

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 813069 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 813069

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
C12N

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 02.10.1981

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 02.10.1981

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 04.04.1982

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

03.10.1980 US 193556 18.06.1981 US 275088

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Eli Lilly and Company, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Ind. 46206, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Hershberger, Charles Lee, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Radue, Anna Kay, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Rosteck, Jr., Paul Robert, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

**Menetelmä, jolla voidaan stabiloida ja identifioida isäntäsoluja, jotka sisältävät hyödyllisiä polypeptidejä ekspressoivia
yhdistelmä-DNA-molekyyleja**

**Förfarande för stabiliserande och identifierande av värdceller, vilka innehåller rekombinant-DNA-molekyler för expression av
nyttiga polypep tider**

Menetelmä, jolla voidaan stabiloida ja identifioida isäntäsoluja, jotka sisältävät hyödyllisiä polypeptejä ekspressoivia yhdistelmä-DNA-molekyylejä

5 Keksinnön kohteena on menetelmä isäntäsolujen, jotka sisältävät rekombinantti-DNA:n, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, stabiloimiseksi ja valitsemiseksi, sekä uusia organismeja ja kloonaus-vektoreita, joita käytetään menetelmän käytännössä. Keksintö voidaan sovittaa antamaan yksinkertainen, mukava ja halpa menetelmä isäntäsolujen hajottamiseksi solunsisäisten tuotteiden puhdistamiseksi.

Erityisesti keksintö antaa menetelmän isäntäsolujen, jotka sisältävät rekombinantti-DNA:n, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, stabiloimiseksi ja valitsemiseksi, jolloin menetelmän mukaisesti:

- a) isäntäsolut transformoidaan rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää sekä repressorigeenin että geenin, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin; ja
- 20 b) lysogenoidaan transformoidut isäntäsolut lysogeenisellä organismilla, joka sisältää merkitsijän, joka on kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava isäntäsoluissa, mutta joka tukahtuu transformoiduissa isäntäsoluissa rekombinantti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; edellytys rajoitukselle, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori sisältää replikonin ja promoottorin, jotka
- 25 ovat herkkiä repressorille, ja edellytyksenä lisärajoitukselle, että kun transformoidut isäntäsolut lyso-genoidaan lysogeenisellä organismilla, joka sisältää geenin, joka on ehdon-
- 30 alaisesti kuolettava, on, että syntyneet isäntäsolut viljellään rajoittavissa olosuhteissa.

Keksintö antaa myös transformoidun isäntäsolun, joka sisältää:

- a) rekombinaatti-DNA-kloonausvektorin, joka sisältää sekä
- 35 repressorigeenin että geenin, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin; ja

b) kromosomaalisen merkitsijän, joka on kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava, mutta joka tukahtuu rekombinantti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; ehtona rajoitukselle on, että rekombinatti-DNA-kloonausvektori sisältää replikonin ja promoottorin, jotka eivät ole herkkiä repressorille.

Keksintö antaa myös menetelmän isäntäsolujen hajoittamiseksi, jonka menetelmän mukaisesti tuodaan kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava merkitsijä, joka aiheuttaa isäntäsolun hajoamisen

a) isäntäsoluihin, jotka on transformoitu rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää repressorigeenin, joka tukahduttaa merkitsijän, joka saa aikaan isäntäsolun hajoamisen ja joka inaktivoituu jossakin lämpötilassa tai sen yläpuolella tietyllä lämpötila-alueella, ja transformoidut isäntäsolut lyseogenoidaan lysogeenisellä organismilla, joka sisältää merkitsijän, joka on luotettava tai ehdonalaisesti kuolettava isäntäsoluissa, mutta joka tukahtuu transformoiduissa isäntäsoluissa rekombinatti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; tai

b) isäntäsoluihin lysogenoimalla isäntäsolut lysogeenisellä organismilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuolettavan merkitsijän, tai transformoimalla isäntäsolut rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuolettavan merkitsijän, ja viljellään syntyneitä isäntäsoluja lämpötilassa, joka inaktivoi repressorin tai tapauksessa, jossa on kysymys ehdonalaisesti kuolettavasta merkitsijästä, lämpötilassa, joka ei ole lämpötila-alueella isäntäsolujen sallivaa viljelyä varten.

Keksintö antaa käytettäväksi selektiivisen systeemin, joka tarjoaa keinon rekombinantti-DNA-isäntäsolujen stabiloimiseksi ja valitsemiseksi käyttämällä kuolettavaa kromosomaalista merkitsijää, jonka tukauttaa geeni, joka syntyy rekombinatti-DNA-kloonausvektorilla. Tämä on erinomaisen tärkeää, koska rekombinatti-DNA-kloonausvektorit, kuten plasmidit, häviävät usein nopeasti bakteeripopulaatioista ja teollismit-

takaavaiset fermentoinnit saattavat vaatia enmmän kuin 10^{16} solusukupolvea. Siten, kun rekombinatti-DNA-, joka koodaa toivottua tuotetta, on kytketty plasmidiin, on toivottavaa ellei olennaista, että mikro-organismiviljely, joka sisältää plasmidin, stabiloidaan niin että kaikki viljelyn muodostavat solut sisältävät halutun plasmidin. Tämä on ratkaisevaa, koska rekombinatti-plasmidit vieraan DNA:n kanssa ovat tunnetusti pysymättömiä ja usein yli 90 % soluista populaatiossa eivät sisällä rekombinatti-plasmidia sen jälkeen kun viljelyä on kasvatettu yli yön. Niin muodoin tuotantokapasiteetti alenee erittäin voimakkaasti, koska haluttujen geenien ekspressoituminen on mahdollista ainoastaan niissä soluissa, jotka pidättävät plasmidin.

Hyvin harvoja tehokkaita menetelmiä on kuvattu rekombinatti-plasmidien stabiloimiseksi ja kaikilla niillä on vakavia haittoja. Eräs menetelmä käsittää antibioottiresistenssigeenin yhdistämisen rekombinantti-plasmideihin ja sitten sopivan antibiootin lisäämisen viljelyväliaineeseen. Solut, jotka pidättävät plasmidin, jossa on antibioottiresistenssigeeni, valitaan puolesta ja ne, jotka menettävät plasmidin, valitaan vastaan ja poistetaan sentähden. Tämän yrityksen päähaittana on, että se vaatii antibiootin käyttämisen käymisväliaineessa ja sen jälkeisen puhdistuksen antibiootin poistamiseksi halutusta tuotteesta.

Auksotrooppisen mutaation täydentäminen kromosomilla on toinen tunnettu menetelmä rekombinantti-plasmidien stabiloimiseksi. Tämä yritys rajoittaa vakavasti käymisväliaineen koostumusta ja vaatii käymisen väliaineessa, joka ei sisällä tarvittavaa isäntäbakteerien ravintoainetta. Lisäksi syntrofismi voi tehdä mahdolliseksi solujen jatkaa kasvuaan plasmidin häviämisen jälkeen. Siten kumpikin valintatyyppi riippuu väliaineen psefisestä käsittelystä. Tällaiset rajoitukset lisäävät fermentointikustannuksia ja rajoittavat käytettävissä olevia vapaita valintoja tuottavuuden parantamiseksi.

Vaihtoehtoisia valintoja, jotka ovat riippumattomia väliaineiden koostumuksesta ja jotka saavat aikaan rekombi-

nantti-DNA-kloonauksvektorin ylläpitämisen kaikissa käymis-
olosuhteissa, tarvitaan kiireellisesti. Soluitsemurha on
sovellutettavissa tämän tarpeen tyydyttämiseksi sikäli,
että itsemurhasolut, jotka sisältävät kuolettavan merkitsi-
5 jän kromosomilla ja repressorin tai täydentävän geenin
rekombinantti-DNA-kloonauksvektorilla, voidaan rakentaa.
Solut, jotka on rakennettu näiden määrittelyjen mukaises-
ti, kuolevat, jos ne menettävät vektorin. Tämä keksintö to-
teuttaa tämän periaatteen ja niin muodoin takaa, että kaik-
10 ki elinvoimaiset solut viljelyssä sisältävät halutun rekombi-
nantti-DNA-kloonauksvektorin. Tämä on erityisen tärkeätä,
koska tällaisten viljelyiden potentiaalinen tuottavuus
lisääntyy ilman mitään edellä kuvatuista haitoista. Tämä
keksintö, kuten se tässä kuvataan, esittää menetelmän plas-
15 midin sisältävän bakteeripopulaation valitsemiseksi ja
ylläpitämiseksi käyttämällä kuolettavaa kromosomaalista
merkitsijää, joka tukahtuu plasmidi-syntyyisen geenin vaiku-
tuksesta.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten ja kuten tässä
20 määritellään on rekombinantti-DNA-kloonauksvektori mikä
tahansa tekijä, joka käsittää, mutta näihin rajoittumatta,
rekombinantti-plasmideja, bakteriofageja ja viruksia, ja
joka koostuu DNA-molekyylistä, johon voidaan lisätä tai on
lisätty yksi tai useampia ylimääräisiä DNA-osasia.

25 Repressori, kuten se tässä määritellään, on geeni,
joka sijaitsee rekombinantti-DNA-kloonauksvektorilla ja joka
tukahuttaa ja estää kuolettavan tai ehdonalaisesti kuoletta-
van geenin ekspressoitumisen isäntäsolun kromosomissa.

Funktionaalinen polypeptidi, kuten se tässä määritel-
30 lään, on talteenotettavissa oleva bioaktiivinen kokonaan
vieraslainen polypeptidi tai prekursori, talteenotetta-
vissa oleva bioaktiivinen polypeptidi, joka koostuu vieras-
lajisesta polypeptidistä ja osasta tai kokonaan samankaltai-
sesta polypeptidistä, tai talteenotettavissa oleva bioinak-
35 tiivinen yhdistelmäpolypeptidi, joka koostuu vieraslajises-
ta polypeptidistä ja bioinaktiivivasta samankaltaisesta

polypeptidistä, joka voidaan spesifisesti pilkkoa.

Yhdistetty geeni-tuote, kuten se tässä määritellään, on talteenotettavissa oleva vieraslainen polypeptidi, joka on yhdistynyt osaan tai kokonaan samankaltaista polypeptidiä.

Merkitsijä, kuten tässä määritellään, on geeni tai geenien yhdistelmä, joiden toiminta ja sijainti kromosomilla tai rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla tunnetaan.

Kuten tässä edellä on mainittu voidaan tätä keksintöä käyttää viljelyjen kasvattamiseen, jotka tuottavat rekombinantti-DNA:n koodaamia tuotteita. Ilman tehokasta valikointia systeemiä monet solut tällaisissa viljelyissä menettävät halutun plasmidin ja siten halutun tuotteen valmistuminen vähenee merkittävästi. Koska tämä keksintö takaa, että kaikki elinvoimaiset solut viljelyssä sisältävät rekombinantti-DNA-kloonausvektorin, viljelyn potentiaalinen tuottavuus paranee käyttämällä keksintöä.

Tämä keksintö on erityisen monipuolisesti käyttökelppoinen, sillä sitä voidaan käyttää minkä tahansa aineen tuottamiseen, jolle synteetis määrää rekombinantti-DNA-kloonausvektori. Edullinen rekombinantti-DNA-kloonausvektori on plasmidi, vaikka bakteriofagi ja muut vektorit, jotka ovat käyttökelpoisia valaisemaan tätä keksintöä, ovat alaan perehtyneille selviä. Keksintö voi myös käyttää mitä tahansa kuolettavaa merkitsijää yhdistettynä isäntäsolun kromosomiin, jos kuolettavuus on vuorovaikutuksessa tai sitä täydentää merkitsijä, joka on yhdistetty sopivaan rekombinantti-DNA-kloonausvektoriin. Koska tämän keksinnön käyttökelpoisuus on riippumaton muista merkitsijöistä, jotka on kloonattu kloonausvektorilla, voidaan keksintöä käyttää rekombinantti-kantojen kanssa, jotka sisältävät yhden tai useampia geenejä, joilla on kaupallista tai tutkimusarvoa.

Bakteriofagin λ vuorovaikutusta E.coli K12 kanssa käytetään kuvaamaan soluitsemurhan käyttökelpoisuutta rekombinantti-DNA-isäntäsolujen ylläpitämiseksi ja stabiloimiseksi. Bakteriofagi λ on pidättyväinen bakteriofagi, joka

seuraa jompaakumpaa kahdesta toinen toisensa poissulkevaa sykliä, kun tartutetaan E. coli Kl2. Liukenevassa faasissa bakteriofagi DNA monistuu itsenäisesti, ohjaa bakteriofagi-komponenttien synteesiä ja kokonaisuutta ja tappaa solut, samanaikaisesti kypsän bakteriofagin vapautumisen kanssa. Lysogeenisessä faasissa bakteriofagi yhdistyy isännän kromosomiin profagina, monistuu merkitsijänä kromosomilla ja salpaa bakteriofagi-komponenttien synteesin. Bakteriofagigeeni, λ cI, koodaa repressorin, joka ylläpitää lysogeenisen tilan ja salpaa geenien ekspressoitumisen bakteriofagi-komponentteja ja kypsymistä varten. Jos repressorin inaktivoidaan tai poistetaan solusta, kehittyy profagi kromosomista, tulee liukenevaan sykliin ja tappaa solun. Bakteriofagi, jossa on puutteellinen λ cI-geeni, ei voi ylläpitää lysogeenistä tilaa ja on kuolettava solulle, ellei funktionaalista repressorin saada vaihtoehtoisesta lähteestä. Tämän keksinnön eräässä valaisevassa suoritussuorituksessa λ cI90 käytetään repressorista riippuvana profagina ja cI-geeni, joka on kloonattu rekombinantti-DNA-kloonausvektoriin, toimii funktionaalisena repressorina.

Tämän keksinnön selektiivinen systeemi ja käyttökelpoisuus voidaan osoittaa kloonamalla bakteriofagin λ cI857-repressorigeeni insuliiniplasmidille pIA2. Plasmidi pIA2 on peräisin pIA1:sta (esittänyt Goeddel et al., 1979, Proc. Nat. Acad. Sci. 76:106-110) ja saatu tetrasykliiniresistenssi-merkitsijän insertiolla. Tetrasykliini- ja muiden antibioottiresistenssimerkitsijöiden insertio tunnetuille plasmideille on alalla hyvin ymmärretty ja sen voi alaan perehtyneet helposti suorittaa. Plasmidin pIA2 pilkontakohta ja funktionaalinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 1. Bakteriofagin λ cI857 repressorigeenin kloonamisesta plasmidille pIA2 on seurauksena uusi plasmidi, joka on merkitty pAR2:ksi ja joka estää bakteriofagin λ lyyttisen kehittymisen ja koodaa ihmisinsuliinin A-ketjun yhdistetyn geenituotteen tuotantoa. Plasmidin pAR2 restriktio- ja funktionaalinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 2.

