DNA-molekyylin ja eristetään keksinnön mukainen DNA-mole-
25 kyyli sellaisesta viljellystä isännästä, tai

B) valmistetaan keksinnön mukainen DNA-molekyyli in vitro synteessillä.

Isännän viljely suoritetaan tavanomaisessa elatusaineessa,
30 joka voidaan täydentää kemiallisilla yhdisteillä tai jät- tää ilman kemiallisia yhdisteitä, jotka sallivat transfor- manttien negatiivisen tai positiivisen valinnan, so. voi- daan valikoida sellaiset isännät, jotka sisältävät halutun DNA-molekyylin yhdessä valintamarkkerin kanssa, non-tans-
35 formanteista, so. sellaiset isännät, joilta puuttuu halut-

tu DNA-molekyyli.

Mitä tahansa alalla hyödyllisiä sopivia transformoitavia isäntiä voidaan käyttää, esimerkiksi sopivia bakteereita, kuten gram-negatiiviset bakteerit, esimerkiksi E. coli, tai gram-positiiviset bakteerit, esimerkiksi Bacillus spec. tai maitohappobakteerit, kuten Lactobacillus spec., tai erityisesti Lactococcus spec., esimerkiksi L. lactis diacetylactis tai L. cremoris.

Bakteerit transformoidaan tavanomaisilla menetelmillä ja transformantit identifioidaan tavanomaisella tavalla, esimerkiksi niiden resistenssin avulla, esimerkiksi tetrasykliiniä vastaan.

Erityisesti kuvatut hybridivektorit lisätään sopivissa E. coli-isäntäkannoissa, kuten TG1, HB101, JM109, MH1 ja sellaiset, tai sopivissa Bacillus-kannoissa, tai sopivissa maitohappobakteereissa, esimerkiksi Lactococcus-kannoissa kuten L. lactis 0230, L. lactis diacetylactis, L. cremoris ja sellaiset. Isännät transformoidaan ja valitaan tekniikan tason tavanomaisilla menetelmillä. Lisätty plasmidi-DNA eristetään bakteereista tavanomaisilla menetelmillä esimerkiksi kuten Birnboim & Doly (1979) ovat kuvanneet.

Keksinnön mukainen DNA-molekyyli voidaan valmistaa myös in vitro synteesillä tavanomaisten menetelmien mukaisesti. In vitro synteesi on erityisen sopiva pienempien fragmenttien valmistamiseksi, esimerkiksi MSP-geenin tai läheisen geenin DNA-sekvenssin, joka koodaa promoottoria tai erityisesti signaalipeptidiä.

Keksinnön mukainen DNA-molekyyli voidaan saada maitohappobakteerista, joka sisältää sellaisen DNA-molekyylin, erityisesti sen genomikirjastosta tai myös mRNA:n kautta.

Seuraavassa DNA-molekyylin, joka on plasmidin pUCRS likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertti, valmistaminen kuvataan enemmän yksityiskohdin.

5 Lähtömateriaalina voidaan käyttää Lactococcus spec.'n genomikirjastoa, esimerkiksi L. lactis 0230, joka valmistetaan tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi osittaisella L. lactis-kannan, esimerkiksi LM 0230, C2 tai
10 LL712, genomisen DNA:n pilkkomisella restriktioentsyymien kanssa, esimerkiksi Sau3A tai MboI, ja kloonamalla suuri-
molekyylipainoiset DNA-fragmentit sopivassa vektorissa, esimerkiksi E. coli-plasmidissa pUN121 tai lambdafaagissa, esimerkiksi λ EMBL3.

15 Mitä tahansa muuta maitohappobakteerikantaa, joka tuottaa MSP:tä, voidaan käyttää lähteenä genomiselle kirjastolle ja samoin muita sopivia vektoreita voidaan käyttää fragmenttien vastaanottajana.

20 Genomikirjaston onnistuneeksi seulomiseksi tämän keksinnön mukaisten DNA-sekvenssien suhteen tarvitaan DNA-koetin, joka hybridisoituu sellaisen DNA-sekvenssin kanssa, esimerkiksi MSP-rakennegeenin kanssa. Tämä voi olla syntet-
tinen DNA-koetin, jos esimerkiksi MSP-geenin sekventti tai
25 osa sen sekvenssistä tunnetaan. Koska ei MSP-proteiini eikä MSP-geenisekvenssi tai sen osa ollut tunnettu ennen tätä keksintöä, MSP:n puhdistuksen, MSP:n N-terminaalisen
30 sekvenssin määrittelyn ja hybridisoituvien DNA-koettimien valmistamisen ongelmat piti ensin ratkaista.

30 MSP on suurin läsnäoleva geenituote Lactococcus spec.-kantojen, esimerkiksi L. lactis, supernatantissa, kuten arvi-
oitiin supernatantin TCA-saostuksen, saostuneiden protei-
nien SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin ja geelin
35 värjäyksen Coomassie brilliant bluella jälkeen.

MSP:n puhdistamiseen voidaan käyttää mitä tahansa sitä sisältävää lähdettä, esimerkiksi maitohappobakteerin viljelmän supernatanttia, esimerkiksi Lactococcus spec. kuten L. lactis. MSP voidaan puhdistaa SDS-polyakryyliamidigeelistä leikkaamalla geelin pala pois, joka pala sisältää pääproteiinikaistan ja eluoimalla MSP.

Muita puhdistusmenetelmiä kuten saostamista hapolla, esimerkiksi trikloorietikkahapolla, suolasaostusta, suolan poistamista, uudelleensaostamista eri suolan muodossa, dialyysikromatografiaa, esimerkiksi affiniteettikromatografiaa, ioninvaihtokromatografiaa, geelisuodatuskromatografiaa, elektroforeesia, esimerkiksi SDS-polyakryyliamidigeelillä, isoelektristä fokusointia, elektroeluoointia ja sellaista, tai mitä tahansa niiden yhdistelmää voidaan myös soveltaa puhtaan MSP:n saamiseksi.

Tässä keksinnössä noin 56 kD:n näennäisen molekyylipainon MSP eristettiin puhtaassa muodossa saostamalla proteiini L. lactis LM0230:n supernatantista trikloorietikkahapolla, sitä seuraavalla saostetun proteiinin elektroforeesilla SDS-polyakryyliamidigeelillä, leikkaamalla kaistan alue pois ja elektroeluoimalla MSP geelistä. Tämä menetelmä on myös sopiva MSP:n läheisten proteiinien, joilla on erilainen näennäinen molekyylipaino, eristämiseen. MSP:n aminohapposekvenssi määritettiin osaksi sekvensoimalla ja osaksi johdettiin DNA-sekvenssistä. Se näytetään SEQ ID No 1 sekvenssilistauksessa ja ulottuu kuvatun aminohapposekvenssin asemasta 28 asemaan 466.

Puhdas MSP proteiini on myös keksinnön kohteena.

MSP:n N-pään sekvensointi suoritettiin tavanomaisella tavalla ja se paljasti seuraavan aminohapposekvenssin:
X-X-Asn-Ser-Asp-Ile-Ala-Lys-Gln-Asp-Ala-Thr-Ile-Ser-X-Ala-

Gln-Ser-Ala-Lys-Ala-Gln-Ala-Gln-Ala-Gln-Val-Asp. Kahta ensimmäistä aminohappoa ja aminohappoa asemassa 15, jotka on merkitty "X":llä, ei ole määritetty.

5 Pohjautuen asemien 5 ja 13 aminohappojen sekvenssiin syntetisoitiin seuraava oligonukleotidiseos:
 GAN₁ ATN₂ GCI AAN₃ CAN₃ GAN₁ GCI AC. Tässä nukleotidisekvenssissä, N₁ on T tai C; N₂ on T, C tai A; N₃ on A tai G. A esittää nukleotidia adeniiniemäksellä, T tyymiinillä, C
 10 sytidiinillä, G guanosiinilla ja I inosiinilla. Oligonukleotidiseos leimattiin radioaktiivisesti tavanomaisella tavalla ja käytettiin Lactococcus spec.:n, erityisesti L. lactis LM0230:n, genomisen kirjaston kuvaamiseksi.

15 DNA-koettimia, jotka sisältävät sekvenssin, joka koodaa MSP:n aminohapposekvenssiä ja joissa on ainakin 14 bp:tä, voidaan käyttää nukleiinihappojen kuvaamiseen, jotka käsittävät MSP-geenin läheisiä geenejä tai niiden osia, mihin kuuluu myös mRNA-koodauksen kuvaaminen esi-MSP:lle.

20 Seulomistarkoituksiin DNA-koettimet leimataan radioaktiivisesti niiden 5'-päähen tekniikan tasosta tunnetuilla menetelmillä käyttämällä $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP:tä ja T4-kinaasia. Isäntämikro-organismit tai -faagit, jotka kantavat tämän keksinnön mukaisia nukleiinihappoja inserttinä, identifioidaan hybridisoimalla laimatulla DNA-koettimella geenikirjaston replikasuodattimilla.

30 Käytetyt hybridisoimisolosuhteet ovat tavanomaisia ja voivat olla enemmän tai vähemmän sitovia, esimerkiksi voidaan yksinkertaisesti valita erilaisia lämpötiloja.

Kirjaston DNA-kloonin hybridisoituva osa, joka hybridisoi-
 tuu oligonukleotidiseoksen kanssa, sekvensoitiin osittain
 35 tavanomaisten menetelmien mukaisesti. Määritetty sekvenssi

käsittää lähes koko funktionaalisen MSP-geenin. Sekvenssi on kuvattu sekvenssilistauksessa SEQ ID No. 1.

3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertti voidaan eristää
5 genomikirjaston positiivisista kloonista pilkkomalla EcoRI:llä ja SalI:llä ja sen jälkeen insertin puhdistuksella tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi käyttämällä agarosigeelielektroforeesia. Fragmentit voidaan valmistaa tavanomaisten menetelmien mukaisesti ja ne voi-
10 daan ligatoida sopivaan vektoriin, esimerkiksi M13mp18:aan M13mp18RS:n generoimiseksi tai pUC18:aan pUCRS:n generoimiseksi.

Samoin, mikä tahansa L. lactis-insertti, joka käsittää
15 MSP-sekvenssejä, esimerkiksi 3,5 kbp:n EcoRI/SalI-insertin suurempia johdannaisia, variantteja tai fragmentteja, tai DNA-molekyylejä, jotka hybridisoituvat 3,5 kbp:n EcoRI/SalI-insertin kanssa, tai käsittää promoottorialueen, joka on luonnollisesti liitetty sellaiseen hybridisoituvaan
20 DNA-molekyyliin, voidaan eristää maitohappobakteerien genomikirjastosta.

DNA-molekyylien fragmentit kohtien a) - c) mukaisesti voidaan saada tavanomaisella tavalla, esimerkiksi fragmenttien eristämisellä insertin pilkkomisen jälkeen sopivilla ekso- tai endonukleaaseilla, esimerkiksi eksonukleaasi
25 III:lla, Bal31:llä tai S1:llä tai restriktioendonukleaaseilla, kuten Sau3A:lla, HindIII:lla ja sellaisilla. Fragmentit voidaan myös saada in vitro DNA-synteessissä tavanomaisten menetelmien mukaisesti.
30

DNA-molekyylien mutantit, jotka kuuluvat johonkin edellä oleviin ryhmiin a) - c), esimerkiksi inversio-, deleetio-, insertio- tai pistemutantit, voidaan valmistaa tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi in vivo tai
35

in vitro paikkaohjatulla mutageneesillä (katso katsausartikkelit Zoller ja Smith 1983, Botstein ja Shortle, 1985 tai Norris et al., 1983) käyttämällä mutageenisia oligonukleotidialukkeita tai hävittämällä DNA-fragmentit kahden restriktiokohdan väliltä katkaisemalla sopivilla restriktioentsyymeillä ja uudelleenligatoimalla DNA, mahdollisesti laimennetussa liuoksessa.

Seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisemmin yhdistelmä-DNA-molekyylin valmistus keksinnön mukaisesti, käsittäen DNA-sekvenssin, joka toimii replikaation aloituskohtana.

