

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 873482 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **873482**

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

C12N 15/31

C12N 15/65

C12R 1:465

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **11.08.1987**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.08.1987**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **14.02.1988**

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

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

13.08.1986 DE P_3627405.4

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Muth, Guenter, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

2 • Wohlleben, Wolfgang, Bielefeld, SAKSA, (DE)

3 • Pühler, Alfred, Bielefeld, SAKSA, (DE)

4 • Wöhner, Gerhard, BRD, SAKSA, (DE)

5 • Marquardt, Ruediger, TOWN UNKNOWN, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Streptomyces-plasmideissa oleva värimarkkeri.

Färgmärkäme i Streptomyces-plasmider.

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

3030 DSM

Streptomyces-plasmideissa oleva värimarkkeri

Streptomykeetoissa tehtävään kloonaukseen käytettynä värimarkkerina on tähän asti tunnettu mel-geeni [E. Katz
 5 et al., J. Gen. Microbiol. 129 (1983) 2703], joka koodaa tyrosinaasia ja saa siten - välivaiheiden kautta - aikaan väriaineen, melaniinin, tuotannon. Tämä geeni esiintyy esimerkiksi kaupallisesti saatavissa olevassa plasmidissa pIJ702, jota markkinoi John Innes Foundation, Norwich,
 10 Englanti, ja jota kuvaavat esimerkiksi D.A. Hopwood et al. (Genetic Manipulation of Streptomyces - A Laboratory Manual, The John Innes Foundation 1985, s. 292 -). Tämän markkerin epäkohtana on kuitenkin se, että muodostunut väriaine diffundoituu helposti ympäröivään väliaineeseen.

15 Nyt on löydetty väriainemarkkeri, joka ilmentyy streptomykeetoissa ja saa aikaan väliaineessa syvänsinisen - mustan voimakkaan värin, joka kuitenkin diffundoituu vain vähäisessä määrin kiinteisiin väliaineisiin. Sen avulla voidaan inaktivoitumismarkkerina käytettäessä tunnistaa helposti
 20 ti myös sangen harvinaisia tapahtumia.

Keksintö koskee siten geeniä, joka koodaa streptomykeetoissa sinistä väriainetta ja joka on saatavissa pilkkomalla BamHI:llä Streptomyces coelicolor DSM 3030:n kokonais-DNA, eristämällä noin 5,5 ke:n pituinen fragmentti ja tekemällä valikointi väriainetuotannon perusteella. Tämän geenin tarkemmat ominaispiirteet käyvät ilmi kuvan 1 esittämästä restriktiokartasta. Lähtökanta S. coelicolor DSM 3030
 25 mainitaan EP-hakemusjulkaisussa 0 181 562 erään bakteereja hajottavan entsyymin tuottajana.

30 Keksintö koskee lisäksi keksinnön mukaisen geenin käyttämistä markkerina, erityisesti inaktivoitumismarkkerina, streptomykeettaplasmeissa.

Keksinnön muut puolet ja sen edulliset suoritusmuodot käyvät ilmi seuraavasta kuvauksesta ja patenttivaatimuksista.
 35 ta.

Markkerigeenin eristämiseksi eristetään kokonais-DNA kannasta Streptomyces coelicolor DSM 3030 pilkkomalla restriktioentsyymillä BamHI, tehdään "shot gun"-kloonaus sopivaan vektoriin, transformoidaan streptomykeetta-vastaan-

5 ottajakanta ja tehdään valikointi väriainetuotannon perusteella. Positiiviset kloonit sisältävät noin 5,5 ke:n pituisen DSM 3030:sta peräisin olevan fragmentin.

Muodostuva sininen väriaine ei ole - toisin kuin vil-

10 lissä tyypissä muodostuva vesiliukoinen väriaine - veteen liukeneva; tosin se dispergoituu hyvin veteen. Kuva 2 esittää vesipohjaisen viljelmäsupernatantin UV-absorptiospekttriä. Absorptiomaksimi esiintyy aallonpituudella 660 nm ja minimi aallonpituudella 460 nm. Pesäkkeiden lähes mustan värin aiheuttaa suuri väriainepitoisuus. Kiinteässä alustas-

15 sa pääosa väriaineesta pysyy sitoutuneena myseeliin, ja vain pieni osa diffundoituu alustaan. Mikroskoopin alla näkyy luonteenomainen kuva: väriaine sijaitsee myseeleissä tiheissä pallomaisissa kappaleissa ja saa siten pesäkkeet näyttämään lähes mustilta. Nesteviljelmässä (Tryptic soya broth,

20 "Lysemedium A", EP-hakemusjulkaisu 0 158 872, s. 6) saadaan noin 3 vrk:n kuluttua voimakkaan siniseksi värjäytynyt viljelmäsupernatantti. Myös kiinteissä alustoissa tapahtuu väriainetuotanto riippumatta käytettävästä alustasta ["R2YE" (Hopwood *et al.*, *loc. cit.*), sporulaatioalusta (DE-hakemus-

25 julkaisu 3 331 869, esimerkki 1, kolmas alusta), "Penassay", "Penassay", johon on lisätty antibiootteja]. Sininen väriaine muodostuu jo pesäkkeiden kasvun alussa, eikä siten ole ilmeisesti sekundaarisen aineenvaihdunnan tuote.