Tämä uusi pAR2-rekombinantti-plasmidi voidaan transformoida E.coli K12 RV308:aan (esittänyt Mauer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139:147-161) ja sitten syntynyt ketju voidaan lysogenoida bakteriofagilla λ cI90. Koska λ cI90 ei
 5 tuota funktionaalista cI-repressoria, vaatii rakennettu kanta E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR2 pAR2-plasmidin pidättämistä, kun taas rakennettu kanta E.coli K12 RV308/pAR2 pysyy elossa yhtä hyvin ilman plasmidia. Plasmidi retention vertailu näissä kahdessa kannassa osoittaa selvästi, että
 10 pääasiallisesti kaikki elinvoimaiset solut keksinnön mukaisessa kannassa sisältävät halutun plasmidin. Lisäksi E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR2-kanta ei ainoastaan ylläpidä pAR2-plasmidia, vaan tuottaa myös halutun yhdistetyn geenituotteen kuten polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla havaitaan.
 15

Plasmidi pAR2 voidaan myös transformoida E. coli K12 C600R_k-M_k-:een (esittäneet Chang ja Cohen, 1974, Proc. Nat. Acad. Sci. 71:1030-1034):ssa ja sitten syntynyt kanta voidaan lysogenoida bakteriofagilla λ cI90. Rakennettu
 20 E. coli K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pARa-kanta vaatii siten eloonjäämistä varten plasmidin pAR2 ja on siten myös esimerkkinä tästä keksinnöstä.

Lisäesimerkkien esittämiseksi tästä keksinnöstä voidaan käyttää myös muita plasmideja. Esimerkiksi bakteriofagin lambda cro-geeni voidaan kloonata plasmidille
 25 pBR322 (esittänyt Bolivar, 1979, Life Sci. 25:807-818) bakteriofagin λ cI857 BamHI-EcoRI-osasen insertiolla. Uusi plasmidi, joka on merkitty pAR1:ksi, voidaan transformoida E. coli K12 RV308:aan ja sitten syntynyt kanta voidaan lysogenoida bakteriofagilla λ cI90. Samanlainen toimitus voidaan suorittaa myös käyttäen E. coli K12 C600 isäntänä ja bakteriofagia λ cI857 lysogeenisenä organismina. Koska λ cro-geeni tuottaa repressorin, joka korvaa cI-repressorin toiminnan
 30 käy helposti ilmi, että rakennetut kannat E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR1, E. coli K13 C600R_k-M_k- λ cI857/pAR1 ja
 35 E. coli K12 C600 λ cI857/pAR1 vaativat λ cor:n sisältävän plas-

midin eloonjäädäkseen. Kuitenkin, koska λ CI857-repressori inkativoituu 38-44°C:ssa tai sen yläpuolella (rajoittavat olosuhteet) ja aktivoituu alemmissa lämpötiloissa (sallivat olosuhteet), tarvitaan λ cor:n sisältävää plasmidia eloonjääntiä varten ainoastaan jälkimmäisessä kunnassa rajoittavissa viljelyolosuhteissa. Plasmidi-retention vertailu E.coli Kl2 C600R_k-M_k- λ CI857/pAR1:ssa sallivissa olosuhteissa ja siten ilman tätä keksintöä ja rajoittavissa olosuhteissa ja siten tämän keksinnön mukaisesti, osoittaa selvästi, että pääasiallisesti kaikki elinvoimaiset solut viljelyssä tämän keksinnön mukaisesti sisältävät halutun plasmidin. Myös plasmidi-retention vertailu rakennetuissa kennoissa E. coli Kl2 RV308 λ CI90(pAR1 keksintöä käyttäen ja E. coli Kl2 RV308/pAR1 keksintöä käyttämättä, osoittaa samanlaisia tuloksia. Plasmidin pAR1 käyttö on erityisen edullista, koska plasmidi sisältää promoottorin, joka on helposti sovitettavissa insertiota varten mihinkä tahansa joukosta geenejä, jotka koodaavat hyödyllisiä tuotteita.

Plasmidit pPR1 ja pPR3 rakennettiin myös lisäesimerkkien antamiseksi ja tämän keksinnön laajan käyttökelpoisuuden osoittamiseksi. Plasmidi pPR1 rakennettiin kytkemällä bakteriofagiin λ CI857, 2,5 Kb BglII-osan plasmidin pIA7 Δ 4 Δ 1 ainoaan BamHI-pilkontakohtaan. Kuviossa 3 on esitetty pIA7 Δ 4 Δ 1:n pilkontakohta ja funktionaalinen kartta oheisissa piirroksissa. Kuten tässä on osoitettu, sisältää pIA7 Δ 4 Δ 1 E. coli-tryptofaanipromoottorin, antibioottiset resistenssimerkitsijät ja geenin, joka ekspressoii yhdistetyn geenituotteen, joka sisältää osan trp E-proteiinista yhtyneenä ihmisinsuliinin A polypeptidiketjuun.

Plasmidi pIA7 Δ 4 Δ 1 johdetaan pBR322:sta ja rakennetaan tässä esitetyn esimerkin l3A-I esitetyn menetelmän mukaisesti. Mukavuussyistä symboli " Δ " tarkoittaa deletiota. Siten esimerkiksi viittaus plasmidiin, jota seuraa " Δ EcoRI-XbaI" tarkoittaa plasmidia, josta nukleotidisekvenssi EcoRI ja XbaI restriktioentsyymikohtien välissä on poistettu uuttamalla näillä entsyymeillä. Mukavuussyistä tietyt deletiot

on merkitty nuerolla. Siten, aloittaen EcoRI-tunnistuskohdan ensimmäisestä emäsparista ("bp"), joka tunnistuskoh-
 edeltää geeniä tetrasykliiniresistenssiä varten emäplasmidissa pBR322, tarkoittaa " $\Delta 1$ " emäsparien (bp) 1-30 deletiota eli poisjättöä (ts. Δ EcoRI-HindIII) ja siten tetrasykliini-promoottori/operaattori-systeemin toimintakyvyttömäksi tekemistä; " $\Delta 2$ " tarkoittaa bpl-375:n (ts. Δ EcoRI-BamHI) deletiota ja siten sekä tetrasykliini-promoottori/operaattori-systeemin ja osan rakennegeenistä, joka koodaa tetrasykliiniresistenssiä, poistamista; ja " $\Delta 4$ " tarkoittaa emäsparien n. 900 - n. 1500 deletiota trp-operoni-osasesta poistaen rakennegeenin trp D polypeptidiä varten.

Bakteriofagin lambda λ cI857-repressorigeenin kloonamisesta plasmidille pIA7A4 Δ 1 on seurauksena uusi plasmidi, joka on nimetty pPR1:ksi ja joka estää bakteriofagin lambda lyyttisen kehittymisen ja samanaikaisesti koodaa edellä mainitun yhdistetyn geenituotteen tuotantoa. Oheisten piirrosten kuviossa 4 on esitetty pPR1:n pilkontakohta ja funktionaalinen kartta. Kuviossa BglII-BamHI-liitäntäkohdat on merkitty symbolilla " $\overline{B}/B$ ".

Uusi rekombinanttiplasmidi pPR1 voidaan transformoida esimerkiksi E. coli K12 RV308:aan, E. coli K12 C600:aan (esittänyt Bachman, 1972. Bacteriol. Rev. 36:526-557) ja E. coli K12 C600 R_k - M_k -:hon (esittäneet Chang ja Cohen, 1974, Proc. Nat. Acad. Sci. 71:1030-1034) ja sitten syntyneet kannat voidaan lysogenoida bakteriofagilla λ cI90. Koska λ cI90 ei tuota funktionaalista cI-repressoria, rakennetut kannat E. coli K12 RV308 λ cI90/pPR1, E. coli K12 C600 λ cI90/pPR1 ja E. coli K12 C600 R_k - M_k - λ cI90/pPR1 vaativat pPR1-plasmidin pidättämisen, kun taas rakennetut kannat E. coli K12 RV308/pPR1, E. coli K12 C600/pPR1 ja E. coli K12 C600 R_k - M_k -pPR1 jäävät eloon yhtä hyvin ilman plasmidia. Plasmidi-pidätyksen vertailu näissä kannoissa osoittaa selvästi, että pääasiallisesti kaikki elinvoimaiset solut keksinnön mukaisissa kannoissa sisältävät halutun plasmidin. Lisäksi E. coli K12 RV308 λ cI90/pPR1-, E. coli K12 C600 λ cI90/pPR1-

ja E. coli K12 C600R_k-M_k-λcI90/pPR1-kannat ylläpitävät myös PPR1-plasmidin ja tuottavat halutun yhdistetyn geeni-tuotteen, mikä voidaan havaita polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla.

5 Plasmidi pPR3 rakennettiin kytkemällä bakteriofagin λcI857 2,5 Kb BglIII-osan plasmidin ainoaan BamHI-pilkontakohtaan. pIB7Δ4Δ1:n pilkontakohta ja funktionaalinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 5. Kuten tässä on kuvattu, sisältää pIB7Δ4Δ1 geeni-
10 nin, joka ekspressoii yhdistetyn geeni-tuotteen, joka sisältää osan trp E-proteiinia yhdistyneenä ihmisinsuliinin B polypeptidi-ketjuun.

Plasmidi pIB7Δ4Δ1 johdetaan pBR322:sta vastaavalla tavalla kuin pIA7Δ4Δ1:lle kuvattiin. Spesifinen rakenne
15 on tässä esitetty esimerkissä 21.

Bakteriofagin lambda λcI857-repressorigeenin kloonamisesta pIB7Δ4Δ1:lle on seurauksena uusi plasmidi pPR3. Tämä viimeksimainittu plasmidi estää bakteriofagin lambda lyyttisen kehittymisen ja koodaa samanaikaisesti edellä
20 mainitun yhdistetyn geeni-tuotteen tuotantoa. pPR3:n pilkontakohta ja funktionaalinen kartta on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 6. Kuviossa BglIII-BamHI-liitäntäkohdat on merkitty symbolilla " $\overline{B}/\overline{B}$ ".

Tämä uusi rekombinanttiplasmidi pPR3 voidaan transformoida esimerkiksi E. coli K12 RV308:aan, E. coli K12 C600:aan ja E. coli K12 C600R_k-M_k-:hon ja sitten syntyneet kannat voidaan lysogenoida bakteriofagilla λcI90. Kuten edellä kuvattiin lysogenoiduille pPR1:tä sisältäville kannoille, vaativat rakennetut E. coli K12 RV308λcI90/pPR3-, E. coli
30 K12 C600λcI90/pPR3- ja E. coli K12 C600R_k-M_k-λcI90/pPR3-kannat plasmidin pPR3 pidättämistä, kun taas kannat E. coli K12 RV308/pPR3, E. coli K12 C600/pPR3 ja E. coli K12 C600R_k-M_k-pPR3 eivät vaadi ja jäävät yhtä hyvin eloon ilman plasmidia. Plasmidi-pidätyksen vertailu näissä kannoissa
35 osoittaa selvästi, että pääasiallisesti kaikki elinvoimaiset solut keksinnön mukaisissa kannoissa sisältävät halutun plas-

midin. Lisäksi E. coli K12 RV308 cI90/pPR3-, E. coli K12 C600 cI90/pPR3- ja E. coli K12 C6//R_k-M_k- cI90/pPR3-kan-
 nat myös ylläpitävät plasmidinsa ja tuottavat halutun
 yhdistetyn geenituotteen, mikä voidaan havaita polyakryy-
 5 liamidi-geeli-elektroforeesilla.

λ cI857-repressorigeeni, jota tässä käytettiin va-
 laisemaan keksintöä, on lämpötilaherkkä ja inaktivoituu
 38-44°C:ssa tai sen yläpuolella. Siten lämpötilan muutos
 38-44°C:een hajottaa solut indusoimalla lambdaprofagin
 10 lyyttisen syklin, joka lambda-profagi, tämän keksinnön mu-
 kaisesti, on yhdistetty isäntäsolukantaan. Kuten helposti
 käy ilmi, kun käytetään lämpötilaherkkää repressoria, joka
 tukahuttaa kuolettavan tai ehdonalaisesti kuolettavan mer-
 kitsijän, joka aikaansaa isäntäsolun hajoamisen, ja kun
 15 isäntäsoluja viljellään lämpötilassa, joka inaktivoi tämän
 repressorin, ja kun on kysymyksessä ehdonalaisesti kuoletta-
 va merkitsijä, lämpötilassa, joka ei ole lämpötila-alueel-
 la isäntäsolujen sallivaa viljelyä varten, antaa tämä kek-
 sintö myös yksinkertaisen, mukavan ja halvan menetelmän solu-
 20 jen hajottamiseksi solunsisäisten tuotteiden puhdistamista
 varten.

Edellä esitetyn menetelmän eräs valaiseva suoritus-
 muoto rekombinantti-DNA:ta sisältävien isäntäsolujen hajot-
 tamiseksi käsittää isäntäsolujen lysogeenoinnin lysogeeni-
 25 sellä organismilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuoletta-
 van merkitsijän, joka saa aikaan isäntäsolujen hajoamisen,
 sekä isäntäsolujen viljelyn rajoittavissa olosuhteissa. Li-
 säksi tämän menetelmän eräs lisäesimerkki isäntäsolujen hajot-
 tamiseksi käsittää isäntäsolujen transformoinnin rekombinant-
 30 ti-DNA-kloonauksvektorilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuo-
 lettavan merkitsijän, joka saa aikaan isäntäsolujen hajoami-
 sen, ja transformoitujen isäntäsolujen viljelyn rajoitta-
 vissa olosuhteissa. Isäntäsolujen viljely rajoittavissa
 olosuhteissa voidaan helposti suorittaa viljelyn aikana mi-
 35 nä ajankohtana tahansa kun isäntäsolun hajoamista halutaan.

Kuten tässä on kuvattu, käytetään tämän keksinnön
 eräässä edullisessa suoritusmuodossa plasmidi-syntyistä

geeniä kuolettavan kromosomaalisen merkitsijän tukahuttamiseksi. Solujen valinta riippuu replikonista ja myös muista geeneistä plasmidilla. Lisäksi, vaikka tässä kuvatussa suoritusmuodossa käytetään bakteriofagi λ CI857-geeniä, voidaan
 5 käyttää mitä tahansa muuta λ CI-geeniä, joka tuottaa funktionaalisen repressorin. Muita repressorigeenejä, kuten esimerkiksi λ cro-geeniä, voidaan myös käyttää, koska, kuten edellä kuvattiin, se tuottaa repressorin, joka voi korvata CI-repressorin funktion. Profagi, jota käytettiin esimerkkinä
 10 keksinnön valaisemiseksi, sisältää λ CI90-mutaation, eikä niinmuodoin tuota funktionaalista λ CI-repressoria. Voidaan käyttää myös muita bakteriofagi λ -mutantteja jos myös niiltä puuttuu funktionaalinen CI-geeni tai repressor; kuten on selvää vaativat tällaiset mutantit vaihtoehtoisen repressorin
 15 lähteen lysogeenisen tilan ylläpitämiseksi.