Plasmidit eristetään L. lactis LL712:sta tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi kuten viitteessä Birnboim ja Doly (1979) on kuvattu, esimerkeissä kuvatuilla muutoksilla ja ne erotetaan tavanomaisella tavalla, esimerkiksi käyttämällä kromatografiatekniikoita, esimerkiksi agarosigeelikromatografiaa kuten viitteessä Maniatis et al. (1982) on kuvattu, 2,5 Md:n plasmidi ja 5,2 Md:n plasmidi eristetään ja fragmentoidaan tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

Näin saadut fragmettiseokset ligatoidaan sopivalla vektorilla tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi kuten viitteessä Maniatis et al. (1982) on kuvattu ja näitä ligaatioseoksia käytetään transformoimaan tavanomaisella tavalla sopiva välituote-isäntäkanta.

Sopiva vektori kantaa markkerigeenin selktiota varten maitohappobakteereissa, esimerkiksi resistenssimarkkerigeenin, esimerkiksi erytromysiiniresistessigeenin, ja replikaation aloituskohdan, joka ei vaikuta maitohappobakteereissa vaan bakteerissa, joka on sopiva välituoteisäntänä L. lactis-plasmidin fragmenttien kloonaamiseen. Sopiva vektori sisältää myös markkerigeenin välituoteisännässä

valintaa varten, joka voi olla identtinen maitohappobakteesissä toimivan markkerigeenin kanssa. Sopiva välituoteisäntä on esimerkiksi E. coli-kanta, esimerkiksi E. coli TG1, ja sopiva kloonausvektori on sitten E. coli-vektori, esimerkiksi pUC18-johdannainen, joka kantaa erytromysiiniresistenssigeeniä, kuten pUC383, jonka rakentaminen on kuvattu tämän jälkeen esimerkeissä.

Välituoteisäntäsolut, jotka transformoidaan vektorilla, joka käsittää L. lactis 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidin fragmentteja, voidaan mahdollisesti valikoida tavanomaisella tavalla, joka riippuu käytetyn välituoteisäntäsolun ja vektorin tyypistä. Valintamarkkerit voivat olla esimerkiksi resistenssimarkkereita tai geenejä, jotka koodaavat valikoitavia markkerientsyymejä, esimerkiksi E. coli lacZ-geenin tuote β -galaktosidaasi, edellyttäen, että isäntä on E. coli-kanta, joka on epätäydellinen genomisen lacZ-geenin suhteen. Valintamarkkerigeenejä voidaan häiritä DNA-fragmenttien insertiolla. Jos markkeri on lacZ, isäntäsolut, jotka kantavat vektoria, jossa on lacZ-geeniin inseroitu fragmentti, eivät ole enää kykeneviä konvertoimaan X-Gal:ia siniseksi väriksi ja seurauksena X-Gal:n positivismia klooneja sisältävät agarmaljat jäävät valkoisiksi sen jälkeen kun lacZ-geenin ilmentyminen on indusoitu IPTG:llä.

Vektorit, jotka kantavat inserttiä, joka on johdettu L. lactis 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista, testataan suhteessa niiden kykyyn replikoitua plasmidivapaassa L. lactis-kannassa, esimerkiksi L. lactis 0230:ssa. Tähän tarkoitukseen plasmidit eristetään välituoteisännästä ja transformoidaan L. lactis 0230 soluihin tavanomaisten menetelmien mukaisesti, esimerkiksi kuten viitteessä Powell et al. (1988) on kuvattu. Replikoituvat vektorit käsittävät DNA-insertin, joka on johdettu L. lactis 5,2 Md:n tai

2,5 Md:n plasmidista, joka toimii replikaation aloituskoh-
tana. DNA-molekyyli, joka käsittää tämän funktion, voidaan
eristää replikoituvista vektoreista, fragmentoida, muta-
toida jne. ja sitä voidaan käyttää keksinnön mukaisten
5 yhdistelmä-DNA-molekyylien, esimerkiksi kloonaus- tai il-
mentämisvektoreiden rakentamiseen, jotka replikoituvat
maitohappobakteereissa. L. lactis 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n
plasmideista johdetut replikaation aloituskohdat, ovat
myös toimivia muissa bakteereissa kuin maitohappobaktee-
10 reissa, esimerkiksi Bacillus spec.'ssä tai E. colissa.
Siksi vektoreita, jotka käsittävät sellaisia DNA-fragment-
teja, voidaan käyttää sukkulavektoreina.

2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidien fragmentit, jotka kanta-
15 vat replikaation aloituskohtaa, voidaan myös identifioida
ja eristää tätä ennen kuvatun menetelmän mukaisesti frag-
menttiseoksesta, joka on saatu L. lactis LL712:n koko
plasmidivaraston fragmentoimisella. Se mitkä kloonatuista
fragmenteista kantavat 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista
20 johdettua replikaation aloituskohtaa, voidaan määrittää
hybridisoimalla kloonatut fragmentit L. lactis LL712:sta
johdetun plasmidivaraston plasmideista, jotka erotettiin
agarosigeelillä tai kloonattujen fragmenttien ja varaston
plasmidien restriktiomallin vertailulla.

25 Keksinnön mukaiset yhdistelmä-DNA-molekyylit, jotka käsit-
tävät L. lactisin 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidin tai sa-
man imkompatibiliteettiryhmän kuin 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n
plasmidin sisältävän plasmidin koko DNA-sekvenssin voidaan
30 saada esimerkiksi katkaisemalla vastaava plasmidi sopival-
la restriktioendonukleasilla ja ligatoimalla se esimer-
kiksi DNA-fragmentilla, joka käsittää homologisen tai he-
terologisen rakennegeenin, promoottorialueen tai vekto-
risekvenssit, tai linkkerifragmentilla tai sellaisella.
35 Sopivilla restriktioendonukleaseilla on vain yksi tunnis-

tus- ja lohkaisukohta vastaavassa plasmidissa.

Yhdistelmä-DNA-molekyyli, joka käsittää sekvenssin, jolla on replikaation aloituskohdan funktio, joka on johdettu
5 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidista, voidaan saada esimerkiksi menetelmällä, jossa L. lactis LL712:n plasmidivarasto valmistetaan tavanomaisten menetelmien mukaisesti, 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidi identifioidaan, esimerkiksi arvioimalla molekyylipaino agarosigeelielektroforeesilla,
10 vastaava plasmidi fragmentoidaan, esimerkiksi sopivalla restriktioentsyymillä, valmistetaan fragmentti, joka käsittää replikaation aloituskohdan funktion, esimerkiksi yksi edellä mainituista fragmenteista, ja ligatoidaan sellainen fragmentti tai seos, joka käsittää sellaisen fragmentin, DNA-molekyylin kanssa, joka ei käsitä replikaation
15 aloituskohtaa, esimerkiksi kloonausvektori, josta on poistettu sen replikaation aloituskohta, ja valmistetaan DNA-molekyylit, jotka replikoituvat ainakin L. lactisissa ja E. colissa.

20

Plasmidit, jotka käsittävät samasn inkompatibiliteettiryhmään kuin 2,5 Md:n tai 5,2 Md:n plasmidi kuuluvan replikaation aloituskohdan, voidaan identifioida, koska niitä ei voi ylläpitää yhdessä 2,5 Md:n tai vastaavasti 5,2 Md:n
25 plasmidin kanssa saman solun sisällä.

Keksintö koskee myös keksinnön mukaisen DNA-molekyylin tai yhdistelmä-DNA-molekyylin käyttöä hybridivektoreiden valmistamiseksi rakennegeenien ilmentämiseksi. Esimerkkejä
30 sellaisista rakennegeeneistä on annettu edellä. Hybridivektorit voidaan valmistaa tavanomaisten menetelmien mukaisesti käyttämällä entsyymejä kuten restriktioentsyymit, DNA-polymeraasit, DNA-ligaasit ja sellaiset.

35 Esimerkit 4 ja 5 kuvaavat esimerkkinä yksityiskohtaisemmin

hybridivektoreiden valmistamista rakennegeenien ilmentämiseen maitohappobakteereissa, erityisesti L. lactisissa, tai Bacillus spec.'ssä, erityisesti B. thuringiensis'ssä.

5 Transformoidut isännät ja menetelmä niiden valmistamiseksi
Keksintö koskee edelleen bakteeri-isäntiä, jotka on transformoitu keksinnön mukaisella hybridivektorilla.

Keksinnön mukaiset transformoidut bakteeri-isännät ovat
10 sopivia kohdissa a) - e) määritellyn DNA-molekyylin sisältävän hybridivektorin kloonaukseen, amplifiointiin ja/tai valmistamiseen. Hybridivektorit voivat replikoitua sellaisissa isännissä eivätkä ne häviä valintapaineessa solupopulaatiossa proliferaation aikana. Käytettävä isäntä riippuu hybridivektorin sisältämästä replikaation aloituskohdasta. Siinä tapauksessa, että hybridivektori käsittää
15 DNA-sekvenssin, jolla on replikaation aloituskohtafunktio kohdan e) mukaisesti, sopiva isäntä on esimerkiksi mikä tahansa E. coli-, Bacillus spec.- tai Lactococcus spec.-
20 kanta, joka ei sisällä plasmidia, jolla on saman inkompatibiliteettiryhmän replikaation aloituskohta.

Siinä tapauksessa, että hybridivektori käsittää homologisen tai heterologisen rakennegeenin fuusioituneena oikeassa lukukehyksessä MSP-signaaliptidiä koodaavaan DNA-sekvenssiin, keksinnön mukainen transformoitu isäntä on sellainen, joka on sopiva eritetyn homologisen tai heterologisen proteiinin tuottamiseen, esimerkiksi L. lactis-kanta.
25

30 Esimerkkinä keksinnön mukaisesta transformoidusta isännästä on E. coli-kanta, esimerkiksi TG1, C600 tai HB101 transformoituna pUCRS:lla, pSC12:lla, pSC12ΔP:lla, pSC12ΔN:lla, pSC12ΔNP:lla, pSC18:lla, pSC18ΔN:lla,
35 pSC18ΔP:lla, pVAHIR:lla, pVAHIR-1:llä, pSC12HIR:llä,

pSC12HIR-1:llä tai pSC12HIRTerm'illä, tai L. cremoris, tai plasmidivapaa L. lactis, esimerkiksi L. lactis LM0230, tai Bacillus-kanta, esimerkiksi B. thuringiensis, transformoituna jollakin näistä plasmideista. Edullisia ovat E. coli
5 TG1 transformoituna pUCRS:llä, L. lactis transformoituna pUCRS:llä, pSC12HIRTerm'illä, pSC12:lla tai pSC18:lla, ja B. thuringiensis transformoituna pVAHIR:lla tai pVAHIR-1:llä.

10 Keksintö koskee myös menetelmää sellaisten transformanttien valmistamiseksi, jossa menetelmässä isäntä käsitellään transformoimisolosuhteissa tämän keksinnön mukaisella yhdistelmä-DNA-molekyyllillä, erityisesti keksinnön mukaisella hybridivektorilla, mahdollisesti yhdessä valintamarkkerigeenin kanssa ja transformantit valikoidaan.
15

Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi

Keksintö koskee edelleen menetelmää polypeptidin valmistamiseksi, jolle on tunnusomaista se, että homologinen tai
20 heterologinen rakennegeeni fuusioidaan oikeassa lukukehyksessä MSP-signaalipeptidiä koodaavaan DNA-sekvenssiin, siten että sopiva isäntä kuten gram-positiivinen bakteerisäntä, esimerkiksi lactococcal-isäntä, esimerkiksi L. lactis LM0230, tai Bacillus spec., esimerkiksi B. thuringiensis,
25 transformoidaan hybridivektorilla, joka käsittää sellaisen fuusioidun geenin, ja että mainitulla geenillä koodattu polypeptidi eritetään isäntäsoluista. Haluttaessa polypeptidi eristetään supernatantista tavanomaisten menetelmien mukaisesti. Keksinnön edullisessa toteutusmuodossa
30 käytetään bakteeri-isäntää, joka ei eritä viljelyelatusaineeseensa sellaista proteaasia, joka hajottaa ilmennetyn proteiinin.