Kuvan 1 mukaisessa 5,5 ke:n fragmentissa on joukko

30 alakloonauskokeisiin soveltuvia pilkkoutumiskohtia. Se ei sisällä entsyymeille BclI, BglII, HindIII, HpaI, EcoRI eikä ClaI sopivia pilkkoutumiskohtia, ja sisältää yli 4 SstII- ja PvuII-pilkkoutumiskohtaa.

Isäntäkannaksi soveltuvat kloonauskokeita varten

35 kaikki tähän asti tutkitut streptomykeettalajit; muodostuneen väriaineen määrä voi kuitenkin vaihdella lajista toi-

seen ja lisäksi kannasta toiseen. Värjäytymisen voimakkuuden takia soveltuu keksinnön mukainen markkerijärjestelmä kuitenkin ennen kaikkea kantoihin, joissa ilmentyminen on heikohkoa.

5 Esitettyjen etujen ansiosta keksinnön mukainen markkeri ei sovellu pelkästään yleisesti kloonauskokeisiin, vaan myös erityisesti aineenvaihduntareittien jäljittämiseen streptomykeetoissa, jotka tunnetusti ovat tärkeitä anti-
10 bioottien ja myös muiden aineenvaihduntatuotteiden tuottajia.

Keksintöä valaistaan tarkemmin seuraavissa esimerkeissä. Prosenttisuudet ja osuudet ovat painoprosentteja ja -osuuksia, ellei toisin mainita.

 Kuvat ovat oikeassa mittakaavass^a/polykytkijäalueita
15 lukuun ottamatta.

Esimerkki 1: Vektorin pGM4 valmistus

 Plasmidista pGM1 (EP-hakemusjulkaisu 0 158 872, kuva 2) otetaan talteen 3,0 ke:n fragmentti pilkkomalla osittain SstII:lla. Plasmidista pSLE16 (EP-hakemusjulkaisu 0 158 201,
20 kuva 18) otetaan talteen SstII:lla pilkkomalla 1 ke:n fragmentti, joka sisältää neomysiiniresistenssigeenin aphI. Ligatoimalla nämä kaksi fragmenttia saadaan plasmidi pGM3 (kuva 3).

 Plasmidista pSLE41 (EP-hakemusjulkaisu 0 158 201,
25 kuva 20) otetaan talteen BcII-pilkonnalla 1 ke:n fragmentti, jonka yksisäikeiset päät täydennetään Klenow-polymeraasilla.

 pGM3 pilkotaan sitten PvuII:lla, ja poistetaan 0,3 ke:n fragmentti. Loppuosa plasmidista ligatoidaan sitten tylppäpäiseksi tehdyn BcII-fragmentin kanssa, jolloin saa-
30 daan plasmidi pGM4 (kuva 4).

Esimerkki 2: Geenikirjaston valmistus

S. coelicolor DSM 3030 hajotetaan, ja eristetään DNA tunnetulla tavalla. Tämä pilkotaan täydellisesti BamHI:llä. Plasmidi pGM4 (kuva 4) pilkotaan BamHI:llä, käsitellään alka-
35 lisella fosfataasilla ja ligatoidaan BamHI-fragmenttien kanssa. Siten saadulla plasmidipopulaatiolla transformoi-

daan vastaanottajakanta S. lividans TK 23 (saatavana John Innes Foundationista). Käyttämällä 1 µg ligaatioseosta saadaan noin 20 000 tiostreptoniresistenttiä transformanttia, joista 80 % on neomysiinille herkkiä ja sisältävät siten
5 insertin.

Esimerkki 3: Markkerigeenin eristäminen

Voimakkaan sinimustiksi värjäytynyt^{cel} transformanttipesäkkeet erotettiin, ja eristettiin näistä klooneista plasmidi-DNA. Tätä seurannut S. lividans TK 23:n uudelleentrans-
10 formointi johti pelkästään sinimustiksi värjäytyneisiin pesäkkeisiin.