Tämän keksinnön selektiivinen systeemi voidaan määrätä isäntäsoluille, jotka sisältävät plasmideja, joissa on geenejä, jotka ekspressoivat joukon hyödyllisiä tuotteita. Plasmidi-syntyinen geeni voi esimerkiksi olla luonnossa
 20 esiintyvä geeni, geeni, jota ei esiinny luonnossa tai geeni, joka on osaksi luonnollinen ja osaksi synteettinen tai luonnossa esiintymätön. Erityisesti keksintöä voidaan käyttää valikoimaan ja ylläpitämään soluja, jotka sisältävät plasmidisyntyisen geenin, joka koodaa ihmisen pre-pro-insuliinia,
 25 ihmisen proinsuliinia, ihmisinsuliinin A-ketjua, ihmisinsuliinia, ihmis-interferonia, ei-ihmis-interferonia, virusantigeeniä, urokinaasia, jotakin peptidi-hormonia, jotakin entsyymiä, jotakin polypeptidiä tai itseasiassa mitä tahansa muuta geeniä, jolla on tutkimus- tai kaupallista arvoa.

Tässä kuvatuissa keksinnön spesifisissä suoritusmuodoissa määräytyvät plasmidi-monistuminen ja lopputuotteen ekspressointi vastaavasti replikonilla pMB1:stä (esittänyt Bolivar, 1979, Life Sci. 25:807-818) ja joko lac- tai trp-promoottorilla. Muita replikoneja ja promoottoreja voidaan
 35 myös käyttää niin kauan kuin ne ovat funktionaalisia E. coli K12:ssa eivätkä ole herkkiä käytetylle nimenomaiselle

repressorille. On selvää, että alaan perehtyneet voivat helposti määrittää mitkä replikonit ja promoottorit ovat funktionaalisia *E. coli* Kl2:ssa ja mitkä eivät ole herkkiä jolleen nimenomaiselle repressorille. Esimerkkejä muista
 5 replikoneista ovat, mutta rajoittumatta näihin, replikonit seuraavista: ColE1, NR1, RK2, RK6, pSC101, RP1, RP4, F jne. mukaanlukien bakteriofagit, jotka monistuvat *E. coli* Kl2:ssa. Esimerkkejä muista promoottoreista ovat, mutta rajoittumatta niihin, bakteriofagi λ P_L'-promoottori, lipoproteiinipromoot-
 10 tori, ribosomaalinen proteiini tai RNA-promoottorit ja itseasiassa mikä tahansa muu promoottori. On selvää, että muita replikoneja ja promoottoreita voidaan rakentaa ja tämä on alaan perehtyneille ilmeistä.

Tämä keksintö esittää, kuten edellä on todettu ja
 15 tässä kuvattu, menetelmän plasmidin sisältävän bakteeripopulaation valitsemiseksi ja ylläpitämiseksi käyttämällä kuolettavaa kromosomaalista merkitsijää, joka tukahtuu plasmidi-syntyisen geenin vaikutuksesta. Tämän keksinnön monet suoritusmuodot ovat mahdollisia. Esimerkiksi bakterio-
 20 fagi λ voidaan korvata erillaisilla bakteriofageilla ja voidaan käyttää kuolettavien mutaatioiden muita luokkia niin kauan kuin ne tukahtuvat plasmidi-syntyisen geenin vaikutuksesta. Valaisevia esimerkkejä kuolettavista mutaatioista, jotka ovat käyttökelpoisia tämän keksinnön mukaisesti, mut-
 25 ta rajoittumatta näihin, ovat seuraavat: kromosomaalinen DNA-monistuminen, soluseinä-synteesi, ribosomi-funktio, RNA-polymeraasi, tRNA-synteesi ja modifikaatio aminoasyyli-tRNA-syntetaasi. DNA-restriktio ja modifikaatio sekä solun jakautumismutaatiot. Muut kuolettavat mutaatiot ovat alaan
 30 perehtyneelle selviö.

Kuolettavien mutaatioiden monia luokkia, jotka tunnistetaan ehdonalaisesti kuolettaviksi mutaatioiksi, ekspressoituu ainoastaan rajoittavissa olosuhteissa, kuten esimerkiksi korotetussa lämpötilassa. Tällaiset mutaatiot voidaan
 35 eristää ja ne ovat kuolettavia soluille kun ne ekspressoituvat mutta niitä ei ekspressoitu tai eivät ole kuolettavia

tietyissä sallivissa viljelyolosuhteissa. Tämän keksinnön soluitsemurhaa voidaan käyttää rajoittavissa olosuhteissa minkä tahansa ehdonalaisesti kuolettavan mutaation kanssa niin kauan kun plasmidi tai muu rekombinantti-DNA-kloonauks-
 5 vektori sisältää sopivan repressorin, joka on funktionaalinen rajoittavissa olosuhteissa. Tällainen mutaatio ei taas tulisi ehdonalaisesti kuolettavaksi ellei plasmidi tai muu rekombinantti-DNA-kloonauksvektori häviäisi.

"Nonsense"-mutaatiot ja repressorit edustavat erästä
 10 erikoisgeeniluokkaa, jota voidaan käyttää valaisemaan tässä keksinnössä kuvattua stabilointia ja valintaa. Nonsense-mutaatio on emäs-substituointi- tai rakennemuutosmutaatio, joka muuttaa aminohapon määrittävän kodonin ketjun pääte-kodoniksi. Siten nonsense-mutaatioista on seurauksena
 15 polypeptidiketjun ennenaikainen terminaatio pisteessä, jossa nonsense-kodoni esiintyy lähetti-ribonukleaaasihapossa (mRNA). Nonsense-repressor on geeni, joka sallii aminohapon insetion kasvavaan polypeptidi-ketjuun vasteena nonsense-kodonille. Tällaisen nonsense-repressorin poissaollessa saa
 20 nonsensemutaatio aikaan polypeptidi-terminaation. Keksinnön edelleen esimerkein haviannollistamiseksi voidaan kuolettaa nonsense-mutaatio yhdistää transformoidun isäntäsolun kromosomiin, jos sopiva nonsense-repressor kloonataan rekombinantti-DNA-kloonauksvektoriin isäntäsolun sisällä.
 25 Geneettinen tasapaino ylläpidetään siten ellei rekombinantti-DNA-kloonauksvektori häviä, jona ajankohtana isäntäsolu menettää elinvoimaisuutensa ja tuhoaa itse itsensä.

E. coli K12:ta koskevan geneettisen ja biokemiallisen informaation runsaus tekee sen sopivaksi isäntäsoluksi
 30 tämän keksinnön tarkoituksia varten. Keksintö ei kuitenkaan rajoitu ainoastaan yhteen sukuun, lajiin tai kantaan vaan sitä voidaan käyttää millä tahansa organismilla, jolla on kuolettavia mutaatioita ja repressoreita käytettävissä tai niitä voidaan eristää tai rakentaa. Esimerkiksi, keksintö
 35 on käyttökelpoinen prokaryooteille, vapaasti eläville eukaryooteille, jotka ovat viljelyllä vastaanottavaisia, ja

erityisesti bakteereille, kuten, mutta rajoittumatta näihin, bakteereille *Bacillus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Agrobacterium* ja *Pseudomonas*; sienille, mutta rajoittumatta näihin, *Neurospora*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, ja hiiva, sekä viljelyalttiille soluille, jotka ovat peräisin monisoluisen organismien, kuten, rajoittumatta näihin, *Chordata*, *Mammalia*, *Aves*, *Amphibia*, *Reptilia*, kudoksesta tai kasveista.

10 Tämän keksinnön kaikilla suoritusmuodoilla on yhteisenä piirteenä, että ne ovat tunteettomia väliaineiden koostumukselle. Siten keksintö tekee mahdolliseksi laaja-alaisen fermentointi-manipuloinnin tuottavuuden parantamiseksi.

Seuraavat esimerkit valaisevat lähemmin tässä esitetyä keksintöä ja antavat siitä myös edullisen suoritusmuodon. Tarpeen mukaan on kuvattu keksinnön selitystä sekä varsinaisia menetelmiä sen rakentamiseksi.

Esimerkki 1

Rekombinantti-plasmidi pAR2:n rakentaminen

20 Useat *Bgl*III-pilkontakohdat bakteriofagissa λ cI857 ja yksi ainoa *Bam*HI-pilkontakohta plasmidissa pIA2 sallivat bakteriofagi-osasten kloonauksen pIA2-kloonausvektoriin. Bakteriofagi λ cI857 sisältää 6 kohtaa, jotka ovat herkkiä *Bgl*III:lle. Yksi *Bgl*III-osasista sisältää 2,5 Kb, joka sisältää

25 λ cI-geenin ja myös λ rex-geenin (Szybalski ja Szybalski, 1979, Gene 7:217-280 ja O'Brien, toim. maaliskuu 1980, Genetic Maps, Vol. 1, NIH). *Bgl*III-osaset sisältävät 5'-hänniä, joissa on sekvenssi GATC, ja jotka ovat samoja ja täydentäviä 5'-hännille *Bam*HI-osasilla. Ihmisen insuliini-

30 plasmidi pIA2 sisältää 11,0 Kb, jossa on yksi ainoa kohta, jonka *Bam*HI pilkkoo. Kloonauksen *Bam*HI-kohtaan inaktivoi Tc-resistenssigeenin, joka on pIA2:lla. *Bgl*III-osasten ja *Bam*HI-osasten liittäminen antaa rekombinantteja, joissa on sekvenssit

AGATCC	GGATCT
TCTAGG	CCTAGA

35 sejä ei *Bgl*III tai *Bam*HI pilko. Siten pilkkominen kummallakin entsyymillä poistaa kaikki liitännät tuotteesta lukuunottamatta

niitä, jotka sisältävät λ BglIII-osasen liitettynä pIA2:n BamHI-kohtaan.

Restriktioentsyymejä ostettiin kaupallisista lähteistä ja niitä käytettiin valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti.* Rekombinantti-DNA-molekyyliä muodostettiin T4 DNA-ligaasilla 0,10 ml:ssa reaktioseosta, joka sieälsi $3,0 \times 10^{-13}$ moolia pilkottua vektoria ja $6,0 \times 10^{-13}$ moolia bakteriofafi λ -pilkontaosasia. Muut ja täydellisemmät reaktio-olosuhteet ovat kuten Tanaka ja Weissblum ovat esittäneet, 1975, J. Bacteriol., 121:354-362.

Esimerkki 2

Rekombinantti-plasmidi pAR2:n transformointi E. coli K12 C600R_K-M_K-:aan

E. coli K12 C600R_K-M_K-:n tuoreista yhden yön viljelyistä (esittäneet Chang ja Cohen, 1974, Proc. Nat. Acad. Sci 71:1030-1034) tehtiin alaviljelyjä 1:10 tuoreeseen L-liemeen (esittänyt Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Labs. Cold Spring Harbor, New York) ja kasvatettiin 37°C:ssa 1,0 tuntia. Talteen korjattiin yhteensä 660 Klett-soluyksikköä, pestiin 2,5 ml:lla 100 mM NaCl, suspendoitiin 150 mM CaCl₂:een 10,0 %:sella glyserolilla ja inkuboitiin huoneen lämpötilassa 20 minuuttia. Solut korjattiin talteen linkoamalla, suspendoitiin uudelleen 0,5 ml:aan CaCl₂-glyserolia, jäähdytettiin jäässä 3-5 minuuttia ja pakastettiin. Solu-suspensioita varastoitettiin nestemäisessä tyypessä käyttöön asti. Säilöntä ja varastointi eivät vaikuttaneet haitallisesti kovalentti-

* Restriktioentsyymejä ja ohjeita voidaan helposti saada seuraavista lähteistä:

Bethesda Research Laboratories Inc. Box 6010, Rockville, Maryland 20850

Boehringer Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive P.O. Box 50816 Indianapolis, Indiana 46250

Research Products Miles Laboratories, Inc. Elkhart, Indiana 46515

sesti suljetun DNA-renkaan transformoinnin elinvoimaisuuteen tai taajuuteen. Solut sulatettiin jäähauteessa ja sekoitettiin suhteessa 0,1 ml solua 0,05 ml DNA (valmistettu esimerkin 1 oppien mukaisesti) väkevyydessä 2,0 µg/ml. Näin
 5 valmistettuja näytteitä jäähdytettiin jäissä 10,0 minuuttia ja laimennettiin sitten 0,85 ml:lla L-lientä, inkuboitiin 32°C:ssa 2,0 tuntia, levitettiin L-agarille (esittänyt Miller, 1972) 5×10^9 λb2:n kanssa ja inkuboitiin 32°C:ssa . Transformantit valittiin immuniuden suhteen bakteriofagille
 10 λb2 32°C:ssa. Rekombinantteja testattiin Ap^R , Tc^S , b2-immuuniuden suhteen 32°C:ssa ja b2-herkkyyden suhteen 42°C:ssa. Valittiin yksi transformantti ja se nimettiin E. coli K12 C600R_K-M_K-/pAR2:ksi. Tätä eloonjäänyttä pesäketä testattiin odotettujen ilmiäsuojen suhteen ja käytettiin
 15 rakennetun rekombinantti-plasmidin pAR2 eristämiseen ja vahvistamiseen.

Esimerkki 3

Rekombinanttiplasmidin pAR2 vahvistaminen ja eristäminen

E. coli K12 C600R_K-M_K-/pAR2:n plasmidi-DNA vahvistettiin klooriamfenikolilla ja eristettiin kirkastetulla
 20 lyaattimenetelmällä (esittänyt Bazaral ja Helinski, 1968, J. Mol. Biol. 36:185-194). Kovalenttisesti suljettu DNA-rengas puhdistettiin käyttäen tasapainoultrasentrifugointia CsCl:ssa ja propidium-di-jodidissa. Propidium-di-jodidi
 25 uutettiin 2-propanolilla ja DNA varastoitiin CsCl:ssa -20°C:ssa. DNA:n työskentelyliuokset muutettiin SSC/10 puskuriksi (0,015 M NaCl, 0,0015 M natriumsitraatti pH 7,0) kromatografialla Sephadex (PD10^x) pylväissä.