Sellainen keksinnön edullinen toteutusmuoto on esimerkiksi
35 proteiinien, esimerkiksi desulfatohirudiinin tuotanto,

jotka proteiinit erittyvät L. lactis LM0230-soluista, jotka on transformoitu keksinnön mukaisella hybridivektorilla, joka käsittää geenin, joka koodaa kyseistä proteiinia, esimerkiksi pSC12HIR, pSC12HIR-1 tai erityisesti pSC12HIR-Term. Aktiivisen desulfatohirudiinin konsentraatiot voidaan saada pSC12HIR:llä tai pSC12HIR-1:llä transformoituja L. lactis LM0230-solujen stationäärisen vaiheen viljelmien supernatantista. pSC12HIRTerm:llä transformoitujen L. lactis LM0230-solujen supernatantissa desulfatohirudiinin saanto on noussut. Yllättävästi heterologisten geenituotteiden, esimerkiksi desulfatohirudiinin, määrät eivät pienene stationäärivaiheessa olevien viljelmien pidennetyt, esimerkiksi yön yli inkuboinnin jälkeen, mikä osoittaa supernatantissa olevien heterologisten geenituotteiden proteolyyttisen hajoamisen puuttumista.

Toisessa keksinnön toteutusmuodossa solut voidaan kerätä elatusaineesta joko viljelmän logaritmisessa tai stationäärisessä vaiheessa, esimerkiksi sentrifugoimalla tai suodattamalla, ja uudelleensuspendoida pienempään tilavuuteen esimerkiksi noin 1 %:sta 20 %:iin alkuperäisestä viljelmätilavuudesta, tuoretta elatusainetta tai sopivaa puskuriliuosta. Uudelleensuspendoitujen solujen inkubointi aikaansa supernatanttiin erittyvän heterologisen geenituotteen parantuneen saannon. Esimerkiksi pSC12HIR:llä transformoidun L. lactis LM0230:n viljemässä voidaan saada kasvaneita desulfatohirudiinin saantoja supernatantissa, jos stationäärivaiheessa olevan viljelmän solut kerätään sentrifugoimalla, uudelleensuspendoidaan noin 1/10 tilavuuteen tuoretta elatusainetta ja inkuboidaan 30 minuuttia noin 30 °C:ssa.

Toinen keksinnön toteutusmuoto on MSP:n tuottaminen, joka erittyy gram-positiivisesta isäntäsolusta, joka on transformoitu keksinnön mukaisella hybridivektorilla, esi-

merkiksi pUCRS:llä, edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti.

5 Edelleen keksinnön toteutusmuoto on desulfatohirudiinin tuottaminen B. thuringiensisissa, edullisesti kannassa HD1 cryB (DSM 4574), transformoitu pVAHIR:lla tai pVAHIR-1:llä.

Lyhyt kuvaus piirustuksista

10 Kuvio 1: Plasmidin pUC838 fysikaalinen kartta. Kartan paikat ovat likimääräisiä ja annettu kbp:nä. pUC18-osa ulottuu kartan asemasta 0 asemaan 2,7 ja pVA838-osa, joka kantaa erytromysiiniresistenssigeeniä, ulottuu kartan asemasta 2,7 asemaan 4,4. Suluissa osoitetut restriktiokohdat hävisivät rekombinanttimolekyylin valmistuksen aikana. Lyhenteiden merkitykset ovat: amp^r, ampicilliiniresistenssigeeni; ery^r, erytromysiiniresistenssigeeni; ori_{puc}, replikaation aloituskohta, johdettu pUC18:sta.

20 Kuvio 2: Plasmidin pSC12 fysikaalinen kartta. Kartan paikat ovat likimääräisiä ja annettu kbp:nä. pUC18 DNA ulottuu asemasta 0 asemaan 2,7. pVA838:n 1,7 kb:n erytromysiiniresistenssiä kantava fragmentti ulottuu asemasta 2,7 asemaan 4,4. L. lactis 2,5 Md:n plasmidi-johdettu insertti ulottuu asemasta 4,4 asemaan 8,0/0. Suluissa osoitetut restriktiopaikat hävisivät rekombinanttimolekyylin valmistuksen aikana. Lyhenteiden merkitykset ovat: PL1, pUC-polylinkkerialue EcoRI:stä (SmaI)-kohtaan, PL2 pUC-polylinkkerin alue (SmaI):sta SphI-kohtaan; amp^r, ampicilliiniresistenssigeeni; ery^r, erytromysiiniresistenssigeeni; ori_{puc}, replikaation aloituskohta, johdettu pUC:sta; ori₁₁, replikaation aloituskohta, joka on johdettu lactococcal 2,5 Md:n plasmidista, kuten pääteltiin deleetioanalyysillä.

Kuvio 3: Plasmidin pSC18 fysikaalinen kartta. Kartan paikat ovat likimääräisiä ja annettu kbp:nä. pUC18 DNA ulottuu asemasta 0 asemaan 2,7. pVA838:n 1,7 kb:n erytomysiiniresistenssiä kantava fragmentti ulottuu asemasta 2,7 asemaan 4,4. L. lactis 5,2 Md:n plasmidi-johdettu insertti ulottuu asemasta 4,4 asemaan 8,5/0. Suluissa osoitetut restriktiopaikat tuhoutuivat rekombinanttimolekyylien valmistuksen aikana. Lyhenteiden merkitykset ovat: PL1, pUC-polylinkkerialue EcoRI:stä (SmaI)-kohtaan, PL2, pUC-polylinkkerin alue (BamHI):sta HindIII-kohtaan; amp^r, ampisilliiniresistenssigeeni; ery^r, erytromysiiniresistenssigeeni; ori_{puc}, replikaation aloituskohta, johdettu pUC:sta; ori₁₂, replikaation aloituskohta, joka on johdettu lactococcal 5,2 Md:n plasmidista, kuten pääteltiin deleetioanalyysillä.

Lyhenteet

dNTP	deoksinukleotiditrifosfaatti
HPLC	korkeaerotteinen nestekromatografia
20 IPTG	isopropyyli-β-D-tiogalaktopyranosidi
kbp	kiloemäspari
kD	kiloDalton
LB	Luria broth -elatusaine (Gibco/BRL)
Md	megaDalton
25 sCD23	liukoinen CD23, so. 25 k IgE-sitomistekijä
SLPI	eritysleukoproteinaasi-inhibiittori

Seuraavat esimerkit valaisevat tätä keksintöä, niitä ei kuitenkaan pitäisi tulkita keksinnön rajoitukseksi.

Aineet ja menetelmät

Kannat

L. lactis LM0230 on plasmidivapaa L. lactis C2:n (Efsthio J. D. ja L. L. McKay, 1977) johdannainen. Se on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroor-

ganismen und Zellkulturen (katso jäljempänä).

5 L. lactis C2 (NCDO 2031) ja L. lactis LL712, joista jälkimmäinen toimii 2,5 Md:n ja 5,2 Md:n plasmidien lähteenä, ovat läheisesti sukulaisia tai identtisiä (F. L. Davis et al., 1981). Edellinen on saatavissa esimerkiksi talletuslaitoksesta National Collection of Dairy Organisms, Yhdistynyt kuningaskunta (NCDO 2031), jälkimmäinen on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen un Zellkulturen (katso jäljempänä).
10

E. coli TG1:llä on genotyyppi K12, Δ (lac-pro), supE, thi, hsdD5/F'traD36, proA'B', lacI^q, lacZ Δ M15 ja se on saatavissa Amersham'ilta; se on kuvattu Amershamin käsikirjassa "Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system".
15

Yleiset menetelmät

Transformointi

20 E. coli transformoidaan kalsiumkloridimenetelmän mukaisesti kuten viitteessä Maniatis et al. (1982) on kuvattu.

Lactococcal-kantojen transformointi suoritetaan elektroporaatiolla käyttämällä Gene Pulser® -laitetta BioRad'ista ja seuraamalla heidän työohjeitaan L. lactis LM0230:lle.
25

Plasmidin valmistus

Plasmidi-DNA E. colista valmistetaan Birnboimin ja Dolyn (1979) menetelmän mukaisesti.

30 Samaa menetelmää käytetään lactococci-plasmidien eristämiseen seuraavilla muutoksilla:

a) Yön yli viljelmiä kasvatetaan M17-G-elatusaineessa (Terzaghi ja Sadine, 1975) 30 °C:ssa, laimennetaan 1:10 tuoreeseen elatusaineeseen ja kasvatetaan toiset kaksi tuntia.
35

b) Inkubointi lysotsyymiin kanssa suoritetaan myös mutanolysiinin (50 mg/l) läsnäollessa 10 - 20 min 37 °C:ssa.

5 Plasmidivarasto L. lactis LL712:sta valmistetaan samalla menetelmällä ja plasmidifraktio puhdistetaan edelleen CsCl-etidiumbromidi tasapainosentrifugoimalla (Clewell ja Helinski, 1969). Kolme pienempää plasmidia (1,8 Md, 2,5 Md, 5,2 Md; Gasson, 1983) rikastetaan puhdistettuun plasmidifraktioon, kun taas kaksi suurempaa plasmidia (9 Md ja 10 33 Md; Gasson, 1983) ovat läsnä pienemmissä määrissä.

Esimerkit:

1. Sukkulavektorien rakentaminen maitohappobakteereita ja E. colia varten

15 1.1 pUC838:n rakentaminen

pVA838 (ATCC 37160; Macrina et al., 1982) on lactococcal-plasmidi, jossa on konstitutiivisesti ilmentyvä erytromysiiniresistenssigeeni 1,7 kbp:n AcaI/HindIII-restriktiofragmentissa. Noin 10 µg pVA838 DNA:ta pilkotaan AvaI:-lla ja HindIII:lla. DNA-fragmenttien päät leikataan tyypiksi Klenow-entsyymillä kaikkien neljän dNTP:n läsnäollessa. Fragmentit eristetään agarosigeelillä ja 1,7 kbp:n AvaI/HindIII-fragmentti saadaan talteen geelistä elektroeluoinnilla.

25

Noin 200 ng mainittua fragmenttia ja 100 ng SmaI-katkais-
tua pUC18:ta (Norrander et al.) ligatoidaan T4-ligaasin
läsnäollessa, kuten viitteessä Rusche et al. on ehdotettu,
ja ligaatioseosta käytetään transformoimaan E. coli TG1.
30 Valkoiset pesäkkeet poimitaan LB-agarlevyiltä, jotka sisältävät X-Gal:ia, IPTG:tä ja 100 mg/l ampicilliiniä. Oikeat kloonit identifioidaan eristämällä ja analysoimalla niiden plasmidi-DNA, ja niiden kyvyllä kasvaa LB-agarlevyillä, jotka sisältävät erytromysiiniä (100 mg/l). Synty-
35 nyt plasmidi nimitetään pUC838:ksi. pUC838:n Restrik-

tiokohdat ja ominaispiirteet on annettu kaaviossa 1.

1.2 pSC12:n rakentaminen

5 Plasmidit L. lactis LL712:sta eristetyistä kokoelmasta erotetaan preparatiivisella agarosigeelillä. Toinen DNA-
kaista pohjasta vastaa 2,5 Md:n plasmidin ccc muotoa. Se leikataan pois ja plasmidi elektroeluoidaan. Tämän plasmidin pilkkominen SphI:lla ja agarosigeelielektroforeesi
10 paljastaa yksittäisen 3,5 kbp:n fragmentin osoittaen yksittäisen tai usean läheisesti sijaitsevia SphI-lohkeamis-
kohtia 2,5 Md:n plasmidissa.

pUC838 leikataan ainoasta SphI-kohdastaan ja käsitellään vasikan suolistofosfataasilla. Noin 50 ng fosfataasilla
15 käsiteltyä vektoria ja 150 ng 2,5 Md:n plasmidin 3,5 kbp:n SphI-fragmenttia ligatoidaan T4-ligaasin kanssa ja ligaatios-
eosta käytetään transformoimaan kompetentteja E. coli TG1 soluja. Transformointiseosta kasvatetaan 37 °C:ssa 1
ml:ssa LB:tä 90 minuuttia ja sitten siirretään 200 ml:aan
20 LB:tä, joka sisältää 100 mg/l erytromysiiniä, ja kasvatetaan 37 °C:ssa yön yli. Plasmidi-DNA valmistetaan tämän
viljelmän soluista ja noin 2 µg käytetään transformoimaan L. lactis LM0230. Transformoidut L. lactis LM0230-solut
25 valitaan 30 °C:ssa M-17G agarlevyillä, jotka sisältävät 5
mg/l erytromysiiniä.