Plasmidi-DNA:n karakterisointi osoitti, että 5,5 ke:n BamHI-fragmentti oli insertoitunut pGM4:n aphI-geeniin, jota karakterisoidaan kuvassa 1. Tämä plasmidi nimettiin
15 pGM98:ksi.

Esimerkki 4: Muiden streptomykeettalajien transformointi

Plasmidilla pGM98 transformoitiin erilaisia S. prasinus (DSM 40099), S. viridochromogenes (DSM 40736 =
20 DSM 4112) ja S. ghanaensis (DSM 2932, ATCC 14672)-kantoja.

Kaikissa kannoissa oli havaittavissa väriaineen muodostumista, joka oli kuitenkin S. prasinusissa jonkin verran vähäisempää kuin S. lividansissa mutta jonkin verran voimakkaampaa kuin S. ghanaensisissa. Plasmidihäviöitä ei
25 havaittu yhdessäkään tapauksessa.

Plasmidilla pGM98 transformoitiin myös S. coelicolor DSM 3030. Tässä tapauksessa alkaa väriaineen muodostus heti, kun taas lähtökannassa (villi tyyppi) se on havaittavissa vasta 3 vrk:n kuluttua. Lisäksi esiintyy väriaineen
30 tuotantoa myös alustoilla, joilla villi tyyppi ei muodosta sinistä väriainetta.

Patenttivaatimukset

1. Sinistä väriainetta streptomykeetoissa koodaava geeni, t u n n e t t u siitä, että se saadaan Streptomyces
5 coelicolor DSM 3030:n kokonais-DNA:sta pilkkomalla BamHI:llä, kloonamalla noin 5,5 ke:n pituinen fragmentti ja tekemällä valikointi väriainetuotannon mukaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen geeni, t u n n e t t u siitä, että sillä on kuvan 1 mukainen restriktiokartta.

10 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen geenin käyttö, t u n n e t t u siitä, että sitä käytetään markkerina streptomykeettaplasmeissa.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen geenin käyttö, t u n n e t t u siitä, että sitä käytetään inaktivoitumismark-
15 kerina streptomykeetti-plasmeissa.

2
5. Sininen väriaine, t u n n e t t u siitä, että saadaan patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen geenin avulla.