Esimerkki 4

30 Rekombinantti-plasmidin pAR2 transformointi E. coli K12 RV308:aan

Rekombinantti-plasmidin pAR2 transformointi E. coli K12 RV308:aan suoritettiin menettelytavan mukaisesti, joka

35 x Saatavissa firmasta Pharmacia, 800 Centennial Ave, Piscataway, New Jersey 08851.

esitettiin esimerkissä 2, paitsi että käytettiin 300 mM CaCl_2 . Näytteet laimennettiin 0,85 ml:lla L-lientä, inkuboitiin 32°C :ssa 2,0 tuntia, levitettiin L-agarille 5×10^9 λb2 :n kanssa ja inkuboitiin 32°C :ssa. Eloojääneet pesäkkeet testattiin odotettujen ilmiäsuojen suhteen ja ne muodostuivat halutuista E. coli K12 RV308/pAR2 transformanteista.

Esimerkki 5

10 E. coli K12 RV308 λCI90 /pAR2:n rakentaminen lysogenoimalla λCI90 :lla

2 E. coli K12 RV308/pAR2 (valmistettu esimerkin 4 esityksen mukaisesti) kasvatettiin 32°C :ssa 35 Klett-yksikköön asti ja siirrettiin sitten 45°C :seen 60,0 minuutiksi. Solut tartutettiin sitten λCI90 :lla moe:ssa 20 ja inkuboitiin 15 45°C :ssa 40 minuuttia. Pesäkkeitä kasvatettiin 32°C :ssa L-agarilla, joka sisälsi $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampisilliinia. Saadut E. coli K12 RV308(λCI90)pAR2-pesäkkeet testattiin kasvun todentamiseksi 32°C :ssa ja herkkyyden todentamiseksi 42°C :ssa.

20 Esimerkki 6

Rekombinantti-plasmidin pAR1 rakentaminen

EcoRI- ja BamHI-pilkontakohdat bakteriofagissa λCI857 ja plasmidissa pBR322 sallivat bakteriofagi-osasten kloonauksen pBR322-kloonauksvektorille. Restriktioentsyymit 25 ostettiin kaupallisista lähteistä ja niitä käytettiin valmistajan toimittamien ohjeiden mukaisesti. Siten bakteriofagia λCI857 ja plasmidia pBR322 käsiteltiin kumpaakin kahdesti restriktioentsyymeillä EcoRI ja BamHI. Noin $528\text{ }\mu\text{g}$ näin valmistettua pilkottua λCI857 DNA:ta 10 mM Tris-HCl:ssa 30 n. 8:ssa inkuboitiin 10.000 yksiköllä/ml alkalista bakteerifosfataasia 65°C :ssa 30 minuuttia. Alkalinen bakteerifosfataasi poistaa pääte-fosfaattiryhmät bakteriofagi lambda-pilkontaosasta ja estää siten niiden liittymisen toisiinsa. Tämä entsyymaattinen käsittely ei kuitenkaan estä liittymistä 35 käsittelemättömään DNA:han, kuten esimerkiksi pilkottuun plasmidiin pBR322.

Käsitelty bakteriofagi λ cI857-pilkottu DNA puhdistettiin tasapaino-ultrasentrifugoimalla CsCl:ssa ja propidium-di-jodidissa. Propidium-di-jodidi uutettiin 2-propanolilla ja DNA:ta varastoitiin CsCl:ssa -20°C:ssa. DNA:n

5 työskentelyliuokset muutettiin SSC/10-puskuriksi (0,015M NaCl, 0,0015M natriumsitraatti, pH 7) kromatografialla Sephadex (PD 1,0)-pylväissä. Rekombinatti-DNA-molekyyliä muodostettiin T4 DNA ligaasilla 0,10 ml:ssa reaktioseosta, joka sisälsi 2,2 μ g pilkottua pBR322 vektoria ja

10 3,8 μ g bakteriofagi lambda-pilkontaosasia. Muut ja täydellisemmät reaktio-olosuhteet ovat Tanaka'n ja Weisblum'in kuvaamien mukaiset, 1975, J. Bacteriol., 121:354-362.

Esimerkki 7

Rekombinantti-plasmidin pAR1 transformointi E. coli K12

15 C600R_k-M_k-:hon

Plasmidin pAR1 transformointi E. coli K12

C600R_k-M_k-:hon suoritetaan esimerkissä 2 esitetyn menettelyn mukaisesti. Koska λ cro-repressor ei ole lämpötilaherkkä, valittiin transformantit immuuniuden suhteen bakteriofagille λ b2 sekä 32 että 42°C:ssa. Rekombinantteja testattiin edelleen Sp^r:n ja Tc^s:n todentamiseksi ja yksi transformanteista valittiin ja nimettiin E. coli K12

20 C600R_k-M_k-/pAR1:ksi. Tätä eloonjäänyttä pesäkettä testattiin odotettujen fenotyyppien suhteen ja käytettiin rekombinanttiplasmidin pAR1 erittämiseen ja vahvistamiseen. Sekä eristys- että vahvistusvaihe suoritettiin esimerkissä 3 esitetyn menetelmän mukaisesti.

Esimerkki 8

E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR1:n rakentaminen lysogenoimalla λ cI90:llä

30

E. coli K12 RV308/pAR1 (plasmidin pAR1 transformointi E. coli K12 RV308:aan suoritettiin esimerkissä 4 esitetyn menettelyn mukaisesti) kasvatettiin 32°C:ssa 35 Klett-yksikköön asti ja siirrettiin sitten 45°C:een 30,0 tai 60,0

35 minuutiksi. Solut tartutettiin sitten λ cI90:llä moe:ssa 20 ja inkuboitiin 45°C:ssa 40 minuuttia. Pesäkkeitä kasva-

tettiin 32°C:ssa L-agarilla, joka sisälsi 10⁶ ul/ml ampisilliinia. Saatuja E. coli K12 RV308 λ CI90/pAR1-pesäkkeitä testattiin odotetun ilmaisuuden suhteen ja tällä tavalla rakennetun kannan perusasu vahvistettiin.

5 Esimerkki 9

E. coli K12 C600R_k-M_k- λ CI857/pAR1:n rakentaminen transformoimalla pAR1:lla

E. coli K12 C600R_k-M_k- λ CI857 (rakennettu Miller'in mukaisesti, 1972) tehtiin kykeneväksi ja transformoitiin
10 esimerkissä 2 esitetyn menetelmän mukaisesti, paitsi että soluja kasvatettiin 32°C:ssa eikä 37°C:ssa. Pesäkkeitä kasvatettiin L-agarilla, joka sisälsi 10⁶ ug/ml ampisilliiniä ja saatuja E. coli K12 C600R_k-M_k- λ CI857/pAR1-pesäkkeitä testattiin odotetun ilmaisuuden suhteen ja tällä tavalla halutun kannan perusasu vahvistettiin.
15

Esimerkki 10

E. coli K12 C600 λ CI90/pAR2:n rakentaminen

Haluttu kanta rakennetaan pääasiallisesti esimerkkien 1, 2 ja 5 esityksen mukaisesti, paitsi että isäntäkantana käytetään E. coli K12 C600 eikä E. coli K12 RV308.
20

Esimerkki 11

E. coli K12 C600 λ CI857/pAR1:n rakentaminen

Haluttu kanta rakennetaan pääasiallisesti esimerkkien 6, 7 ja 9 esityksen mukaisesti, paitsi että isäntäkantana käytetään E. coli K12 C600 eikä E. coli K12 C600R_k-M_k-.
25

Esimerkki 12

Menetelmä isäntäsolujen, jotka sisältävät rekombinantti-plasmideja, pysyvyyksien määrittämiseksi, valinnan kanssa tai ilman

30 Rekombinantti-plasmidien Ap^r-geeniä käytettiin plasmidia sisältävien solujen lukuisuuden määrittämiseksi. Viljelyn sarjalaimennuksia levitettiin L-agarille ja kasvatettiin 32°C:ssa 10⁶ ug/ml kanssa ampisilliinia ja ilman sitä. Plasmidi⁺-solujen lukuisuus otettiin ampisilliinille
35 resistenttien pesäkkeiden suhteeksi pesäkkeiden, jotka kasvoivat L-agarilla ilman ampisilliinia, kokonaislukumäärään.

Vaihtoehtoisesti pesäkkeet L-agarilla levitettiin monistumaan L-agarille, jossa oli 10 µg/ml ampisilliinia ja kasvatettiin 32°C:ssa. Plasmidi⁺-solujen lukuisuus otettiin ampisilliinille resistenttien pesäkkeiden suhteeksi pesäkkeiden, jotka kasvoivat L-agarilla ilman ampisilliinia, kokonaislukumäärään.

Esimerkki 13

Plasmidin pIA7Δ4Δ1:n rakentaminen

A. Plasmidin pBRHtrp rakentaminen

Plasmidilla pGM1 on *E. coli* tryprofaani-operoni, joka sisältää deletion ΔLE1413 (Miozzari, et al., 1978, J. Bacteriology, 1457-1466), ja se ekspressoii siten yhdistelmä-proteiinin, joka sisältää trp-johto-osan 6 ensimmäistä aminohappoa ja likimääräisesti viimeisen kolmanneksen trp E polypeptidistä (nimitetään tämän jälkeen yhteydessä LE':ksi), sekä myös trp D polypeptidin kokonaisuudessaan, kaikki trp-promoottori-operaattori-systeemin säätelyn alaisina *E. coli* K12 W3110tna2trp-Δ102/pGM1 on talletettu kokoelmaan American Type Culture Collection (ATCC nro 31622) ja pGM1 voidaan tavanomaisesti poistaa kannasta käytettäväksi seuraavassa kuvatuissa menetelmissä.

Noin 20 µg tätä plasmidia digeroitiin restriktioentsyymillä PvuII, joka pilkkoo plasmidin viidestä kohdasta. Geeni-osaset yhdistettiin ensin EcoRI-kytkentäosasilla (jotka käsittävät itsetäydentävän oligonukleotidin, jolla on sekvenssi: pCATGAATTCATG), mikä antaa EcoRI-pilkontakohdan myöhempää kloonausta varten plasmidiin, joka sisältää EcoRI-kohdan. 20 µg DNA-pätkiä, jotka saatiin pGM1:stä, käsiteltiin 10 yksiköllä T₄ DNA-ligaasia 200 pikomoolin 5'-fosforyloitua synteettistä oligonukleotidiä pCATGAATTCATG läsnäollessa ja 20 µl:ssä T₄ DNA-ligaasipuskuria (20 mM Tris, pH 7,6, 0,5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 5 mM ditiotreitoli) 4°C:ssa yli yön. Liuosta kuumennettiin sitten 10 minuuttia 70°C:ssa liitännän pysäyttämiseksi. Liitäntäosaset pilkottiin EcoRI-digeroinnilla ja osaset, joissa nyt oli EcoRI-päät, erotettiin käyttäen 5-%:sta polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesia (tämän jälkeen "PAGE").

Kolme suurinta osasta eristettiin geelistä värjäämällä ensin etidumbromidilla ja paikantamalla osaset sitten ultraviolettivalolla ja leikkaamalla geelistä kiinnostavat osat. Jokainen geeliosanen pantiin yhdessä 300 mikrolitran kanssa
 5 0,1xTBE dialyysipussiin ja saatettiin elektroforeesiin 100 V:ssa 1 tunniksi 0,1xTBE-puskurissa (TBE-puskuri sisältää: 10,8 g trisemästä, 5,5 g boorihappoa, 0,09 g Na_2EDTA 1 litrassa H_2O). Vesipitoinen liuos koottiin dialyysipussista, uutettiin fenolilla, uutettiin kloroformilla
 10 ja tehtiin 0,2M:ksi natriumkloridin suhteen. DNA otettiin sitten talteen veteen etanoli-saostuksen jälkeen. trp promoottori/operaattorin sisältävä geeni, jolla on EcoRI-"hännät", tunnistettiin seuraavaksi kuvatussa manetelmässä, mitä seuraa pätkien insertio tetrasykliini-herkkään plasmidiin, joka, promoottori/operaattori-insertion jälkeen tulee
 15 tetrasykliiniresistentiksi. Kaikki tämän jälkeen selostetut DNA-osasten eristämiset suoritetaan käyttäen PAGE, mitä seuraa edellä kuvattu sähköeluutiomenetelmä.

B. Plasmidin pBRH trp, joka ekspressoi tetrasykliiniresistenssiä Trp promoottori/operaattorin säätelyn alaisena, rakentaminen ja Trp promoottori/operaattorin sisältävän DNA-jakeen, joka eristettiin edellä kohdassa "A", tunnistaminen ja vahvistaminen

Plasmidi pBRH1 (Rodriguez, et al., 1979, Nucleic
 25 Acids Research 6, 3267-3287) ekspressoi ampisilliiniresistenssin ja sisältää geenin tetrasykliiniresistenssiä varten, mutta koska ei ole yhdistynyttä promoottoria mukana, se ei ekspressoi tätä resistenssiä. Plasmidi on siten tetrasykliinherkkä. Tuomalla promoottori/operaattori-systeemi EcoRI-kohtaan plasmidi voidaan tehdä tetrasykliiniresistentiksi.

Plasmidia pBRH1 digeroitiin EcoRI:lla. Entsyymi poistettiin fenoli-uutolla, mitä seurasi kloroformi-uutto ja sitten DNA otettiin talteen veteen etanoli-saostuksen jälkeen. Saatu DNA-molekyyli yhdistettiin, erillisissä reaktioseoksissa, jokaisen kanssa kolmesta DNA-pätkästä, jotka
 35 oli saatu edellä esimerkissä 13A ja liitettiin T_4 DNA-lignaa-

silla kuten edellä kuvattiin. Reaktioseoksessa läsnäolevaa DNA:ta käytettiin transformoimaan kykenevä E. coli K12 kanta 294 (Backman et al., 1976. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73:4174-4198, ATCC nro 31448) standardimenetelmin (Hershfield et al., 1974, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:3455-3459) ja bakteerit levitettiin sitten LB-levyille (Miller, 1972), jotka sisälsivät 20 µg/ml ampisilliiniä ja 5 µg/ml tetrasykliiniä.

Valittiin useita tetrasykliiniresistenttejä pesäkkeitä ja plasmidi-DNA eristettiin ja nimettiin pBRHtrp:ksi. Halutun osasen läsnäolo vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä. Plasmidi pBRHtrp ekspressoι β-laktamaasin, antaen ampisilliiniresistenssin, ja sisältää DNA-pätkän, joka sisältää trp promoottori/operaattorin. Tämä DNA-osanen koodaa myös ensimmäistä proteiinia, (merkitty LE':ksi), joka käsittää trp-johto-osan kuuden ensimmäisen aminohapon yhdistelmän ja likimääräisesti ainakin kolmanneksen trp-E-polyeptidistä, toista proteiinia (merkitty D':ksi), mikä vastaa likimääräisesti trp D polypeptidin ensimmäistä puolikasta, ja kolmatta proteiinia, jota koodaa tetrasykliiniresistenssi-geeni.