Plasmidi-DNA eristetään useista transformoitujen L. lactis LM0230-solujen klooneista ja niille tehdään restriktioent-
syymanalyysi. Kaikki tutkitut transformantit sisälsivät
30 8,0 kbp:n plasmideja, pSC12, josta 3,5 kbp:n SphI-insertti voidaan ottaa talteen. pSC12:n fysikaalinen kartta on annettu kuviossa 2.

35 pSC12:n annetaan sukkuloida useita tunteja L. lactisin ja E. colin välillä ilman mitään ilmeisiä muutoksia restriktio-

tiomallissa.

1.3 pSC18:n rakentaminen

5 Plasmidikokoelma DNA L. lactis LL712:sta restriktoidaan osittaisesti Sau3AI:lla inkuboimalla 500 ng:n osia DNA:ta erilaisten määrien kanssa restriktioentsyymiä. Näytteet, jotka sisältävät osittain leikattuna DNA:ta, identifioi-
10 daan agarosigeelillä. Tämä DNA ligatoidaan pUC838-vektoriin, joka on sitä ennen katkaistu ainoasta BamHI-paikastaan, ja käsitellään vasikan suolistofosfataasilla.

E. coli TG1 plasmidin eristetyn transformointi ja sitä seuraava L. lactis LM0230:n transformointi suoritetaan kuten on kuvattu pSC12:lle. Restriktiopilkkomiset suoritetaan jälleen plasmidi-DNA:lla, joka on eristetty useista
15 L. lactis LM0230-transformaattien klooneista. Ne kantavat 8,8 kbp:n plasmidia, pSC18. Plasmidin sukkuoloiminen useita kertoja L. lactisin ja E. colin välillä ei aiheuttanut mitään muutoksia restriktiomallissa, mikä osoittaa rakenteen stabiilisuutta molemmissa solutyypeissä. pSC18:n fy-
20 sikaalinen kartta on annettu kuviossa 3.

2. Lactococcal replikaation aloituskohtien identifioiminen

2.1 pSC12:n ja pSC18:n deleetioanalyysi

25 Alueet plasmideissa pSC12 ja pSC18, jotka kantavat lactococcus-peräisiä replikaation aloituskohtia, määritetään deleetioanalyysillä seuraavasti:

DNA sopivien restriktiokohtien välillä hävitetään kat-
30 kaisemalla plasmidit vastaavalla restriktioentsyymillä ja liitetään uudelleen renkaaksi T4-ligaasilla. Restriktioentsyymien katkaisukohtien likimääräinen sijainti pSC12:ssa ja pSC18:ssa on annettu kuvioissa 2 ja vastaavasti 3 ja taulukossa 1.

35

pSC12 Δ P ja pSC18 Δ P rakennetaan hävittämällä DNA kahden PvuII-kohdan välillä plasmidien pSC12 ja vastaavasti pSC18 pUC18-osassa, siten poistamalla col E1-peräiset replikaation aloituskohdat.

5

pSC12 Δ N:ssä ja pSC18 Δ N:ssä pSC12:n tai vastaavasti pSC18 pienempi NdeI-fragmentti poistetaan.

10

pSC12 Δ R:stä puuttuu EcoRV-fragmentti pSC12:n lactococcal-DNA:ssa.

15

pSC12 Δ NP:ssä poistetaan DNA pUC:ssä olevan PvuII kohdan ja pSC12:n lactococcal-osassa olevan NdeI-kohdan. Tässä tapauksessa vektori-DNA tehdään tylppäpäiseksi Klenow-entsyymillä ennen uudelleenligatoimista.

Toiselta pSC18:n johdannaiselta, pSC18 Δ H:lta puuttuu DNA-silta plasmidin HindIII-kohdan väliltä.

20

Kaikki mutatoituneet plasmidi-DNA:t eristetään ensin E. coli TG1 transformanteista, jotka ovat resistenttejä erytromysiinille. Sitten testataan, voidaanko niitä käyttää transformoimaan L. lactis LM0230 erytromysiiniresistentiksi. Epäonnistumisen tässä oletetaan osoittavan, että replikaation lactococcal-aloituskohta hävisi tai tuhoutui deleetiossa. Kun erytromysiiniresistenttejä transformantteja saadaan, plasmidi uudelleenerotetaan ja sen rakenteellinen eheys uudelleenvarmistetaan vielä restriktioanalyysillä.

30

Sekä 2,5 Md:n että 5,2 Md:n plasmideja identifioidaan streptococcuksessa replikaatioon vaadittu alue. Sen perusteella, että Δ P-johdannainen kykeni replikoitumaan E. colissa, on ilmeistä, että kloonatut lactococcal-aloituskohdat toimivat myös gram-negatiivisissa E. coli-bakteereissa.

35

Näiden kokeiden tulokset on annettu taulukossa 1.

Taulukko 1: pSC12:n ja pSC18:n deleetioanalyysin tulokset

5	Plasmidi	Deleetioalue ¹	Hävitetty fragmentti ²	Plasmidin replikaatio	
				<u>E. coli</u>	<u>L. lactis</u>
	pSC12	ei mikään		+	+
10	pSC12ΔP	PvuII (0,1), PvuII (2,5)	2,4	+	+
	pSC12ΔN	NdeI (0,2), NdeI (6,2)	2,0	+	+
15	pSC12ΔR	EcoRV (5,0), EcoRV (7,5)	2,5	+	-
	pSC12ΔNP	NdeI (6,2), PvuII (2,5)	4,3	ND ³	+
	pSC18	ei mikään		+	+
20	pSC18ΔP	PvuII (0,1), PvuII (2,5)	2,4	+	+
	pSC18ΔN	NdeI (0,2), NdeI (7,5)	1,2	+	+
	pSC18ΔH	HindIII (0), HindIII (6,5)	2,0	+	-

25 ¹Deleetiot ulottuvat kahden restriktiokohdan välille. Restriktiokohtien likimääräiset asemat pSC12:ssa tai pSC18:ssa on annettu suluissa etäisyyksinä HindIII kohdasta plasmidien pUC838:ssa peräisin olevassa osassa, joka on määriteltä kohtaan (0). Ne liittyvät emäskohtiin, jotka on annettu kuvioissa 2 ja vastaavasti 3.

30 ²Hävitetyn fragmentin likimääräinen pituus kbp:nä.

³Ei määritetty.

2.2 Lactococcal replikaation aloituskohtien lähde

35 Replikaation aloituskohta pSC12:ssa on peräisin L. lactis

LL712:n 2,5 Md:n plasmidista, kuten on selvää aloituskohdan sisältävien DNA-fragmenttien eristämisvaiheiden kuvauksesta.

5 Restriktioentsyymien katkaisukohtat osoittavat, että replikaation aloituskohta pSC18:ssa on lähtöisin 5,2 Md:n plasmidista.

10 2.3 pSC12:n ja pSC18:n replikaatio muissa Lactic lactococci'ssa

L. lactisin, L. lactis diasetylactisin ja L. cremorisin kannat transformoidaan onnistuneesti molemmilla plasmi-deilla. Plasmidit pysyvät stabiilisti assosioituneina solupopulaatiossa valintapaineessa.

15

3. L. lactis LM 0230:n pääeritystuotetta (MSP), koodaavan geenin kloonaus

3.1. L.lactis LM 0230:n pääeritysproteiinin (MSP) eristäminen

20

1,5 l yli yön kasvatettua L. lactis LM 0230:n viljelmää, kasvanut 30 °C:ssa M-17G:ssä, sentrifugoidaan Sorvall GS-3-roottorissa 7000 rpm:ssä 20 minuuttia 4 °C:ssa. Supernatantti kerätään ja proteiinit saostetaan lisäämällä yhtä suuri tilavuus jääkylmää 10%:ista trikloorietikkahappoa ja inkuboidaan 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Saostuma kerätään sentrifugoimalla Sorvall GS-3-roottorissa 8000 rpm:ssä 4 °C:ssa 30 minuuttia. Proteiinipelletit valuteetaan kuiviksi ja uudelleenliuotetaan 3 ml:aan SDS-näytepuskuria (Laemmli, 1970). Näyte neutraloidaan lisäämällä pieni määrä 4 N NaOH:ta ja sitten dialysoidaan 4 tuntia 4 l:aa 25 mM tris-HCl:ää pH 6,8, 0,02 % SDS vastaan. Talteen otetulla näytteellä on noin 4 ml:n tilavuus. 3 x konsentroitua SDS-näytepuskuria lisätään näytteeseen suurentamaan tilavuus 6 ml:aan.

25

30

Proteiinit erotetaan ajamalla 2 ml:n eriä preparatiivisella 8%:isella SDS-polyakryyliamidigeelillä (Laemmli, 1970) käyttämällä BioRadin Protean-astiaa. Pienet suikaleet leikataan geelin vierestä, värjätään Coomassie Brilliant
 5 Bluella ja tehdään värittömäksi vesiliuoksella, joka sisältää 10 % metanolia ja 10 % etikkahappoa. Ne toimivat merkkeinä pääproteiinikaistan, jolla on näennäinen molekyyli-
 paino noin 56 kD, identifioimisessa ja poisleikkaamisessa, joka kaista leikataan pois geelistä.

10

MSP-proteiini otetaan talteen geelistä elektroeluoimalla 150 V:ssa 2 tuntia käyttämällä Biotrap-laitetta ja puskuria, joka sisältää 20 mM ammoniumasetaattia ja 0,01 %
 SDS:ää. Eluaatti dialysoidaan 48 tuntia 20 mM am-
 15 moniumasetaattia, 0,005 % SDS, vastaan vaihdetaan kahdesti. Näyte dialysoidusta proteiinista ajetaan 8%:isella SDS-PAGE:lla ja havaitaan yksittäinen terävä proteiini-
 kaista, jolla on näennäinen molekyyli-paino noin 56 kD.

20

3.2 MSP:n aminoterminaalisen sekvenssin analyysi

Eristetyn MSP-proteiinin aminopään sekvensointi suoritetaan tavanomaisten menetelmien mukaisesti käyttämällä kaasufaasisekvenaattoria (Applied Biosystems Inc., Model 470A) pilkottujen aminohapotähteitten fenyyli-tiohydantoinijoh-
 25 dannaisten HPLC-kvantifioinnilla.

Saatu 28 aminohappoa pitkä sekvenssi on

X-X-Asn-Ser-Asp-Ile-Ala-Lys-Gln-Asp-Ala-Thr-Ile-Ser-X-Ala-
 Gln-Ser-Ala-Lys-Ala-Gln-Ala-Gln-Ala-Gln-Val-Asp. Kahta
 30 ensimmäistä aminohappoa ja aminohappoa asemassa 15, jotka on merkitty "X":llä, ei ole määritetty.

3.3 Seos-oligonukleotidikoettimen synteesi

Pohjautuen aminohapposekvenssiin Asp-Ile-Ala-Lys-Gln-Asp-
 35 Ala-Thr-Ile, joka vastaa aminohappoja asemassa 5 - 13

MSP:n N-pään sekvenssissä, suunnitellaan ja rakennetaan seos-oligonukleotidi DNA-kirjaston seulomiseksi. Inosiini insertoidaan kahteen asemaan 23-mer:ssä, jossa geneettisen koodin degenerointi vaatisi kaikki 4 dNTP:tä, jotta koet-

5 timen kompleksisuus pienenesi. Oligonukleotidiseoksen nukleotidisekvenssi on GAN₁ ATN₂ GCI AAN₃ CAN₃ GAN₁ GCI AC. N₁ on T tai C; N₂ on T, C tai A; N₃ on A tai G. A esittää nukleotidiä adeniiniemäksellä, T tyymiinillä, C sytidiinillä, G guanosiinilla ja I inosiinilla.