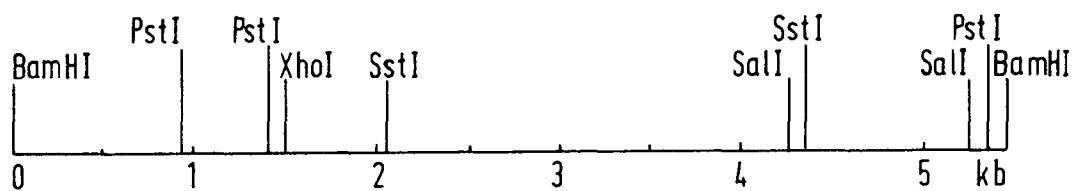


FIG. 1

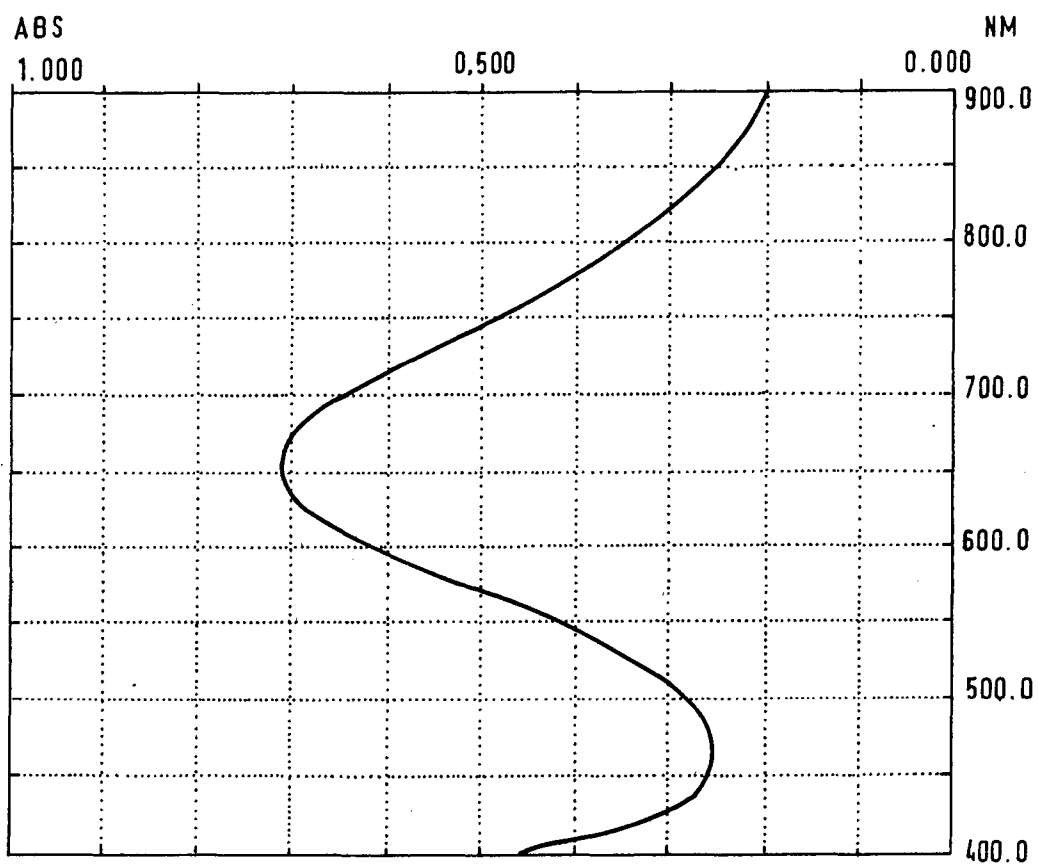
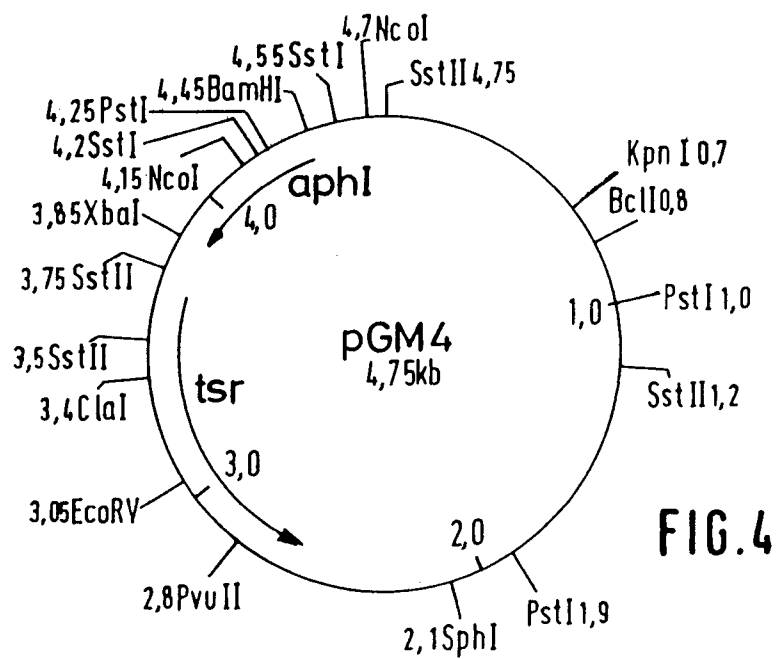
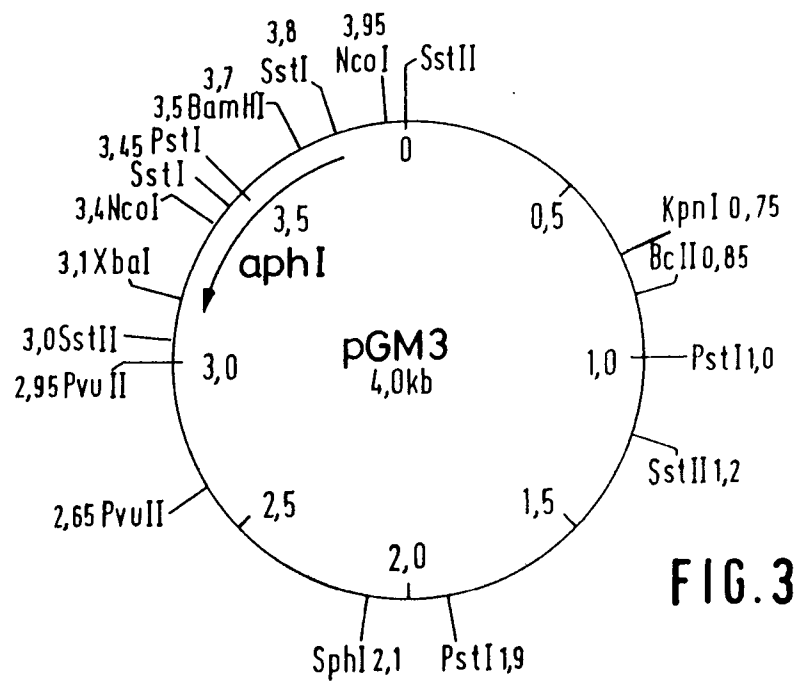


FIG. 2



TUTKIMUSRAPORTTI

KÄÄNNÄ!