C. Plasmidin pSOM7Δ2 rakentaminen

Plasmidia pBRHtrp digeroitiin EcoRI restriktioentsyymillä ja saatu osanen, joka eristettiin PAGE:lla ja sähköeluutiolla, yhdistettiin EcoRI-digeroituneen plasmidin pSOM11 kanssa (Itakura et al., 1977, Sci, 198:1056, G. B. Patent Publication nro 2 007 676A). Seos liitettiin T₄ DNA-lignaasilla ja saatu DNA transformoitiin E. coli K12 kantaan 294, kuten edellä kuvattiin. Transformanttibakteerit valittiin ampisilliinia sisältävillä levyillä ja saadut ampisilliiniresistentit pesäkkeet seulottiin pesäkehybridisoinnilla (Gruenstein et al., 1975, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:3951-3965). trp promoottori/operaattorin sisältävää osasta, joka oli eristetty pBRH trp:sta ja merkitty sitten radioaktiivisesti p³²:lla, käytettiin koettimena edellä esitettyssä menetelmässä. Useiden pesäkkeiden osoitettiin pesäkehybridisoinnilla olevan positiivisia ja valit-

tiin sentähden. Plasmidi-DNA eristettiin ja kytkettyjen osasten suuntautuminen määritettiin restriktioanalyysillä käyttäen entsyymejä BglII ja BamHI kaksoisdigeroinnissa. Pesäkkeitä, jotka sisälsivät halutun plasmidin, jossa oli trp promoottori/operaattori-osanen oikein suunnattuna, kasvatettiin LB-väliaineessa (Miller, 1972), joka sisälsi 10 µg/ml ampisilliinia. Haluttu plasmidi nimettiin pSOM7Δ2:ksi ja sitä käytettiin myöhempiä rakenteluja varten, joita seuraavassa on kuvattu.

10 D. Plasmidin pTrp24 rakentaminen

1. Geeni-osasen rakentaminen, joka osanen sisältää koodit LE'-polypeptidin keskipisteestä erillään olevia alueita varten, joissa on BglII- ja EcoRI-pilkontakohdat vastaavasti koodaussäikeen 5'- ja 3'-päissä

15 Plasmidi pSOM7Δ2 HindIII-digeroitiin, mitä seurasi digerointi lambdaeksonukleaasilla (5' - 3'-eksonukleaasi) olosuhteissa, jotka oli valittu niin, että digeroidaan BglII-pilkontakohdan ylitse LE'-koodausalueelle. Noin 20 µg HindIII-digeroitua pSOM7Δ2 liuotettiin puskuriin (20 mM glysiini-puskuria, pH 9,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM β-merkaptoetanoli). Saatua seosta käsiteltiin 5 yksiköllä lambda-eksonukleaasia 60 minuutin ajan huoneen lämpötilassa. Saatua reaktioseosta uutettiin sitten fenolilla, kloroformilla ja saostettiin etanolilla.

25 EcoRI-tähteen muodostamiseksi LE'-geeni-osasen keskipisteestä erillään olevaan päähän, syntetisoitiin primeri ³²pCCTGTGCATGAT parannetulla fosforitriesteri-menetelmällä (Crea et al., 1978, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75:5765) ja hybridisoitiin lambda-eksonukleaasi-digeroinnista saadun LE'-geeni-osasen yksisäikeiseen päähän. Hybridisointi suoritettiin liuottamalla 20 µg plasmidin pSOM7Δ2 lambda-eksonukleaasi-käsiteltyä HindIII-digerointituotetta 20 µl:llsä H₂O ja yhdistämällä 6 µl:n kanssa liuosta, joka sisälsi likimääräisesti 80 pikomoolia edellä kuvattua 5'-fosforyloitua oligonukleotidia. Synteettinen osanen hybridisoitiin LE'-koodaussekvenssin 3'-päähän ja LE'-osasen jäl-

jelle jäänyt yksisäikeinen osa täytettiin Klenow Polymerase I:lla käyttäen dATP, dTTP, dGTP ja dCTP. Klenow Polymerase I on osanen, joka on saatu proteolyytisesti pilkkomalla DNA Polymerase I. Se sisältää emä-entsyymin 5' → 3' polymeroimisaktiivisuuden, 3' → 5' eksonukleolyyttisen aktiivisuuden, mutta ei emä-entsyylin 5' → 3' eksonukleolyyttistä aktiivisuutta (Kornberg, 1974, W. H. Freeman and Co., SFO, 98).

Reaktioseos kuumennettiin siten 50°C:seen ja annettiin hitaasti jäähtyä 10°C:seen, minkä jälkeen lisättiin 4 µl Klenow-entsyymiä. 15 minuutin inkuboinnin jälkeen huoneen lämpötilassa, mitä seurasi 30 minuutin inkubointi 37°C:ssa, reaktio pysäytettiin lisäämällä 5 µl 0,25 molaarista EDTA. Reaktioseosta uutettiin fenolilla, kloroformilla ja saostettiin etanolilla. DNA pilkottiin sen jälkeen restriktioentsyymillä BglII ja osaset erotettiin PAGE:lla. Geelistä saatu autoradiogrammi paljasti ³²P-merkityn osasen, jolla oli odotettu pituus n. 470 emäsparia ja joka otettiin talteen sähköuutolla. Kuten hahmoiteltiin, oli tällä osasella LE'(d) BglII-pääte ja tylppä pää, joka sopii yhteen primerin alun kanssa.

2. Plasmidin pThal rakentaminen

Plasmidi pThal rakennettiin kytkemällä syntetisoitu geeni tymosiini alfa 1:tä varten plasmidiin pBR322. Tymosiini alfa 1:tä koodaavan DNA:n synteesi käsittää 16 oligonukleotidin (T₁ - T₁₆), jotka on osoitettu kaksipäisillä nuolilla oheisten piirrosten kuviossa 7, synteessin ja sen jälkeen liitännän. Met-kodoni ATG kytkettiin N-päätteellä ja 5'-pääte rakennettiin yksisäikeisillä koossapitävillä päätteillä helpottamaan liittymistä plasmideihin, jotka oli pilkottu EcoRI:lla ja BamHI:lla. Kuten helposti voidaan todeta, auttaa BglII-kohta geenin keskellä rekombinattiplasmidien analyysissä.

Oligodeoksiribonukleotidit T₁-T₁₆ syntetisoitiin modifioidulla fosfotriesteri-menetelmällä käyttäen täysin suojattuja trideoksiribonukleotidi-rakennemöhkäleitä

(Itakura et al., 1977, Science 198:1056 ja Crea et al., 1978). Eri oligodeoksiribonukleotidit on esitetty seuraavassa taulukossa 1.

5

Taulukko 1

Synteettisiä oligonukleotidejä tymosiini α 1-geeniä varten

	Yhdiste	Sekvenssi	Pituus	HPLC Analyysi Pidätysaika (min)*
10	T ₁	A-A-T-T-C-A-T-G-T-C	10	17,4
	T ₂	T-G-A-T-G-C-T-G-C-T-G-T-T-G-A	15	24,3
	T ₃	T-A-C-T-T-C-T-T-C-T-G-A	12	20,3
	T ₄	G-A-T-T-A-C-T-A-C-T-A-A-A	13	22,0
	T ₅	G-C-A-G-C-A-T-C-A-G-A-C-A-T-G	15	24,8
15	T ₆	G-A-A-G-T-A-T-C-A-A-C-A	12	20,1
	T ₇	A-G-T-A-A-T-C-T-C-A-G-A-A	13	22,6
	T ₈	A-A-G-A-T-C-T-T-T-A-G-T	12	20,2
	T ₉	G-A-T-C-T-T-A-A-G-G-A-G	12	20,4
	T ₁₀	A-A-G-A-A-G-G-A-A-G-T-T	12	21,1
20	T ₁₁	G-T-C-G-A-A-G-A-G-G-C-T	12	20,5
	T ₁₂	G-A-G-A-A-C-T-A-A-T-A-G	12	20,4
	T ₁₃	C-T-T-C-T-T-C-T-C-C-T-T	12	19,9
	T ₁₄	T-T-C-G-A-C-A-A-C-T-T-C	12	20,5
	T ₁₅	G-T-T-C-T-C-A-G-C-C-T-C	12	20,2
25	T ₁₆	G-A-T-C-C-T-A-T-T-A	10	17,2

* Ympäristön lämpötilassa

Edellä esitetyille synteeseille on tyypillistä seuraava menettely osaselle T₁₅, kuten oheisten piirrosten kuviossa 8 on pääkohdittain esitetty. Eri nukleotidi-osaset, joita käytetään T₁₅:n synteeseissä, on merkitty numeroin kuviossa. Käytetyt lyhenteet ovat seuraavat: TPSTe, 2,4, 6-tri-iopropyylibentseenisulfonyylitetratsoli; BSA, bentseenisulfonylihappo; TLC, ohutlevykromatografia; HPLC, suurteho-

nestekromatografia; DMT, 4,4'-dimetoksitrityyli; CE, 2-syaanietyyli; R, p-kloorifenyyli; Bz, bentsoyyli; An, aniso-

yyli; iBu, isobutyryyli; Py, pyridiini; AcOH, etikkahappo; Et₃N, trietyyliamiini.

Täysin suojatut trideoksiribonukleotidit 4 (85 mg, 0,05 mmol) ja 2 (180 mg, 0,1 mmol) purettiin suojauksesta
 5 5'-hydroksyyleillä käsittelemällä 2-%:sella BSA 7:3 (tilav./tilav.) kloroformi/metanoli-seoksessa (10 ja vastaavasti 20 ml) 10 minuuttia 0°C:ssa. Reaktiot pysäytettiin lisäämäl-
 lä kylästettyä vesipitoista ammoniumbikarbonaattia (2 ml),
 uutettiin kloroformilla (25 ml) ja pestiin vedellä
 10 (2 x 10 ml). Orgaaniset kerrokset kuivattiin (magnesiumsulfaatti), haihdutettiin pieniin tilavuuksiin (n. 5 ml) ja saostettiin lisäämällä petrolieetteriä (jae 35-60°C). Vä-
 rittömät sakat koottiin linkoamalla ja kuivattiin eksik-
 kaattorissa tyhjössä antamaan 6 ja vastaavasti 8, kumpikin
 15 homogeeninen pihappogeeliohutlevykromatografialla (Merck 60 F254, kloroformi/metanoli, 9:1).

Trimeerit 1 ja 3 (270 mg, 0,015 mmol; 145 mg, 0,075 mmol) muutettiin fosfodiestereikseen (5 ja 7) käsitte-
 lemällä trietyyliamiini/pyridiini/vedellä (1:3:1, tilav./
 20 tilav., 10 ml) 25 minuuttia ympäristön lämpötilassa. Rea-
 genssit poistettiin pyöröhaihdutuksella ja jäännökset kui-
 vattiin toistuvain haihdutuksin vedettömällä pyridiinillä
 (3 x 10 ml). Trimeeri 8 (0,05 mmol) ja trimeeri 7 yhdistet-
 tiin TPSTe:n kanssa (50 mg, 0,15 mmol) vedettömässä pyri-
 25 diinissä (3 ml) ja reaktioseos jätettiin tyhjööön ympäristön
 lämpötilassa 2 tunniksi. TLC-analyysi osoitti, että 95 %
 trimeeristä 8 oli muuttunut heksameeri-tuotteeksi (tehtiin
 näkyväksi havaitsemalla DMT-ryhmä ruiskuttamalla 10-%:sella
 vesipitoisella rikkihapolla ja kuumentamalla 60°C:ssa).
 30 Reaktio tukahutettiin lisäämällä vettä (1,0 ml) ja liuotin
 haihdutettiin alennetussa paineessa. Pyridiinin poistamisen
 jälkeen rinnakkaishaihdutuksin tolueenin kanssa heksameeri
 purettiin 5'-asemassa 2-%:sella BSA:lla (8 ml), kuten
 edellä kuvattiin trimeereille 4 ja 2. Tuote (10) puhdistet-
 35 tiin pihappogeelipylväässä (Merck 60 H, 3,5 x 5 cm) porras-
 gradienttieluoinnilla kloroformi/metanolilla (98:2 - 95,5,

tilav./tilav.). Jakeet, jotka sisälsivät tuotteen 10, haihdutettiin kuiviin.

Samalla tavalla trimeeri 5 kytkettiin 6:een ja täysin suojattu tuote puhdistettiin suoraan piihappogeeelillä. Tämä jälkimmäinen yhdiste purettiin 3'-päässä trietyyliamiini/pyridiini/vesi-seoksella kuten edellä kuvattiin antamaan osan 9.

Lopuksi heksameerit 9 ja 10 kytkettiin vedettömässä pyridiinissä (2 ml), TPSTe (75 mg, 0,225 mmol) kondensoimisaineena. Kun kytkeminen oli loppuunsaoritettu (4 tuntia, ympäristön lämpötila) seos pyöröhaihdutettiin ja jäännös kromatografoitiin piihappogeeelillä. Tuote 11 (160 mg) saatiin saostamalla petrolieetterillä ja se näytti homogeeniseltä TLC:lla. Osa yhdisteestä 11 (20 mg) pyridiinissä (0,5 ml) purettiin täydellisesti käsittelemällä väkevällä ammoniumhydroksidilla (7 ml, 8 tuntia, 60°C) ja senjälkeisellä käsittelyllä 80-%:sessa etikkahapossa (15 minuuttia, ympäristön lämpötila). Etikkahapon haihduttamisen jälkeen kiinteä jäännös liuotettiin 4-%:seen vesipitoiseen ammoniumhydroksidiin (tilav./tilav., 4 ml) ja uutettiin etyylietterillä (3 x 2 ml). Vesipitoinen faasi väkevöitiin 1-2 ml:ksi ja osa saatettiin HPLC:aan 12:n puhdistamiseksi. Jakeet, jotka vastasivat päähuippua, yhdistettiin (n. 2,0 0.D.₂₅₄-yksikköä) ja väkevöitiin n. 5 ml:ksi. Lopullisesta tuotteesta 12 poistettiin suolat Bio-gel P-2:lla (1,5 x 100 cm) eluimalla 20-%:sella vesipitoisella etanolilla, haihdutettiin kuiviin ja suspendoitiin uudelleen veteen (200 µl) antamaan A₂₅₄ = 10-liuos. 12:n sekvenssi vahvistettiin kaksiulotteisella sekvenssianalyysillä.