10

3.4 L. lactis LM 0230:n geenikirjaston rakentaminen

Kromosomaalinen DNA eristetään L. lactis LM0230:sta modifioimalla menetelmäsarjaa, jota käytettiin plasmidin erotukseen: lysotsyymi- ja mutanolyysikäsittelyn jälkeen so-

15 luja inkuboidaan kaksi tuntia 56 °C:ssa proteinaasin K (100 mg/l) kanssa 10 mM:ssa Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 0,5 % SDS. DNA uutetaan kerran fenoli/kloroformilla (1 til:1 til) ja sitten puhdistetaan CsCl tiheysgradienttisentrifugoinnilla.

20

Kromosomaalinen DNA pilkotaan osaksi Sau3AI:llä ja kokofraktioidaan sakkaroosigradienteilla kuten viitteessä Maniatis on kuvattu. Fragmentit välillä noin 10 - 20 kbp kerätään.

25

λEMBL 3 DNA katkaistaan BamHI:llä ja EcoRI:llä ja puhdistetaan fenoliuuttamisella ja etanolisaostuksella. Sitten se ligatoidaan 10 - 20 kbp:n fragmentteihin heksa-ammiinikoboltti(III)kloridin läsnäollessa konkatameerien muodostumisen suosimiseksi. (Rusche J. R. et al., 1985). Ligatointiseos pakataan in vitro käyttämällä Stratagenen Gigapack Plus®-systeemiä.

30

35

Rekombinantit valikoidaan maljaamalla kirjasto E. coli Q 359:llä (Kahn J. et al., 1980). Saadaan noin 600 000:n

rekombinanttifaaagin kokonaismäärä.

3.5 Kirjaston seulominen MSP:tä koodaavien DNA-sekvenssien suhteen

5 Noin 15 000 rekombinantti λ EMBL 3 pesäkettä levitetään
petrimaljaa kohti (15 cm halkaisijaltaan) ja siirretään
PlaqueScreen®-membraaneille (NEN). Filtterit valikoidaan
hybridisoinnilla esimerkissä 3.3 kuvatulla seos-oligonuk-
leotidi-koettimella, joka leimattiin [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP:llä käyttä-
10 mällä T4-kinaasia viitteessä Maniatis et al. (1982) kuvat-
tujen standardimenetelmien mukaisesti.

Positiiviset pesäkkeet identifioidaan ja altistetaan toi-
selle seulontakierrokselle alhaisessa pesäketiheydessä.

15 DNA valmistetaan positiivisista faageista, pilkotaan rest-
riktioentsyymeillä ja niille suoritetaan Southern-analyysi,
kuten viitteessä Maniatis on kuvattu. Southern-blotit
koetetaan (probed) seos-oligonukleotidilla. Se hybridisoi-
tuu 3,5 kbp:n EcoRI/SalI-fragmenttiin positiivisen faagin
20 L. lactis-insertissä. Edelleen koetinkäsittely osoitti 3,5
kbp:n EcoRI/SalI-fragmentin sisällä olevan 2,1 kbp:n Hin-
dIII-fragmentin hybridisoituvan oligonukleotidiseoksen
kanssa.

25 Erilaisten restriktiokohtien likimääräiset etäisyydet 3,5
kbp:n EcoRI/SalI-fragmentin EcoRI-leikkauspäästä määrite-
tään agarosigeelielektroforeesilla sen jälkeen kun frag-
mentit on pilkottu vastaavilla entsyymeillä tai sopivilla
30 entsyymiseoksilla. EcoRI-leikkauspää sijaitsee noin 0,5
kbp:tä pois HindIII-kohdasta, noin 2,6 kbp:tä toisesta
HindIII-kohdasta, ja noin 3,15 kbp:tä kolmannesta HindIII-
kohdasta.

3.6 pUCRS:n rakentaminen

Positiivisesta faagista saatu DNA pilkotaan EcoRI:llä ja Sali:llä. DNA-fragmentit erotetaan 0,6%:isella agarosegeelillä ja 3,5 kbp:n EcoRI/Sali-fragmentti lohkaistaan pois ja eristetään elektroeluoinnilla. Kolminkertainen molaarinen ylimäärä tätä fragmenttia ligatoidaan pUC19:ään, joka on katkaistu EcoRI:llä ja Sali:llä ja käsitelty alkalisella fosfataasilla.

Ligatoimisesta käytetään tranformoimaan E. coli TG1 ja transformantit valikoidaan maljoilla, jotka sisältävät 100 mg/l ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan transformanteista ja restriktioanalyysit suoritetaan oikean rakenteen, joka nimitetään pUCRS:ksi, varmistamiseksi.

E. coli TG1, joka on transformoitu pUCRS:llä, on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM).

3.7 Pääeritystuotteen (MSP) geenin sekvensointi

Sekvensointi tehdään ketjutermiinaatiomenetelmällä (Sanger F. et al., 1977) käyttämällä USB:n Sequenase®-entsyymiä.

3,5 kbp:n EcoRI/Sali-fragmentit, jotka on valmistettu kuten esimerkissä 3.6 on kuvattu, alakloonataan M13mp18:aan. Syntynyt plasmidi nimetään M13mp18 RS:ksi. 3,5 kbp:n EcoRI/Sali-fragmentin 2.1 kbp:n HindIII-fragmentti kloonataan M13mp19:ään, syntynyt plasmidi on M13mp19H. Yksisuuntaisten deleetioiden sarja generoidaan M13mp18RS:n sisältämän insertin Sali-päästä pilkkomalla DNA endonukleaasiIII:lla ja SI:llä (Henikoff, 1984; Yanisch-Perron et al., 1985). Deleetiot ulottuvat noin 2 kbp:tä insertin sisään. Näiden deleetioiden sekvensointi yleisestä mp18-alukkeesta antoi sekvenssi-informaation yhdelle juosteelle. Tähän sekvenssiin perustuen syntetisoidaan synteettisten oligonukleoti-

dien sarja ja ne toimivat alukkeina toisen juosteen sekvensoimiseen. Lisäsekvenssi-informaatiota saadaan sekvensoimalla exoIII-S1 deleetiot, jotka generoitiin M13 mp 19H:sta samalla menetelmällä. 3,5 kbp:n EcoRI/SalI-fragmentin 1920 bp:n fragmentin DNA-sekvenssi kuvataan sekvenssilistauksessa SEQ ID No. 1. Se käsittää osan MSP-promoottorialueesta, DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä ja rakennegeeniä kypsälle MSP:lle.

Noin 2 kbp:tä pitkän DNA:n analyysi paljasti yhden avoimen lukukehyksen (ORF) läsnäolon, joka koodaa proteiinia, jossa on 461 aminohappotähdettä. Päätellyn aminohapposekvenssin vertailu arvojen kanssa, jotka saatiin eristetyn MSP:n N-pään sekvensoinnista, identifioi proteiinin kypsän muodon, jossa on 434 aminohappoa, joita edeltää kehys, jossa on 27 aminohappoa. Jälkimmäisistä aminohapoista muodostuneella peptidillä on tyypillisen signaalipeptidin rakenne. Varatut tähteet löytyvät N-päästä kun taas muu osa sekvenssistä koostuu pääosin hydrofobisista aminohapoista. Aminohappokoostumus lohkeamiskohdan ympärillä seuraa sääntöjä, jotka on päätelty muista signaalipeptideistä (Von Heijne, 1983).

4. Yhdistelmädesulfatohirudiinin tuottaminen Lactococcus lactisissa

4.1 Desulfatohirudiinieritysplasmidien rakentaminen

Plasmidi M13mp19H sisältää 2,1 kbp:n HindIII-fragmentin, joka koodaa MSP:n N-pään puolta, joka sisältää signaalipeptidin ja noin 1,5 kbp DNA:ta ylävirtaan. Tämä plasmidi lohkaistaan sen ainoasta ScaI-kohdasta 129 bp:tä alavirtaan signaalipeptidin COOH-päästä. Tylppäpäinen 211 bp:n DNA-fragmentti, joka koodaa geneettistä informaatiota desulfatohirudiinille, eristetään plasmidista pML310 (julkaistu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa EP-A-168 342) ja insertoidaan katkaistuun M13mp19H:n ScaI-kohtaan. Oi-

keassa lukukehyksessä oleva fuusio MSP-signaaliipeptidiä koodaavan DNA-sekvenssin ja desulfatohirudiinin rakennegeenin välillä saadaan aikaan poistamalla ylimääräinen DNA, joka erottaa signaaliipeptidin viimeisen aminohapon (Ala) kodonin ja desulfatohirudiinin ensimmäisen aminohapon (Val) kodonin. Tämä saavutetaan oligonukleotidi-ohjautulla in vitro mutageneesillä käyttämällä Amershamin systeemiä. 29 bp:n oligonukleotidi käsittää signaaliipeptidin viimeiset 14 bp:tä ja hirudiinigeenin ensimmäiset 15 bp:tä. Syntyvän fuusiotuotteen sekvenssi on kuvattu sekvenssilistauksessa SEQ ID No. 2.

HindIII-fragmentti, johon fuusiotuote sisältyy, lohkaistaan pois ja insertoidaan ainoaan pSC12:n HindIII:een. Insertin molemmat orientaatiot otetaan talteen. Syntyvät plasmidit nimetään pSC12HIR:ksi ja vastaavasti pSC12HIR-1:ksi.

Toinen plasmidi (pSC12HIRTerm) rakennetaan insertoimalla E. colin (Pharmacia) trpA transkription lopetusalue pSC12HIR:n ainoaan HpaI-kohtaan noin 125 bp:tä desulfatohirudiinigeenistä alavirtaan.

4.2 Desulfatohirudiinin erityys L. Lactisilla

Desulfatohirudiinifuusioplasmidit transformoidaan L. lactis LM0230:aan. Transformantteja kasvatetaan M-17G elatusaineessa täydennettynä 2 %:lla glukoosia erytromysiinin (5 mg/l) läsnäollessa 30 °C:ssa. Kun kasvustot saavuttavat stationäärin vaiheen, 1,5 ml:n näytteet sentrifugoidaan Eppendorf®-putkissa. Kasvustosupernatantit poistetaan ja jäädytetään -70 °C:ssa. Kasvustoja kasvatetaan sitten edelleen yön yli ennen kuin toinen näyte otetaan, sentrifugoidaan, supernatantti poistetaan ja myös jäädytetään. Eritetyn desulfatohirudiinin tuotto määritetään bioanalyysillä.

Bioanalyysi mittaa desulfatohirudiinin trombiini-inhibi-
tioaktiivisuuden kerätyissä supernatanteissa. Bioanalyysin
yksityiskohtaiset menetelmävaiheet, so. trombiini-inhibi-
tioanalyysi, on esitetty seuraavassa:

5

Puskuri, jota käytetään kaikkien näytteiden ja reagenssien
laimennosten tekemiseen, on 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5, joka
sisältää 1,0 M NaCl:ää ja 0,01 % naudun seerumin albumiini-
10 trombiini on ihmisen plasmasta (Protogen AG, Läufel-
fingen, tuote no. 80-13-1102), kromogeeninen trombiini-
substraatti on Chromozyme TH (Boehringer, Mannheim, tuote
no. 206849). Chromozym TH:sta vapautunut p-nitroaniliini
mitataan Dynatech MR 600 mikrolevylukijalla. Kaikki ana-
lyysit suoritetaan mikrotiitterilevyissä (Nunc, MicroWell-
15 levyt). Kuhunkin kaivoon pannaan 50 µl puskuria, 50 µl
supernatanttia, jonka trombiini-ionhibiittoriaktiivisuuden
konsentraatio, so. desulfatohirudiinin konsentraatio on
tuntematon, ja 25 µl trombiiniliuosta. Reaktio aloitetaan
lisäämällä 150 µl substraattiliuosta (330 µg/ml) ja levyjä
20 inkuboidaan kaksi tuntia 37 °C:ssa. Trombiinin konsentraa-
tio säädetään, jotta saadaan $A_{405\text{nm}} = 0,8 \pm 0,2$ inhiboimat-
tomassa kontrollikaivossa. Sekä substraatti- että trom-
biiniliuoksia pidetään jäädytettynä -20 °C:ssa ja ne su-
latetaan juuri ennen käyttämistä. Standardikäyrää tunne-
25 tuilla r[Tyr⁶³]desulfatohirudiinin konsentraatioilla (40,
20, 10, 5, 2,5 ja 1,25 ng/ml) käytetään muuttamaan OD-mit-
taukset aktiivisen desulfatohirudiinin konsentraatioiksi.