Täydellinen tymosiini alfa 1-geeni koottiin 16 synteettisestä oligo-nukleotidistä menetelmin, jotka aikaisemmin yksityiskohtaisesti on kuvattu somatostatiinille (Itakura et al., 1977), insuliinista (Goeddel et al., 1979) ja kasvuhormonista (Goeddel, Heyneker et al., 1979) Nature 281:544). 10 mikrogramman määriä oligonukleotidejä T₂-T₁₅ fosforyloitiin kvantitatiivisesti γ -³²P-ATP:lla

(New England Nuclear) T₄ polynukleotidikinaasin läsnäollessa (Goeddel et al., 1979) antamaan spesifiset aktiivisuudet n. 1 Ci/mmol. Radio-merkityt osaset puhdistettiin 20-%:sella polyakryyliamidi/7 M urea-geeli-elektroforeesilla ja eluoitujen osasten sekvenssit todennettiin kaksiulotteisella elektroforeesi/homokromatografialla (Jay et al., 1974, Nucleic Acids Res. 1:331) osittaisille käärmeenmyrkkyuutoille. Jakeet T₁ ja T₁₆ jätettiin fosforyloimalla ei-toivotun polymeroitumisen vähentämiseksi jälkeentulevien liitântäreaktoiden aikana. Nämä oligonukleotidit (2 µg kumpaakin) koottiin neljäksi neljän jakeen ryhmäksi (ks. oheisten piirrosten kuvio 9) T₄ DNA-lignaasilla käyttäen julkaistuja menetelmiä (Goeddel et al., 1979). Reaktiotuotteet puhdistettiin geeli-elektroforeesilla 15-%:sella polyakryyliamidigeelillä, joka sisälsi 7 M ureaa (Maxam ja Gilbert, 1977, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:3455). Nämä neljä eristettyä tuotetta liitettiin yhteen ja reaktioseos analysoitiin 10-%:sella polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla. DNA tymosiini alfa 1-geenin kokoalueelta (90-105 emäsparia) sähköeluotiin.

Plasmidia pBR322 (0,5 µg) käsiteltiin BamHI- ja EcoRI-restriktioendonukleaaseilla ja osaset erotettiin polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesilla. Suuri osan otettiin talteen geelistä sähköeluutiolla ja liitettiin sen jälkeen koottuun synteettiseen DNA:han (Goeddel, Heyneker et al., 1979). Tätä seosta käytettiin transformoimaan E. coli K12 kanta 294, ATCC nro 31446. 5 % transtormointiseoksesta levitettiin LB-levyille, jotka sisälsivät 20 µg/ml ampisilliinia. Saadut 4 ampisilliiniresistenttiä pesäkettä olivat herkkiä tetrasykliinille, mikä johdattaa mieleen insertion tetrasykliiniresistenssi-geeniin. Plasmidien analyysi näistä neljästä pesäkkeestä osoitti, että jokaisessa tapauksessa plasmidi, joka nimettiin pThal-:ksi, sisälsi (a) BglII-kohdan, jota ei esiintynyt pBR322:ssa itsessään, osoittaen siten tymosiini alfa 1-geenin läsnäolon kuten kuviossa 7 on esitetty, ja (b) n. 105 emäsparin osan, joka on kehittynyt BamHI/EcoRI-pilkonnalla. Plasmidin pThal rakennustie

(ei piirretty asteikkoon) on esitetty oheisten piirrosten kuviossa 9, jossa raskaat pisteet osoittavat 5'-fosfaattiryhmiä.

3. Käsitellyn pTh α 1:n ja LE' (d)-osasen reaktio

5 Plasmidi pTh α 1 sisältää geenin, joka määrää ampicilliiniresistenssin ja rakennegeenin, joka määrää tymosiini alfa 1, joka on kloonattu 5'-koodaussäikeen päässä EcoRI-kohdaksi ja 3'-päästään BamHI-kohdaksi. Tymosiini-geeni sisältää samoin BglII-kohdan. Plasmidin muodostamiseksi, jo-
10 ka pystyy hyväksymään edellä valmistetun LE' (d)-osasen, pTM α 1 EcoRI-digeroitiin, mitä seurasi Klenow-polymeeri I reaktio dTTP:n ja dATP:n kanssa EcoRI-tähteiden tylpistämiseksi. Syntyneen tuotteen BglII-digerointi muodosti suoraviivaisen DNA-osasen, joka sisälsi geenin ampicilliini-
15 resistenssiä varten ja vastakkaisissa päissään BglII-häntiä ja tylpän pään. Syntynyt tuote voitiin uudelleen muodostaa renkaaksi reaktiolla LE' (d)-osasen kanssa, joka sisälsi BglII-häntiä ja tylpän pään, T₄-ligaasin läsnäollessa plasmidin pTrp24 muodostamiseksi. Tekemällä näin muodostetaan
20 uudelleen EcoRI-kohta asemaan, jossa tylppäpäälitöntä tapahtui.

E. Plasmidin pSOM7 Δ 2 Δ 4 rakentaminen

pTrp24:n peräkkäinen digerointi BglII:lla ja EcoRI:lla, mitä seurasi PAGE ja sähköeluutio, antaa osasen,
25 jossa on kodoneja LE' (d)-polypeptidiä varten, jossa on BglII-häntiä sisältävä pää ja EcoRI-häntiä sisältävä pää lähellä sen 3' koodauspäättettä. LE' (d)-osanen voidaan kloonata plasmidin pSom7 Δ 2 BglII-kohtaan muodostamaan LE'-polypeptidi/somatostatiini yhdistynyt proteiini, joka on
30 ekspressoitu tryptofaani-promoottori/operaattorin säätelyn alaisena. Tämän tekeminen vaatii (1) pSom7 Δ 2:n osittaisen EcoRI-digeroinnin EcoRI-kohdan pilkkomiseksi, joka on erillään tryptofaani-promoottori/operaattorista ja (2) pri-
meerisekvenssin oikean valinnan kodoni-lukukaavan oikein
35 ylläpitämiseksi ja EcoRI-pilkontakohdan uudelleenluomiseksi.

Siten 16 μ g plasmidia pSom7 Δ 2 laimennettiin 200 μ l:ään

- puskuria, joka sisälsi 20 nM Tris, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,02 NP40 pesuainetta ja 100 nM NaCl, ja käsiteltiin 0,5 EcoRI-yksiköllä. 15 minuutin kuluttua 37°C:ssa reaktio-seos uutettiin fenolilla, uutettiin kloroformilla, saostettiin etanolilla ja digeroitiin sen jälkeen BglII:lla.
- Saatu suurempi osanen eristettiin PAGE-menetelmällä, mitä seurasi sähköeluutio. Tämä osanen sisältää kodonit "LE' (p)" LE'-polypeptidin lähintä päätä varten, ts. kodonit BglII-kohdasta ylävirtaan. Tämä osanen liitettiin seuraavaksi em.LE'(d)-osaseen T₄ DNA-ligaasin läsnäollessa muodostamaan plasmidi pSom7Δ2Δ4, joka transformoinnin jälkeen E. coli kantaan 294 tuotti tehokkaasti yhdistelmäproteiinin, joka käsitti täysin uudelleenmuodostetun LE-polypeptidin ja somatostatiinin tryptofaani-promoottori/operaattorin säätelyn alaisena.
- F. Suoraviivaisen DNA rakentaminen, jossa on PstI- tähde 3'-päässä ja 5'-päässä BglII-tähde, joka sitoo geenin, joka määrää tetrasykliiniresistenssin
-
- Plasmidi pBR322 HindIII-digeroitiin ja ulostyöntyvät Hind-päät digeroitiin S1-nukleasilla. S1-nukleasi-digeroinnissa käsiteltiin 10 µg HindIII-pilkottua pBR322 30 µl:ssä S1-puskuria (0,3 M NaCl, 1 mM ZnCl₂, 25 mM natriumasetatti, pH 4,5) 300 yksiköllä S1-nukleasia 30 minuuttia 15°C:ssa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 1 µl 30 x S1-nukleasipysäytysliuosta (0,8 M tris-emäs, 50 nM EDTA). Seos uutettiin fenolilla, kloroformilla, saostettiin etanolilla ja EcoRI-digeroitiin sitten kuten edellä selostettiin. Syntyneellä osasella, joka oli saatu PAGE-menetelmällä, mitä seurasi sähköeluutio, on EcoRI-häntiä sisältävä pää ja tylppä pää, jonka koodaussäie alkaa nukleotidilla tymidiini. S1-digeroitu HindIII-tähde, joka alkaa tymidiinillä, voidaan liittää Klenow Polymerase I-käsiteltyyn BglII-tähteeseen niin, että muodostetaan uudelleen BglII-pilkontakohta liittännän jälkeen.
- Siten plasmidi pSOM7Δ2, joka valmistettiin esimerkissä 13C, BglII-digeroitiin ja syntyneet BglII-häntiä sisältävät

päät tehtiin kaksisäikeisiksi käsittelemällä Klenow Polymerase 1:llä käyttäen kaikki neljä deoksinukleotiditri-fosfaattia. Saadun tuotteen EcoRI-pilkonta, mitä seurasi pienen osasen PAGE ja sähköeluutio, antoi suoraviivaisen

5 DNA-pätkän, joka sisälsi tryptofaani-promoottori-operaattori- ja LE' "läheisimmän" sekvenssin kadonit ylävirtaan BglII-kohdasta ("LE'(p)"). Tuotteella oli EcoRI-pää ja tylppää pää, joka oli scuraus BglII-kohdan täyttämises-tä. BglII-kohta on kuitenkin muodostettu uudelleen liittämällä tylppä pää edellä S1-digeroitun HindIII-osasen tylp-

10 pään päähän. Siten nämä kaksi osasta liitettiin T₄ DNA-ligaasin läsnäollessa muodostamaan uudelleen renkaaksi muodostettu plasmidi pHKY10, joka saatettiin lisääntymään transformoimalla kykeneviin E. coli kannan 294 soluihin.

15 Tetrasykliiniresistentit solut, jotka sisälsivät rekombinanttiplasmidin pHKY10, valittiin ja plasmidi-DNA uutettiin. Digerointi BglII:lla ja PstI:lla, mitä seurasi suuren osasen eristäminen PAGE-menetelmällä ja sähköeluutiolla, antoi halutun suoraviivaisen DNA-pätkän, jossa oli PstI

20 ja BglII-hännät päissä. Tämä DNA-osanen, tällä tavalla valmistettuna pHKY10:stä, sisältää monistumisen alkukohdan ja on sentähden hyödyllinen komponenttina rakennettaessa plasmidia pIA7Δ4Δ1 jossa kumpaakin geeniä, jotka koodaavat trp LE'-polypeptidi-yhdistelmäproteiinia että tetrasyklii-

25 niresistenssiä, säätelee trp promoottori/operaattori.

G. Suoraviivaisen DNA, jossa on Trp promoottori/operaattori, rakentaminen

Esimerkissä 13E valmistettu plasmidi pSOM7Δ2Δ4 saatettiin osittaiseen EcoRI-digerointiin, mitä seurasi PstI-digerointi. Syntynyt osanen sisälsi trp promoottori/operaattorin ja eristettiin PAGE-menetelmällä, mitä seurasi sähköeluutio. Osittainen EcoRI-digerointi oli tarpeen osasen saamiseksi, joka pilkottiin somatostatiini-geenin 5'-pään viedestä, mutta ei pilkottu EcoRI-kohdasta, joka sijaitsi ampisilliiniresistenssigeenin ja trp promoottori/operaattorin välissä. Ampisilliiniresistenssi, joka menetettiin PstI-

30

35

leikkauksella ampisilliiniresistenssi-geenissä, voidaan palauttaa liitännän jälkeen lopulliseen pHKY10 suoraviivaisen DNA-johdannaiseen, joka tuotettiin edellä esimerkissä 13F.

5 H Insuliini A ketjurakennegeenin eristäminen

Insuliini A ketjurakennegeeni saatiin plasmidin pIA1, jonka rakenteen on esittänyt Goeddel et al., 1979, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:106, EcoRI- ja BamHI-dige-

10 roinnilla. Haluttu osan puhdistettiin PAGE:lla ja sähkö-

eluutiolla ja siinä oli EcoRI- ja BamHI-päätteet.

I. Insuliini A ketjurakennegeenin, trp promoottori/ope-

raattorin ja pHKY10-suoraviivaisen DNA-osasen, jossa on

PstI- ja BglII-päätteet, liitäntä

Insuliini A ketjurakennegeeni, suoraviivainen DNA-

15 osan, joka sisältää trp promoottori/operaattorin (valmis-

tettu esimerkissä 13G) ja pHKY10-suoraviivainen DNA-johdan-

nainen (valmistettu esimerkissä 13F) liitettiin toisiinsa

oikein suunnattuina, kuten on kuvattu kuviossa 3, muodosta-

maan haluttu plasmidi pIA7Δ4Δ1. Plasmidi pIA7Δ4Δ1 voidaan

20 helposti valita ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssin

palautumisen perusteella.

Esimerkki 14

Rekombinantti-plasmidin pPrl rakentaminen

Plasmidi pIA7Δ4Δ1 sisältää yhden ainoan BamHI-pilkon-

25 takohdan, joka sallii bakteriofagin lambda λCI:n ja λrex:n

sisältävän 2,5 Kb BglII-osasen insertion. Tämä tehtiin pää-

asiallisesti esimerkin 1 esityksen mukaisesti. Siten haluttu

pPrl-plasmidi valmistettiin liittämällä BglII-osan

pIA7Δ4Δ1:n BamHI-kohtaan.

30 Esimerkki 15

Rekombinantti-plasmidin pPrl transformointi E coli K12

C600R_k-M_k-:hon

Haluttu transformointi suoritettiin pääasiallisesti

35 esimerkin 2 esityksen mukaisesti, paitsi että E. coli-solut

transformoitiin DNA:lla, joka oli valmistettu esimerkissä 14

eikä esimerkissä 1. Transformantit nimettiin E. coli K12

C600R_k-M_k- /pPR1:ksi ja valittiin ja viljeltiin. Saatuja pesäkkeitä testattiin odotettujen ilmiöiden suhteen ja niitä käytettiin plasmidin pPR1 eristämiseen ja vahvistamiseen. Plasmidin pPR1 restriktioentsyymianalyysi osoitti, että λ rex-, eikä λ cI-:n oli lähinnä trp E-insuliini A-ketjugeeniä. Plasmideja, joilla on päinvastainen suuntautuminen ei havaittu edellä tuotettujen transformanttien joukossa.

Esimerkki 16

10 Plasmidin pPR1 vahvistaminen, eristäminen ja sen jälkeen transformointi E. coli K12 RV308:aan

E. coli K12 C600R_k-M_k- /pPR1:n plasmidi-DNA:n vahvistaminen ja eristäminen suoritettiin pääasiallisesti esimerkin 3 esityksen mukaisesti. Plasmidin pPR1 transformointi E. coli K12 RV308:aan sen jälkeen suoritetaan pääasiallisesti esimerkin 4 esityksen mukaisesti antamaan halutut E. coli K12 RV308/pPR1-transformantit.

Esimerkki 17

20 E. coli K12 RV308 λ cI90/pPR1:n rakentaminen lysogeenimallilla λ cI90:lla

Haluttu rakentaminen suoritetaan pääasiallisesti esimerkin 5 esityksen mukaisesti. Saadut E. coli K12 RV308 λ cI90/pPR1-peräkkeet voidaan testata hyvän kasvun todentamiseksi 32°C:ssa ja herkkyyden todentamiseksi 42°C:ssa.

Esimerkki 18

Rekombinantti-plasmidin pPR1 transformointi E. coli K12 C600:aan

30 Haluttu rakentaminen suoritetaan pääasiallisesti esimerkin 4 esityksen mukaisesti. Eloinjääneet pesäkkeet voidaan testata odotettujen ilmiöiden suhteen ja ne muodostuvat halutuista E. coli K12 C600 pPR1-transformanteista.

Esimerkki 19

E. coli K12 C600 λ CI90/pPR1:n rakentaminen lysogenoimalla λ CI90:lla

Haluttu rakentaminen suoritetaan pääasiallisesti
 5 esimerkin 5 esityksen mukaisesti. Saadut E. coli K12
 C600 λ CI90-pesäkkeet voidaan testata kasvun todentamiseksi
 32°C:ssa ja herkkyyden todentamiseksi 42°C:ssa.

Esimerkki 20

10 E. coli K12 C600 R_k - M_k - λ CI90)pPR1:n rakentaminen lysogenoi-
 malla λ CI90:llä

Haluttu rakentaminen saatiin valmistamalla E. coli
 K12 C600 R_k - M_k -pPR1 kuten esimerkissä 14 kuvattiin ja lysoge-
 noimalla sitten transformantit bakteriofagilla λ CI90 pääasial-
 lisesti esimerkin 5 esityksen mukaisesti. Eloojääneet pe-
 15 säkkeet testattiin odotettujen ilmiasujen suhteen ja ne
 muodostavat halutun kannan.

Esimerkki 21

Plasmidin pIB7 Δ 4 Δ 1 rakentaminen

Haluttu plasmidi rakennettiin esimerkin 13A-I mukai-
 20 sesti, paitsi että lopullisessa liitännässä käytettiin raken-
 ne-geeniä, joka määrää insuliini B-ketjun eikä insuliini
 A-ketjua. Insuliini B ketjurakennegeeni saatiin plasmidin
 pIB, jonka rakentamisen on esittänyt Geoddel et al., 1979,
 EcoRI- ja BamHI-digeroinnilla. Insuliini B-ketjua koodaava
 25 DNA-osanen puhdistettiin PAGE:lla ja sähköeluutiolla ja sillä
 oli EcoRI- ja BamHI-päätteet.

Plasmidi pIB7 Δ 4 Δ 1 on esitetty kuviossa 5 ja voidaan
 helposti valita ampicilliini-tetrasykliiniresistenssin pa-
 lautumisen perusteella.

30 Esimerkki 22

Rekombinantti-plasmidin pPR3 rakentaminen

Ainoa BamHI-pilkontakohta plasmidissa pIB7 Δ 4 Δ 1 sallii
 bakteriofagi lambda:n λ CI:n ja λ rex:n geenin sisältävän 2,5 Kb
 BglIII-osasen kloonauksen pIB7 Δ 4 Δ 1:lle. Tämä voidaan suorittaa
 35 pääasiallisesti esimerkin 1 esityksen mukaisesti. Siten
 λ BglIII-osasen liittäminen pIA7 Δ 4 Δ 1:n BamHI-kohtaan antaa halutun
 plasmidin pPR3.

Esimerkki 23

Rekombinantti-plasmidin pPR3 transformointi E. coli K12
C600R_k-M_k-:hon

5 Transformointi suoritettiin pääasiallisesti esimerkin
2 esityksen mukaisesti, paitsi että E. coli-solut transfor-
moitiin DNA:lla, joka oli valmistettu esimerkissä 22 eikä
esimerkissä 1.

10 Transformantit nimettiin E. coli K12 C600R_k-M_k-/
pPR3:ksi ja valittiin ja viljettiin. Saatuja pesäkkeitä
testattiin odotettujen ilmiäsuojen suhteen ja käytettiin
plasmidin pPR3 eristämiseen ja vahvistamiseen. Plasmidin
pPR3 restriktioentymianalyysit osoittivat, että λ rex-
eikä λ cI-geeni oli lähimpänä trp E-insuliini B-ketju-geeniä.
15 Plasmideja, joilla on päinvastainen suuntaus, ei havaittu
edellä tuotettujen transformanttien joukossa.

Esimerkki 24

Rekombinantti-plasmidin pPR3 vahvistaminen, eristäminen
ja sen jälkeen transformointi E. coli K12 RV308:aan

20 E. coli K12 C600R_k-M_k-/pPR3:n plasmidi-DNA vahvis-
tettiin ja eristettiin pääasiallisesti esimerkin 3 esityk-
sen mukaisesti. Plasmidin pPR3 transformointi E. coli K12
RV308:aan sen jälkeen antamaan E. coli K12 RV308/pPR3 suori-
tetaan pääasiallisesti esimerkin 4 esityksen mukaisesti.

Esimerkki 25

25 Tekombinantti-plasmidin pPR3 transformointi E. coli K12
C600:aan

pPR3:n transformointi E. coli K12 C600:aan
E. coli K12 C600/pPR3:n tuottamiseksi tehdään pääasiallises-
ti esimerkin 4 esityksen mukaisesti. Eloönjääneitä pesäkkeitä
30 voidaan testata odotettujen ilmiäsuojen suhteen ja ne muodos-
tavat halutuista E. coli K12 C600/pPR3-transformanteista.

Esimerkki 26

E. coli K12 RV308 λ cI90/pPE3:n rakentaminen lysogenoimalla
 λ cI90:lla

35 Haluttu rakenne tehdään lysogenoimalla E. coli K12
RV 308/pPR3 bakteriofagilla λ cI90 pääasiallisesti esimerkin

5 esityksen mukaisesti. Saatua E. coli K12 RV308 λ cI90/pPR3-pesäkkeitä voidaan testata kasvun todentamiseksi 32°C:ssa ja herkkyyden 42°C:ssa.

Esimerkki 27

- 5 E. coli K12 C600 λ cI90/pPR3:n rakentaminen lysogenoimalla λ cI90:llä
-

Haluttu rakenne tehdään lysogenoimalla E. coli K12 C600/pPR3 bakteriofagilla λ cI90 pääasiallisesti esimerkin 5 esityksen mukaisesti. Saatua E. coli K12 C600 λ cI90/pPR3-pesäkkeitä voidaan testata kasvun todentamiseksi 32°C:ssa ja herkkyyden 42°C:ssa.

Esimerkki 28

E. coli K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR3:n rakentaminen lysogenoimalla λ cI90:llä

- 15 Haluttu rakenne saatiin valmistamalla E. coli K12 C600R_k-M_k-pPR3, kuten esimerkissä 21 selostettiin ja lysogenoimalla sitten transformantit bakteriofagilla λ cI90 pääasiallisesti esimerkin 5 esityksen mukaisesti. Saadut E. coli K12 C600R_k-M_k- λ cI90/pPR3-pesäkkeet testattiin
- 20 kasvun todentamiseksi 32°C:ssa ja herkkyyden todentamiseksi 42°C:ssa.

Esimerkki 29

- Menetelmä isäntäsolujen, jotka sisältävät rekombinantti-plasmidin pPR3, pysyvyyksien määrittämiseksi valinnan kanssa ja ilman sitä
-

Plasmidi-pidätyksen suhteen testattavia kantoja ylläpidettiin logaritmisessa kasvussa ei-selektiivisissä väliaineissa (L-liemi) jaksottain ala-viljelmällä tuoreisiin väliaineisiin. Plasmidi-pidätyksen aste määritettiin

30 esimerkin 12 menetelmällä.

Muita edustavia kantoja, jotka rakennetaan edellä esitetyn opetuksen mukaisesti ovat:

<u>Esimerkki nro</u>	<u>Nimi</u>
30	E. coli K12 RV308 λ cI857/pAR1
31	E. coli K12 C600 λ cI90/pAR1
32	E. coli K12 C600R _k -M _k - λ cI90/pAR1
5 33	E. coli K12 C600/pAR1
34	E. coli K12 C600/pAR2

Rekombinantti-plasmidin pysyvyydet mitattiin kuten edellä esimerkissä 12 ja 29 selostettiin. Tulokset esitetään prosentteina taulukossa 2 kannoille E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR2 ja E. coli K12 RV308/pIA2, ja taulukossa 3 kannoille E. coli K12 C600_k-M_k- λ cI90/pPR3 ja E. coli K12 C600R_k-M_k-pPR3.

Taulukko 2

Rekombinantti-plasmidien pysyvyyksiä			
15 Viljelytoisto-	Plasmidi-pidätys-%		
jen lukumäärä	E.coli K12 RV308 λ cI90/pAR2	E. coli K12 RV308/pIA2	
9	100	100	
14	100	36	
23	100	22	
20 32	83	13	
40	82	9	

Taulukko 3

Rekombinantti-plasmidien pysyvyyksiä			
25 Viljely-	Plasmidi-pidätys-%		
toistojen lukumäärä	E. coli K12 C600R _k -M _k - λ cI90/pPR3	E. coli K12 C600R _k -M _k -pPR3	
0	100	100	
34	100	0	

30 Tulokset taulukoissa 2 ja 3 osoittavat selvästi selektiivisen systeemin paremmuuden rekombinantti-plasmidien ylläpitämiseksi bakteeripopulaatioissa. Noin 78 % soluista E. coli K12 RV308/pIA2:n viljelyssä olivat plasmidi-miinus 23 viljelytoiston jälkeen ja n. 100 % soluista E. coli K12 C600R_k-M_k-pPR3-viljelyssä olivat plasmidi-miinus 34 viljelytoiston jälkeen. Lisäksi, 23 ja vastaavasti 34 viljely-

toiston jälkeen yksikään soluista E. coli K12 RV308 λ cI90/pAR2:n viljelyssä ja E. coli C600 R_k-M_k- λ cI90/pPR3:n viljelyssä, joilla oli selektiivinen systeemi tilalla, oli plasmidi-miinus. Laajakantoisimman kasvun jälkeen nähtiin
 5 pientä plasmidi-segregaatiota. Tulokset heijastavat kuitenkin rekombinaatiota profagin ja plasmidin välillä.

Plasmidi-pystyvyys rakennetussa kannassa E. coli K12 C600R_k-M_k- λ cI857/pAR1 määritettiin viljelemällä kantaa L-liemessä yli yön erikseen 42°C:ssa (rajoittavat olosuhteet) ja 32°C:ssa (sallivat olosuhteet). Plasmidi⁺-solujen lukuisuus otettiin viljelyjen suhteeksi 42°C:ssa viljelujen, jotka kasvoivat 32°C:ssa kokonaislukumäärään. Suhde ilmaistiin prosenttina. Tulokset osoittavat, että
 10 n. 46 % soluista viljelyssä, joka oli kasvatettu sallivissa olosuhteissa ja siten ilman tätä keksintöä, olivat plasmidi-miinus, kun taas yksikään soluista viljelyssä, joka oli kasvatettu rajoittavissa olosuhteissa ja niinmuodoin tämän keksinnön mukaisesti, ei ollut plasmidi-miinus viljelyvaiheessa. Tämä keksintö on selvästi varsin käyttökelpoinen
 15 ja tehokas rekombinantti-plasmidien ylläpitämiseksi bakteeripopulaatioissa.
 20

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä isäntäsolujen, jotka sisältävät rekombinantti-DNA:n, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, stabiloimiseksi ja valikoimiseksi, t u n n e t t u siitä, että

5 a) transformoidaan isäntäsoluja rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää sekä repressorigeenin että geenin, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin; ja

10 b) lysogenoidaan transformoidut isäntäsolut lysogeenisellä organismilla, joka sisältää merkitsijän, joka on kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava isäntäsoluissa, mutta joka tukahtuu transformoiduissa isäntäsoluissa rekombinantti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; edellytyksenä rajoitukselle, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori sisältää replikonin ja promoottorin, jotka eivät ole herkkiä repressorille, ja edellytyksenä lisärajoitukselle, että kun transformoidut isäntäsolut lysegenoidaan lysogeenisellä organismilla, joka sisältää geenin,

15 joka on ehdonalaisesti kuolettava, on, että syntyneet isäntäsolut viljellään rajoittavissa olosuhteissa.

20

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, on luonnossa esiintyvä geeni, ei-luonnollinen geeni tai geeni, joka on osaksi luonnossa esiintyvä ja osaksi syntetttinen tai ei-luonnollinen.

25

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että geeni, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, on geeni, joka koodaa ihmisen insuliinia, ihmisen pre-pro-insuliinia, ihmisen proinsuliinia, ihmisen insuliinin A-ketjua, ihmisen insuliinin B-ketjua, ei-ihmisen insuliinia, ihmisen kasvuhormonia, ei-ihmisen kasvuhormonia, ihmisen interferonia, ei-ihmisen interferonia, virusantigeeniä, urokinaasia, jotakin polypeptidiä tai jotakin peptidihormonia tai entsyymiä.

30

35

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on kromosomaa-
linen DNA replikaatiomutaatiorepressor, soluseinän synte-
simutaatiorepressor, ribosomimutaatiorepressor, RNA-poly-
5 meraasimutaatiorepressor, tRNA-mutaatiorepressor, amino-
asyyli, tRNA-syntetaasimutaatiorepressor, solun jakautumis-
mutaatiorepressor tai nonsense-mutaatiorepressor.

5. Jonkun patenttivaatimuksien 1-4 mukainen menetel-
mä, t u n n e t t u siitä, että cI-repressor-geeni on
10 cI857.

6. Jonkun patenttivaatimuksien 1-5 mukainen menetel-
mä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on lämpöti-
laherkkä ja inaktivoitunut lämpötilassa tietyllä lämpötila-
alueella tai sen yläpuolella.

15 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että lämpötila-alue on väliltä 38-44°C.

8. Jonkun patenttivaatimuksien 1-4 mukainen menetel-
mä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on bakte-
rio-fagin lambda cI-repressorigeeni.

20 9. Jonkun patenttivaatimuksien 1-4 mukainen menetel-
mä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on bakterio-
fagi lambdan λ cro-geeni.

10. Jonkun patenttivaatimuksien 1-9 mukainen mene-
telmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-
25 kloonausvektori on plasmidi.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että plasmidi on pAR2.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että plasmidi on pAR1.

30 13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvek-
tori on plasmidi pPR1.

14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori
35 on plasmidi pPR3.

15. Jonkun patenttivaatimuksien 1-14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lysogeeninen organismi sisältää bakteriofagi λ cI-geenin.

5 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lysogeeninen organismi on bakteriofagi lambda cI90.

17. Jonkun patenttivaatimuksen 1-14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lysogeeninen organismi on bakteriofagi λ cI857.