L. lactis LM0230 solujen, jotka on transformoitu joko
30 pSC12HIR:llä tai pSC12HIR-1:llä, stationäärivaiheen kas-
vustojen supernatanteille saadaan samat desulfatohirudii-
niaktiivisuuden tasot. L. lactis LM0230 solujen, jotka on
transformoitu pSC12HIRTerm:llä, stationäärivaiheen kasvus-
tojen supernatantissa desulfatohirudiiniaktiivisuuden taso
35 kasvaa noin 50 %:lla. Solujen, jotka on transformoitu

kontrollina pSC12:lla, supernatantit eivät sisällä desulfatohirudiiniaktiivisuutta.

5 Desulfatohirudiinin tasot supernatantissa eivät pienentyneet stationäärivaiheen kasvustojen pidennetyin inkuboinnin, noin 16 tunnin, jälkeen. Nämä tulokset osoittavat proteolyyttisen hajoamisen poissaoloa L. Lactis LM0230:n supernatantissa.

10 Yhdessä kokeessa solut kerätään ensin sentrifugoimalla ja sitten uudelleensuspendoimalla 1/10-tilavuuteen tuoretta elatusainetta ja inkuboimalla 30 °C:ssa 30 minuutin ilmentymisajan. Bioanalyysi mittaa noin kuusinkertaisesti korkeampia Odesulfatohirudiinin aktiivisuuksien tasoja kuin
15 yllä kuvatuissa kokeissa. Hienostuneemmassa muodossa solujen konsentroidin ilmentymisaikaa varten on tapa kasvattaa eritetyn tuotteen konsentraatiota supernatantissa.

20 5. Yhdistelmä-sulfatohirudiinin tuotto Bacillus thuringiensis'ssä

5.1 Plasmidin pVAHIR rakentaminen

Plasmidi pVA838 (Macrina et al, 1982) pilkotaan HindIII:-lla ja 5,0 kbp:n fragmentti, jossa on erytromysiiniresistenttigeeni ja grampositiivinen replikaation alkukohta,
25 eristetään 0,5 %:isesta agarosigeelistä elektroeluoimalla.

HindIII-fragmentti, joka sisältää desulfatohirudiinigeenin, eristetään samalla tavalla pSC12HIR:stä.

30 Nämä kaksi fragmenttia ligatoidaan T4-ligaasin läsnäollessa ja ligaatioseos käytetään suoraan transformoimaan L. lactis LM 0230 elektroporaatiolla. Erytromysiiniresistentit transformantit valikoidaan ja plasmidi-DNA valmistetaan niistä.
35

Näiden plasmidien restriktioanalyysit suoritetaan oikeiden konstruktioiden identifioimiseksi. Molemmat HindIII-desulfatohirudiinin ilmentymiskasettien orientaatiot saadaan ja niitä voidaan käyttää desulfatohirudiinin tuottamiseen
5 Bacillus thuringiensisissä. Plasmidit nimetään pVAHIR:ksi ja pVAHIR-1:ksi.

5.2 Desulfatohirudiinin erityys *B. thuringiensis*'llä

10 *B. thuringiensis*-kanta HD1 cryB (DSM 4574) transformoidaan pVAHIR:lla käyttämällä elektroporaatiota (W. Schurter et al, 1989).

Transformantit valikoidaan LB-maljoilla, jotka sisältävät 20 µg/ml erytromysiiniä 27 °C:ssa tai 30 °C:ssa. Plasmidi-DNA valmistetaan yksittäisistä transformanteista samalla menetelmällä kuin on käytetty *L. lactis*ille. Restriktio-
15 analyysit vahvistavat uudelleen, että eristettyjen plasmidien rakenne on identtinen pVAHIR:lle.

20 Transformantteja, joissa on pVAHIR tai pVA838, -kontrollina - kasvatetaan LB:ssä, joka sisältää 20 mg/l erytromysiiniä 27 °C:ssa yön yli. Viljelmät laimennetaan 1:200 tuoreeseen elatusaineeseen ja niitä kasvatetaan edelleen 30 °C:ssa. Viljelmät sentrifugoidaan ja supernatantit ana-
25 lysoidaan desulfatohirudiiniaktiivisuutta varten 7 tuntia laimentamisen jälkeen.

Desulfatohirudiinia havaitaan solujen, jotka on transformoitu pVAHIR:lla, supernatantissa, kun taas sitä ei mitata
30 yhtään kontrollissa pVA838:n kanssa.

Talletetut mikro-organismit

Seuraavat mikro-organismit on talletettu Budapestin sopimuksen mukaisesti talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von
35 Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b,

D-3300 Braunschweig:

	Mikro-organismi	Talletus no.	Talletuspäivä
5	E. coli K12 TG1/pUCRS	DSM 5803	Helmikuun 16., 1990
	Lactococcus lactis LL712	DSM 5804	Helmikuun 16., 1990
	Lactococcus lactis LM0230	DSM 5805	Helmikuun 16., 1990

Viitejulkaisut:

- 10 Bates, E. E. M. et al. (1989) Applied and Environmental Microbiology 55, 2905.
 Bernton, W. D., ja Davis, R. W. (1977) Science 196 180.
 Birnboim, H. C. ja Doly, J. (1979) Nucleic Acids Res., 7, 1513.
- 15 Botstein, D. ja Shortle, D. (1985) Science 229, 1193.
 Chassy, B. M. (1987) FEMS Microbiol. Rev. 46, 297.
 Clewell, D. ja Helinski, D. R. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 1159.
 Davies, F. L., Underwood, H. M. ja Gasson, J. M. (1981) J. of Applied Bacteriology, 51, 325.
- 20 De Vos, W. M. (1987) FEMS Microbiol. Rev. 46, 281.
 Efstathiou, J. D. ja McKay, L.L. (1977) J. Bacteriol., 130, 257.
 Gasson, J.M. (1983) J. Bacteriol., 154, 1.
- 25 Gasson, J. M. ja Anderson P. H. (1985) FEMS Microbiol. Lett., 30, 193.
 Henikoff, S. (1984) Gene, 28, 351.
 Jos, M. (1985) Applied and Environmental Microbiology 50, 540.
- 30 Karn, J., Brenner, S., Barnett, L. ja Cesareni, G. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5172.
 Laemmli, U. K. (1970) Nature, 227, 680.
 Macrina, F. L. et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, Plenum Press, New York, (1982).
- 35 Maniatis, T., Fritsch, E. F. ja Sambrook, J. (1982) Mole-

cular cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Norrander, J. et al. (1983) *Gene*, 26, 101.

Norris, K. et al. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 5103.

5 Powell et al. (1988) *Applied and Environmental Microbiology* 54, 6.

Oto, R. et al. (1982) *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1272.

10 Rusche, J. R. ja Howards-Flanders, P. (1985) *Nucleic Acids Res.*, 13, 1997.

Sanger, F., Milken, S., Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463.

Schurter, W., Geiser, M. ja Mathe, D. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 218, 177.

15 Terzaghi, B. K. ja Sadine, N. E. (1975) *Applied Microbiology*, 29, 807.

Von Heijne, G. (1983) *Eur. J. Biochem.*, 133, 17.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. ja Messing, J. (1985) *Gene*, 33, 103.

20 Zoller, M. J. ja Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468.

Sekvenssilistaus

25 SEQ ID No: 1

SEKVENSSITYYPPI: nukleotidi vastaavan proteiinin kanssa

SEKVENSSIN PITUUS: 1920 emäsparia

JUOSTEISUUS: kaksinkertainen

TOPOLOGIA: lineaarinen

30 MOLEKYYLITYYPPI: genominen DNA

ALKUPERÄINEN ORGANISMILÄHDE: *Lactococcus lactis* LM0230
(DSM 5805)

VÄLITÖN KOELÄHDE: plasmidi pUCRS (DSM 5803)

ASEMA GENOMISSA: kromosomaalinen

YKSITYISKOHDAT:

1 - 410 osa promoottorialuetta

411 - 491 MSP-signaalipeptidi

492 - 1793 kypsä MSP-proteiini

5 OMINAISUUDET: *L. lactis*in pääeritystuotegeeni (MSP)

TTTAGGTATT	TACGGAATTG	CGACCTTATT	GTTCCCACTT	40
ATTGCTCTTT	TTGTATATAA	TATACAAATA	ACTATATTTA	80
CTAATCGCTG	GACAAGGCTT	TTTACAACAA	TTATTATTGT	120
GACCGCTTTT	GAAGTTTTTA	GTGCAATCAT	TATGACAGCT	160
TTTGGATTTG	CCCAACTTCA	GTTTATCAAA	TTTGTTGTTT	200
ACCAGTTAGC	GCCTACACTT	TTGCTCAATA	TTATCTTAGC	240
TGTAGCCTTA	CAATTCCCTT	TAGAAATCTT	TTACAGATTA	280
AAGAAAAGTC	ATGTAAGATA	CAATTAGAAA	GTGTTTTGTA	320

ATCATAAAGA AATATTAAGG TGGGGTAGGA ATAGTATAAT	360
ATGTTTATTC AACCGAACTT AATGGGAGGA AAAATTAATAA	400
AAGAACAGTT ATG AAA AAA AAG ATT ATC TCA GCT	434
Met Lys Lys Lys Ile Ile Ser Ala	
5	
ATT TTA ATG TCT ACA GTG ATA CTT TCT GCT GCA	467
Ile Leu Met Ser Thr Val Ile Leu Ser Ala Ala	
10 15	
GCC CCG TTG TCA GGT GTT TAC GCT GAC ACA AAC	500
Ala Pro Leu Ser Gly Val Tyr Ala Asp Thr Asn	
20 25 30	
TCA GAT ATT GCT AAA CAA GAT GCG ACA ATT TCA	533
Ser Asp Ile Ala Lys Gln Asp Ala Thr Ile Ser	
35 40	
AGC GCG CAA TCT GCT AAA GCA CAA GCA CAA GCA	566
Ser Ala Gln Ser Ala Lys Ala Gln Ala Gln Ala	
45 50	
CAA GTT GAT AGC TTG CAA TCA AAA GTT GAC AGC	599
Gln Val Asp Ser Leu Gln Ser Lys Val Asp Ser	
55 60	
TTA CAA CAA AAG CAA ACA AGT ACT AAA GCA CAA	632
Leu Gln Gln Lys Gln Thr Ser Thr Lys Ala Gln	
65 70	
ATC GCT AAA ATC GAA AGC GAA CGT AAA GCA CTT	665
Ile Ala Lys Ile Glu Ser Glu Arg Lys Ala Leu	
75 80 85	
AAT GCT CAA ATT GCT ACT TTG AAC GAA AGT ATC	698
Asn Ala Gln Ile Ala Thr Leu Asn Glu Ser Ile	
90 100	
AAA GAA CGT ACA AAG ACA TTG GAA GCT CAA GCA	731
Lys Glu Arg Thr Lys Thr Leu Glu Ala Gln Ala	
105 110	

CGT	AGT	GCT	CAA	GTT	AAC	AGC	TCA	GCA	ACA	AAT	764
Arg	Ser	Ala	Gln	Val	Asn	Ser	Ser	Ala	Thr	Asn	
		115					120				
TAT	ATG	GAT	GCT	GTT	GTT	AAT	TCA	AAA	TCT	TTG	797
Tyr	Met	Asp	Ala	Val	Val	Asn	Ser	Lys	Ser	Leu	
		125					130				
ACA	GAT	GTT	ATT	CAA	AAA	GTA	ACA	GCT	ATT	GCT	830
Thr	Asp	Val	Ile	Gln	Lys	Val	Thr	Ala	Ile	Ala	
		135				140				145	
ACT	GTT	TCT	AGT	GCC	AAC	AAA	CAA	ATG	TTG	GAA	863
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Asn	Lys	Gln	Met	Leu	Glu	
				150					155		
CAA	CAA	GAA	AAA	GAG	CAA	AAA	GAG	CTT	AGC	CAA	896
Gln	Gln	Glu	Lys	Glu	Gln	Lys	Glu	Leu	Ser	Gln	
				160					165		
AAG	TCA	GAA	ACT	GTT	AAA	AAG	AAC	TAC	AAC	CAG	929
Lys	Ser	Glu	Thr	Val	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asn	Gln	
				170					175		
TTC	GTT	TCT	CTT	TCA	CAA	AGT	TTG	GAT	TCT	CAA	962
Phe	Val	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Gln	
				180					185		
GCT	CAA	GAA	TTG	ACT	TCA	CAA	CAA	GCT	GAA	CTC	995
Ala	Gln	Glu	Leu	Thr	Ser	Gln	Gln	Ala	Glu	Leu	
				190					195		200
AAA	GTT	GCG	ACT	TTG	AAC	TAT	CAA	GCA	ACA	ATT	1028
Lys	Val	Ala	Thr	Leu	Asn	Tyr	Gln	Ala	Thr	Ile	
					205				210		
GCA	ACT	GCG	CAA	GAT	AAA	AAA	CAA	GCT	TTA	TTA	1061
Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Lys	Lys	Gln	Ala	Leu	Leu	
				215					220		

GAT	GAA	AAA	GCA	GCT	GCA	GAA	AAA	GCA	GCT	CAA		1094
Asp	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Gln		
		225						230				
GAA	GCA	GCT	AAA	AAA	CAA	GCG	GCT	TAT	GAA	GCT		1127
Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Gln	Ala	Ala	Tyr	Glu	Ala		
		235						240				
CAA	CAA	AAA	GAA	GCA	GCA	CAA	GCA	CAA	GCA	GCT		1160
Gln	Gln	Lys	Glu	Ala	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Ala		
		245					250				255	
TCA	ACA	GCA	GCA	ACT	GCT	AAA	GCT	GTA	GAA	GCA		1193
Ser	Thr	Ala	Ala	Thr	Ala	Lys	Ala	Val	Glu	Ala		
				260						265		
GCA	ACT	TCA	TCA	GCT	TCT	GCT	TCA	TCT	AGT	CAA		1226
Ala	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Gln		
				270						275		
GCT	CCA	CAA	GTA	AGT	ACA	AGC	ACT	GAT	AAT	ACA		1259
Ala	Pro	Gln	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Asp	Asn	Thr		
		280								285		
ACA	TCA	AAT	GCT	AGT	GCC	TCA	AAC	AGT	TCT	AAT		1292
Thr	Ser	Asn	Ala	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	Asn		
		290								295		
AGT	TCA	TCA	AAC	TCA	AGT	TCA	AGT	TCT	AGC	AGT		1325
Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser		
		300								310		
TCA	TCA	AGC	TCA	AGC	TCA	AGC	TCA	AGT	AAT	TCT		1358
Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser		
				315						320		
AAT	GCT	GGT	GGG	AAT	ACA	AAT	TCA	GGC	ACT	AGT		1391
Asn	Ala	Gly	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	Gly	Thr	Ser		
				325						330		
ACT	GGA	AAT	ACT	GGA	GGA	ACA	ACT	ACT	GGT	GGT		1424
Thr	Gly	Asn	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly	Gly		
		335								340		

AGC	GGT	ATA	AAT	AGT	TCA	CCA	ATT	GGA	AAT	CCT	1457
Ser	Gly	Ile	Asn	Ser	Ser	Pro	Ile	Gly	Asn	Pro	
	345					350					
TAT	GCT	GTT	GGT	GGA	TGT	ACT	GAC	TAT	GTA	TGG	1490
Tyr	Ala	Val	Gly	Gly	Cys	Thr	Asp	Tyr	Val	Trp	
355						360				365	
CAA	TAC	TTT	GCT	GCA	CAA	GGA	ATT	TAT	ATC	AGA	1523
Gln	Tyr	Phe	Ala	Ala	Gln	Gly	Ile	Tyr	Ile	Arg	
					370					375	
AAT	ATC	ATG	CCT	GGT	AAT	GGT	GGA	CAA	TGG	GCT	1556
Asn	Ile	Met	Pro	Gly	Asn	Gly	Gly	Gln	Trp	Ala	
					380					385	
TCT	AAT	GGA	CCT	GCC	CAA	GGC	GTG	CTC	CAT	GTT	1589
Ser	Asn	Gly	Pro	Ala	Gln	Gly	Val	Leu	His	Val	
					390					395	
GTA	GGA	GCT	GCT	CCT	GGT	GTT	ATC	GCA	TCA	AGC	1622
Val	Gly	Ala	Ala	Pro	Gly	Val	Ile	Ala	Ser	Ser	
					400					405	
TTC	TCA	GCT	GAT	TTT	GTT	GGA	TAT	GCA	AAC	TCA	1655
Phe	Ser	Ala	Asp	Phe	Val	Gly	Tyr	Ala	Asn	Ser	
410						415				420	
CCT	TAC	GGT	CAC	GTA	GCT	ATT	GTA	AAA	TCA	GTT	1688
Pro	Tyr	Gly	His	Val	Ala	Ile	Val	Lys	Ser	Val	
						425				430	
AAT	TCA	GAT	GGT	ACA	ATT	ACT	ATC	AAA	GAA	GGC	1721
Asn	Ser	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Lys	Glu	Gly	
						435				440	
GGA	TAT	GGT	ACA	ACT	TGG	TGG	GGA	CAT	GAA	CGT	1754
Gly	Tyr	Gly	Thr	Thr	Trp	Trp	Gly	His	Glu	Arg	
						445				450	
ACT	GTA	AGT	GCG	TCT	GGT	GTT	ACT	TTC	TTG	ATG	1787
Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Phe	Leu	Met	
						455				460	

CCA AAC TAG AAAAAAGTCT TAATAAATAA AAAATAGTGG 1826
 Pro Asn

465

5 TTTGATAGTG GGAATAATT TTCCTTCTGT CAAATCATT 1866
 TTTATTATTG TGGTATAATA ATAAGGAAAA ATGATAAGGG 1906
 GATAGATACA AATG 1920

SEQ ID No: 2

10 SEKVENSISITYYPPI: nukleotidi vastaavan polypeptidin kanssa
 SEKVENSIN PITUUS: 279 bp
 JUOSTEISUUS: kaksinkertainen
 TOPOLOGIA: lineaarinen
 MOLEKYYLITYYPPI: yhdistelmä

15 ALKUPERÄISET LÄHDEORGANISMIT: *L. lactis* LM0230 (DSM 5805),
Hirudo medicinalis
 VÄLITÖN KOELÄHDE: plasmidi pUCRS (DSM 5803), plasmidi
 pML310 (katso eurooppalainen patenttihakemus EP-A-168 342)
 YKSITYISKOHDAT:

20 1 - 81 bp MSP signaalipeptidi
 82 - 279 bp:n desulfatohirudiinin koodausalue

OMINAISUUDET: *L. lactis* LM0230 DNA:n, joka koodaa MSP-sig-
 naalipeptidiä, ja hirudiinin rakennegeenin fuusio eritetyn
 hirudiinin tuottamiseen bakteereissa.

ATG AAA AAA AAG ATT ATC TCA GCT ATT TTA ATG TCT 36
 Met Lys Lys Lys Ile Ile Ser Ala Ile Leu Met Ser
 -25 -20

ACA GTG ATA CTT TCT GCT GCA GCC CCG TTG TCA GGT 72
 Thr Val Ile Leu Ser Ala Ala Ala Pro Leu Ser Gly
 -15 -10 -5

GTT TAC GCT GTT GTT TAC ACC GAC TGC ACC GAA TCT 108
 Val Tyr Ala Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser

GGT	CAG	AAC	CTG	TGC	CTG	TGC	GAA	GGT	TCT	AAC	GTT	144
Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys	Glu	Gly	Ser	Asn	Val	
10					15					20		
TGC	GGT	CAG	GGT	AAC	AAA	TGC	ATC	CTG	GGT	TCT	GAC	180
Cys	Gly	Gln	Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	
			25					30				
GGT	GAA	AAA	AAC	CAG	TGC	GTT	ACC	GGC	GAA	GGT	ACC	216
Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	
	35					40					45	
CCG	AAA	CCG	CAG	TCT	CAC	AAC	GAC	GGT	GAC	TTC	GAA	252
Pro	Lys	Pro	Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe	Glu	
				50					55			
GAA	ATC	CCG	GAA	GAA	TAC	CTG	CAG	TAG				279
Glu	Ile	Pro	Glu	Gln	Tyr	Leu	Gln					
		60					65					

Patenttivaatimukset

1. Hybridivektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

5

a) plasmidin pUCRS likimäärin 3,5 kbp:n EcoRI/SalI L. lactis-insertin, tai sen funktionaalisen fragmentin, tai

10

b) DNA-sekvenssin, joka hybridisoituu mainitun insertin kanssa tai sen funktionaalisen fragmentin kanssa, tai joka käsittää promoottorialueen, joka on luonnollisesti operatiivisesti liittynyt sellaiseen hybridisoituvaan DNA-sekvenssiin, tai

15

c) sellaisen DNA-sekvenssin, joka kuuluu ryhmään a) tai b) ja joka koodaa signaalipeptidiä, degeneraattisekvenssin, tai

20

d) sellaisen DNA-molekyylin, joka kuuluu ryhmään a), b) tai c), johdannainen, ja/tai

25

e) (I) L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidin replikaation aloituskohdan, tai (II) L. lactis LL712:n 5,2 Md:n plasmidin replikaation aloituskohdan, tai (III) saman inkompatibiliteettiryhmän plasmidin kuin L. lactis LL712:n 2,5 Md:n plasmidi tai 5,2 Md:n plasmidi, replikaation aloituskohdan.

30

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridivektori, t u n n e t t u siitä, että mainittu funktionaalinen fragmentti pitää sisällään MSP-promoottori-, signaali- ja/tai rakennefunktiot.

35

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen hybridivektori, t u n n e t t u siitä, että funktionaalinen fragmentti, joka

pitää sisällään promoottorifunktion, ulottuu pre-MSP-sekvenssin alkukodonista MSP-geenin emäkseen noin asemassa -1500 asti.

5 4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että funktionaalinen fragmentti, joka
pitää sisällään MSP-signaalifunktion, ulottuu DNA-sekvens-
sin SEQ ID No. 1 emäksestä noin asemassa 411 noin asemaan
491.

10

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että funktionaalinen fragmentti, joka
pitää sisällään MSP-rakennegeenin funktion, ulottuu emäk-
sestä noin asemassa 492 DNA-sekvenssin SEQ ID No. 1 noin
15 asemaan 1793.

15

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää replikaation alkukoh-
dan, joka sijaitsee L. lactis 712:n 2,5 Md:n plasmidin li-
20 kimäärin 1,8 kbp:tä pitkässä NdeI/SphI-fragmentissa.

20

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää replikaation alkukoh-
dan, joka sijaitsee L. lactis 712:n 5,2 Md:n plasmidin 1,0
25 kbp:n NdeI/HindIII-fragmentissa.

25

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että se on pUCRS, pSC12, pSC12ΔP,
pSC12ΔN, pSC12ΔNP, pSC18, pSC18ΔP, tai pSC18ΔN, pSC12HIR,
30 pSC12HIR-1, pSC12HIRTerm, M13mp18RS, M13mp19H, pVAHIR tai
pVAHIR-1.

30

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen hybridivektori, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää homologisen tai hetero-
35 logisen rakennegeenin, joka on operatiivisesti liitetty

35

oikeassa lukukehyksessä DNA-sekvenssiin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä, ja MSP-promoottoriin tai heterologiseen promoottoriin.

5 10. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen hybridivektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

A) viljellään isäntää, joka käsittää kyseisen DNA-molekyylin ja eristetään sellainen DNA-molekyyli mainitusta viljellystä isännästä, tai
10

B) valmistetaan kyseinen DNA-molekyyli in vitro synteesillä.

15 11. Isäntä, joka on transformoitu patenttivaatimuksen 1 mukaisella hybridivektorilla.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen transformoitu isäntä, joka on E. coli-kanta TG1, C600 tai HB101 transformoituna jollakin plasmideista pUCRS, pSC12, pSC12ΔP, pSC12ΔN, pSC12ΔNP, pSC18, pSC18ΔN, pSC18ΔP, pSC12HIR, pSC12HIR-1 tai pSC12HIRTerm, tai L. cremoris-, plasmidivapaa L. lactis- tai Bacillus-kanta transformoituna jollakin seuraavista: pUCRS, pSC12, pSC12ΔP, pSC12ΔN, pSC12ΔNP, pSC18, pSC18ΔN, pSC18ΔP, pVAHIR, pVAHIR-1, pSC12HIR, pSC12HIR-1 tai pSC12HIRTerm.
20
25

13. Menetelmä patenttivaatimuksen 11 mukaisen transformoidun isännän valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että
30 (a) käsitellään isäntää transformoimisolosuhteissa patenttivaatimuksen 1 mukaisella hybridivektorilla, mahdollisesti yhdessä valintamarkkerigeenin kanssa, ja (b) valikoidaan transformantit.

35 14. Menetelmä polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t -

t u siitä, että (a) fuusioidaan homologinen tai heterologinen rakennegeeni oikeassa lukukehyksessä DNA-sekvenssin, joka koodaa MSP-signaalipeptidiä, (b) transformoidaan sopiva isäntä hybridivektorilla, joka käsittää kohdassa (a) valmistetun fuusioitun geenin, (c) eristetään isäntäsoluista polypeptidi, jota mainittu fuusioitu geeni koodaa, ja, haluttaessa (d) eristetään polypeptidi supernatantista tavanomaisten menetelmien mukaisesti.

10 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään bakteeri-isäntää, joka ei eritä viljelyelatusaineeseen proteaasia, joka hajottaa ilmennetyn proteiinin.

15 16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään L. lactis- tai B. thuringiensis-soluja.

20 17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että (a) transformoidut solut kerätään elatusaineesta joko viljelmän logaritmisessa vaiheessa tai stationäärisessä vaiheessa, (b) ne uudelleensuspendoidaan pienempään tilavuuteen tuoretta elatusainetta tai sopivaa puskuriliuosta ja (c) niitä edelleen inkuboidaan ennen
25 halutun tuotteen eristämistä supernatantista.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että L. lactis LM0230-solut, jotka on transformoitu pSC12HIR:llä, uudelleensuspendoidaan noin
30 1/10 tilavuuteen tuoretta elatusainetta ja inkuboidaan noin 30 minuuttia noin 30 °C:ssa.

19. MSP puhtaassa muodossa.

35 20. Menetelmä puhtaan MSP:n tuottamiseksi, t u n n e t -

t u siitä, että (a) saostetaan proteiinit L. lactis LM0230:n supernatantista trikloorietikkahapolla, (b) elektroforesoidaan saostettu proteiini SDS-polyakryyliamidi-geelillä, (c) leikataan alueet pois, joissa on pääproteiini-
5 niuova ja (d) elektroluodaan MSP geelistä.

Figure 1

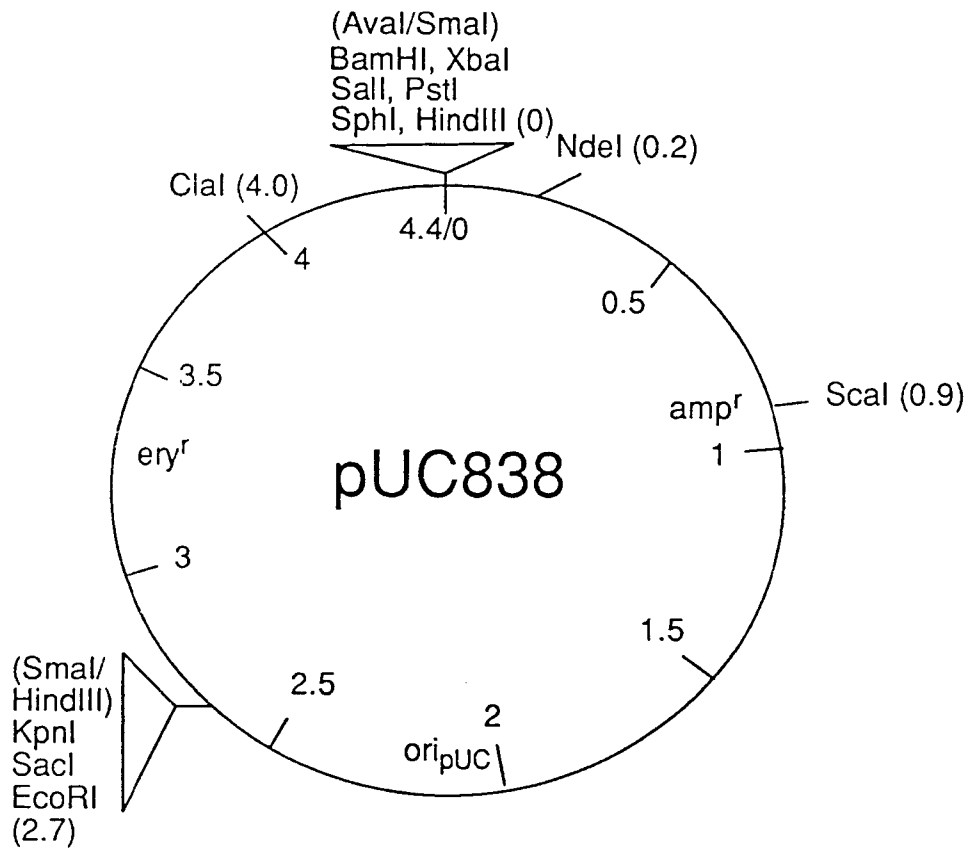


Figure 2

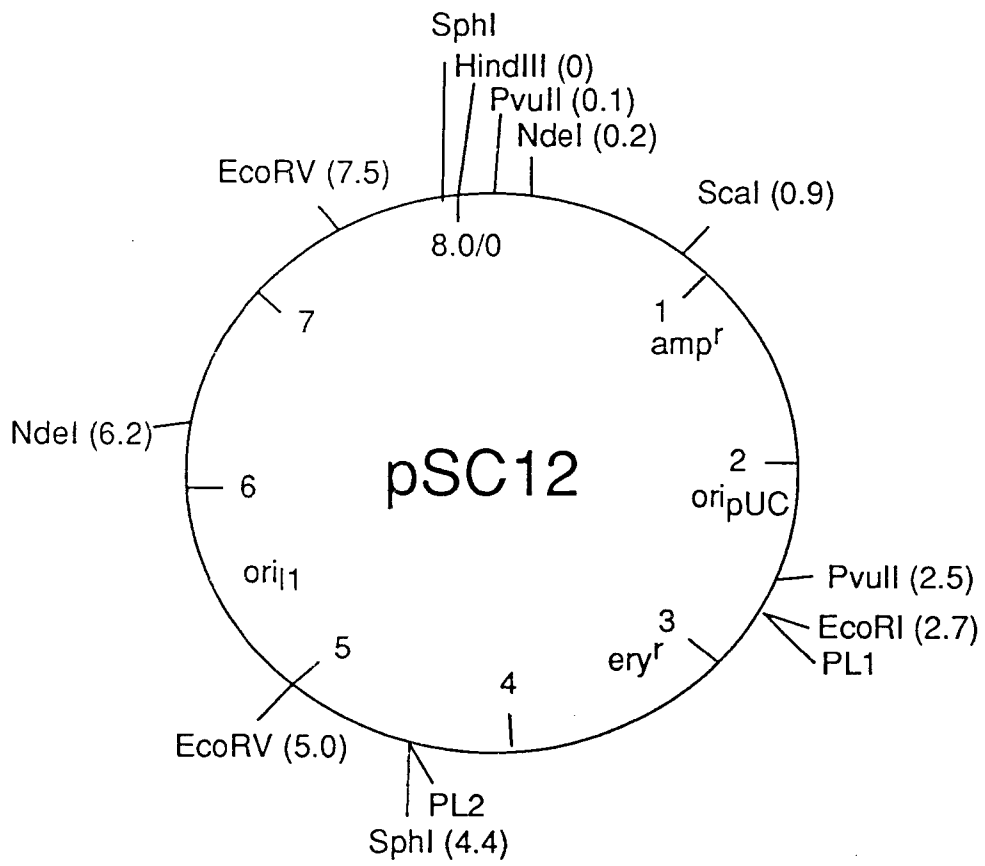
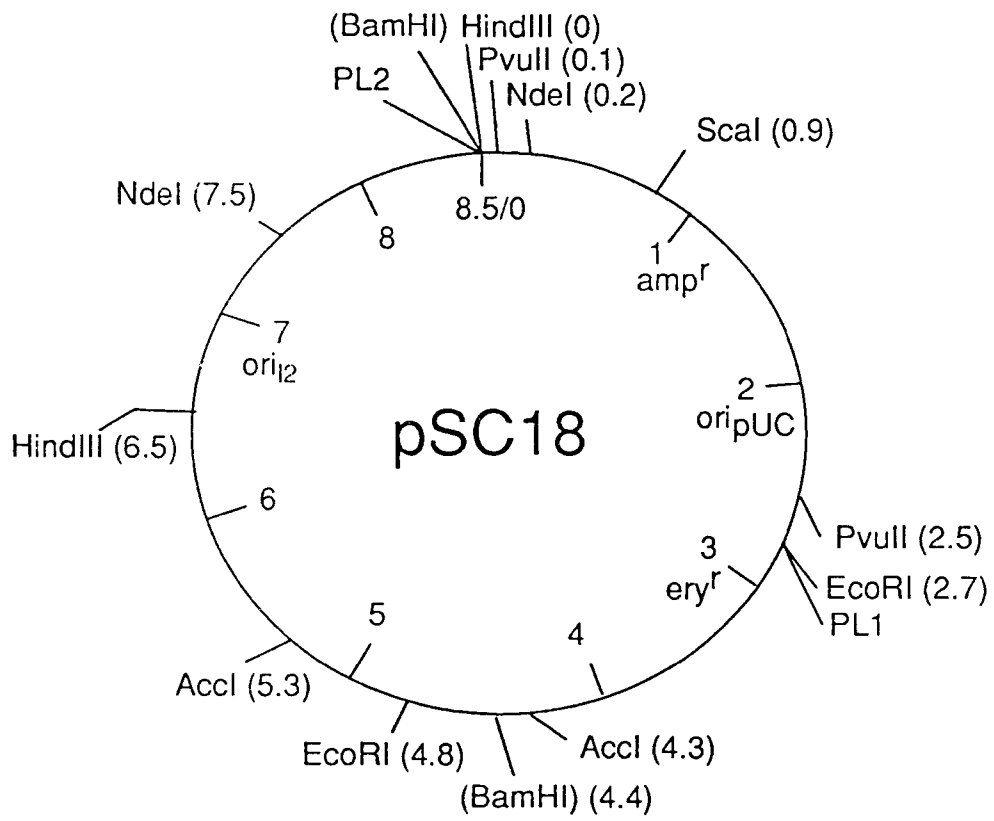


Figure 3



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

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

EP -A 228 726 (C92 N 15/60)

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Gasson, M.J., J. Bacteriol. 154(1) 1983,
1-9

Gasson, M.J. et al., FEMS Microbiol. Lett.,
30, 1985, 193-96

18/7-97 

Allekirjoitus