10 18. Jonkun patenttivaatimuksien 1-17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat prokaryootteja.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat bakteereja.

15 20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerit ovat E. coli, E.coli K12, E. coli K12 RV308, E. coli K12 C600, E. coli K12 C600R_k-M_k-, Bacillus, Bacillus subtilis, Staphylococcus, Streptococcus, Actinomyces, Streptomyces, Serratia, 20 Pseudomonas tai Agrobacterium.

21. Jonkun patenttivaatimuksien 1-17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat vapaasti eläviä eukaryootteja, jotka ovat viljelyalttiita.

25 22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat sieniä.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sienet valitaan ryhmästä Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium ja hiiva.

30 24. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat peräisin monisoluisen organismin kudoksesta, jolloin solut ovat alttiita viljeltäviksi.

35 25. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on bakteriofagi.

26. Transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää

a) rekombinantti-DNA-kloonausvektorin, joka sisältää sekä repressorigeenin tai geenin, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin; ja

b) kromosomaalisen merkitsijän, joka on kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava, mutta joka tukeutuu rekombinantti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; ja

edellytyksenä rajoitukselle on, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori sisältää replikonin ja promoottorin, jotka eivät ole herkkiä repressorille.

27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on plasmidi.

28. Patenttivaatimuksen 26 tai 27 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että geeni, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, on luonnossa esiintyvä geeni, ei-luonnollinen geeni tai geeni, joka on osaksi luonnossa esiintyvä ja osaksi synteettinen tai ei-luonnollinen.

29. Patenttivaatimuksen 26, 27 tai 28 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että geeni, joka ekspressoii funktionaalisen polypeptidin, on geeni, joka koodaa ihmisen insuliinia, ihmisen pre-pro-insuliinia, ihmisen proinsuliinia, ihmisen insuliini A-ketjua, ihmisen insuliini B-ketjua, muun kuin ihmisen insuliinia, ihmisen kasvuhormonia, muun kuin ihmisen kasvuhormonia, ihmisen interferonia, muun kuin ihmisen interferonia, virusantigeeniä, urokinaasia, jotakin polypeptidiä tai jotakin peptidihormonia tai entsyymiä.

30. Jonkun patenttivaatimuksen 26-29 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on kromosomaalinen DNA-replikaatiomutaatiorepressor, soluseinän synteesimutaatiorepressor, ribosomimutaatio-

repressori, RNA-polymeraasimutaatiorepressori, tRNA mutaatiorepressori, DNA-restriktio- ja modifikaatiomutaatiorepressori, aminoasyyli-tRNA-syntetaasimutaatiorepressori, solun jakautumis-mutaatiorepressori tai nonsense-mutaatiorepressori.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on bakteriofagin lambda cI-repressorigeeni.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on cI857.

33. Jonkun patenttivaatimuksen 26-33 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että kromosomaalinen merkitsijä on bakteriofagi λ cI-geeni, joka ei tuota funktionaalista cI-repressoria.

34. Patenttivaatimuksen 34 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että λ cI-geeni on bakteriofagi lambda cI90.

35. Jonkun patenttivaatimuksen 26-33 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että kromosomaalinen merkitsijä on bakteriofagi λ cI857.

36. Jonkun patenttivaatimuksen 26-36 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on prokaryootti.

37. Patenttivaatimuksen 37 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on bakteeri.

38. Patenttivaatimuksen 37 tai 38 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että bakteeri on E. coli K12 RV308, joka sisältää plasmidin pAR1, pAR2, pPR1 tai pPR3.

39. Patenttivaatimuksen 37 tai 38 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että bakteeri on E. coli K12 C600, joka sisältää plasmidin pAR1, pAR2, pPR1 tai pPR3.

40. Patenttivaatimuksen 37 tai 38 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että bakteeri

on E. coli K12 C600R_k-M_k-, joka sisältää plasmidin pAR1, pAR2, pPR1 tai pPR3.

41. Patenttivaatimuksen 39, 40 tai 41 transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on lysogenoitu bakteriofagilla λ cI90.

42. Patenttivaatimuksen 39, 40 tai 41 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on lysogenoitu bakteriofagilla λ cI857.

43. Jonkun patenttivaatimuksen 26-36 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on vapaasti elävä eukaryootti, joka on altis viljeltäväksi.

44. Patenttivaatimuksen 44 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on sieni.

45. Patenttivaatimuksen 45 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että sieni on Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium tai hiiva.

46. Jonkun patenttivaatimuksen 26-36 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on peräisin monisoluisen organismin kudoksesta.

47. Patenttivaatimuksen 26 mukainen transformoitu isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on bakteriofagi.

48. Menetelmä isäntäsolujen hajottamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tuodaan kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava merkitsijä, joka saa aikaan solun hajoamisen.

(a) isäntäsoluihin, jotka on transformoitu rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää repessorigeenin, joka tukahuttaa merkitsijän, joka aikaansaa isäntäsolun hajoamisen ja joka inaktivoituu lämpötilassa määrätyllä lämpötila-alueella tai sen yläpuolella, ja lysogenoidaan transformoidut isäntäsolut lysogeenisellä organismilla, joka sisältää merkitsijän, joka on kuolettava tai ehdonalaisesti kuolettava isäntäsoluissa, mutta joka tukahtuu

transformoiduissa isäntäsoluissa rekombinantti-DNA-kloonausvektorin sisältämän repressorigeenin vaikutuksesta; tai (b) isäntäsoluihin lysogenoimalla isäntäsolut lysogeenisellä organismilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuolettavan merkitsijän, tai transformoimalla isäntäsolut rekombinantti-DNA-kloonausvektorilla, joka sisältää ehdonalaisesti kuolettavan merkitsijän, ja viljellään syntyneitä isäntäsoluja lämpötilassa, joka inaktivoi repressorin tai, kun kysymyksessä on ehdonalaisesti kuolettava merkitsijä, lämpötilassa, joka ei ole lämpötila-alueella isäntäsolujen sallivaa viljelyä varten.

49. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori, joka sisältää repressorigeenin, sisältää myös geenin, joka ekspressoii funktionaalisen popyptidin, ja replikonin ja promoottorin, jotka eivät ole herkkiä repressorille.

50. Patenttivaatimuksen 49 tai 50 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lämpötila, joka inaktivoi repressorin, on väliltä 38-44°C.

51. Patenttivaatimuksen 49, 50 tai 51 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on plasmidi.

52. Jonkun patenttivaatimuksen 49-52 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on kromosomaalinen DNA-replikaatiomutaatiorepressorin, soluseinän synteessimutaatiorepressorin, ribosomimutaatiorepressorin, RNA-polymeraasimutaatiorepressorin, tRNA-mutaatiorepressorin, aminoasyyli-tRNA-syntetaasimutaatiorepressorin, solunjakautumis-mutaatiorepressorin tai nonsense-mutaatiorepressorin, solunjakautumis-mutaatiorepressorin tai nonsense-mutaatiorepressorin.

53. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että repressorigeeni on bakteriofagin lambda cI-repressorigeeni.

54. Patenttivaatimuksen 53 tai 54 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että CI-repressorigeeni on CI857.

55. Jonkun patenttivaatimuksen 49-52 mukainen
5 menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lysogeeninen organis-
nismi sisältää bakteriofagi λ CI-geenin, joka ei tuota
funktionaalista cI-repressoria.

56. Patenttivaatimuksen 56 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lysogeeninen organismi on
10 bakteriofagi lambda cI90.

57. Patenttivaatimuksen 53 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat leviä, jotka
ovat alttiita viljeltäviksi.

58. Patenttivaatimuksen 49-57 mukainen menetelmä,
15 t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat prokaryoot-
teja.

59. Patenttivaatimuksen 59 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat bakteereja.

60. Patenttivaatimuksen 59 tai 60 mukainen menetel-
20 mä, t u n n e t t u siitä, että bakteerit ovat E. coli,
E. coli K12, E. coli K12 RV308, E. coli K12 C600, E. coli
K12 C600-R_k-M_k-, Bacillus, Bacillus subtilis, Staphylococ-
cus, Actinomycetes, Streptomyces, Serratia, Pseudomonas tai
Agrobacterium.

61. Jonkun patenttivaatimuksen 49-57 mukainen mene-
25 telmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat vapaasti
eläviä eukaryootteja, jotka ovat alttiita viljeltäviksi.

62. Patenttivaatimuksen 62 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat sieniä.

63. Patenttivaatimuksen 62 tai 63 mukainen menetelmä,
30 t u n n e t t u siitä, että sienet valitaan ryhmästä
Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium ja
hiiva.

64. Patenttivaatimuksen 62 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että isäntäsolut ovat peräisin moni-
soluisen organismin kudoksesta, jolloin solut ovat alttii-
ta viljeltäviksi.

65. Jonkun patenttivaatimuksen 49-57 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on plasmidi pAR2, pPR1 tai pPR3.

5 66. Patenttivaatimuksen 59, 60 tai 61 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transformoidut isäntäsolut ovat E. coli K12 RV308, joka sisältää plasmidin pAR2, pPR1 tai pPR3.

10 67. Patenttivaatimuksen 59, 60 tai 61 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transformoidut isäntäsolut ovat E.coli K12 C600, joka sisältää plasmidin pAR2, pPR1 tai pPR3.

15 68. Patenttivaatimuksen 59, 60 tai 61 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että transformoidut isäntäsolut ovat E. coli K12 C600_{R_k}-M_k-, joka sisältää plasmidin pAR2, pPR1 tai pPR3.

69. Patenttivaatimuksen 67, 68 tai 69 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että fransformoidut isäntäsolut ovat lysogenoitu bakteriofagilla λ c.

20 70. Patenttivaatimuksen 49 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rekombinantti-DNA-kloonausvektori on bakteriofagi.

Patentkrav:

1. Förfarande för stabilisering och väljande av
värdceller, vilka innehåller rekombinant-DNA som uttrycker
5 en funktionell polypeptid, k ä n n e t e c k n a t därav,
att
a) värdcellerna transformeras med en rekombinant-DNA-klonings-
vektor som innehåller både en repressorgen och en gen som
uttrycker en funktionell polypeptid; och
10 b) de transformerade värdcellerna lysogeniseras med en lys-
ogenisk organism som innehåller en markör som är dödande
eller villkorligt dödande eller villkorligt dödande i värd-
cellerna men undertrycks i de transformerade värdcellerna
genom repressorgen som innehålls i rekombinant-DNA-klonings-
15 vektorn; med den begränsningen att rekombinant-DNA-klonings-
vektorn innehåller ett replikon och en promotor, vilka ej
är känsliga för repressorn, och ytterligare med den den
begränsningen att då de transformerade värdcellerna lys-
ogeniseras med en lysogenisk organism, vilken innehåller en
20 gen som är villkorligt dödande, odlas de resulterande värd-
cellerna under restriktiva förhållanden.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att genen som uttrycker en funktionell
polypeptid är en naturellt förekommande gen, en icke naturellt
25 förekommande gen, eller en gen som delvis är naturellt före-
kommande och dels syntetisk eller icke naturellt förekommande.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att genen som uttrycker en funk-
tionell polypeptid är en gen som kodar för humant inslulin,
30 humant pre-proinsulin, humant proinsulin, human insulin,
human insulin-A-kedja, human insulin-B-kedja, icke humant
insulin, humant tillväxthormon, icke humant tillväxthormon,
humant interferon, icke humant interferon, viral antigen,
urokinas någon polypeptid eller något peptidhormon eller
35 enzym.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, 2 eller 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att repressorgenen är
en kromosomal DNA-replikationsmutationsrepressor, cell-
vägg-syntesmutationsrepressor, ribosommutationsrepressor,
5 RNA-polymerasmutationsrepressor, tRNA-mutationsrepressor,
aminoacyl-tRNA-syntetasmutationsrepressor, celldelning-
mutationsrepressor eller en nonsensmutationsrepressor,

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4
k ä n n e t e c k n a t därav, att cI-repressorgenen är
10 cI857.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-5,
k ä n n e t e c k n a t därav, att repressorgenen är
temperaturkänslig och inaktiveras vid eller över en tem-
peratur inom ett visst temperaturområde.

15 7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att temperaturområdet är 38-44°C.

8. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att repressorgenen är
en cI-repressorgen av bakteriofag lambda.

20 9. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att repressorgenen är
λcro-genen av bakteriofag lambda.

10. Förfarande enligt något av patentkraven 1-9,
k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-
25 kloningsvektorn är en plasmid.

11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att plasmiden är pAR2.

12. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att plasmiden är pAR1.

30 13. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn
är plasmid pPR1.

14. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn
35 är plasmid PpR3.

15. Förfarande enligt något av patentkraven 1-14, k ä n n e t e c k n a t därav, att den lysogeniska organismen innehåller en bakteriofag λ CI-gen.

16. Förfarande enligt patentkravet 15, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att den lysogeniska organismen är bakteriofag lambda CI90.

17. Förfarande enligt något av patentkraven 1-14, k ä n n e t e c k n a t därav, att den lysogeniska organismen är bakteriofag λ CI857.

18. Förfarande enligt något av patentkraven 1-7, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar prokaryoter.

19. Förfarande enligt patentkravet 18, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar bakterier.

20. Förfarande enligt patentkravet 19, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att bakterierna är E.coli, E.coli K12, E.coli K12 RV308, E.coli k12 C600, E.coli, K12 C600R_k-M_k-, Bacillus, Bacillus subtilis, Staphylococcus, Streptococcus, Actinomyces, Streptomyces, Serratia, Pseudomonas
20 eller Agrobacterium.

21. Förfarande enligt något av patentkraven 1-17, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar fritt levande eukaryoter, varvid de nämnda eukaryoterna är mottagliga för odling.

22. Förfarande enligt patentkravet 21, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar svampar.

23. Förfarande enligt patentkravet 22, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att svamparna valts bland neurospora, cephalosporium, Aspergillus, Penicillium och jäst.

24. Förfarande enligt patentkravet 21, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att värdcellerna derivats från vävnader av en multiceullulär organism, varvid de nämnda cellerna är mottagliga för odling.

25. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
35 t e c k n a t därav, att rekombinant-SNA-kloningsvektorn är ett bakteriofag.

26. Transformerad värdcell, k ä n n e t e c k n a d

därav, att den omfattar

a) en rekombinant-DNA-kloningsvektor som innehåller både en repressorgen och en gen som uttrycker en funktionell polypeptid; och

5 b) en komosomal markör, vilken är dödande eller villkorligt dödande men är undertryckt av repressorgen som innehålls i rekombinant-DNA-kloningsvektorn; med den begränsningen att rekombinant-DNA-kloningsvektorn innehåller ett replikon och en promotor, vilka ej är känsliga för repressorn.

27. Transformerad värdcell enligt patentkravet 26, k ä n n e t e c k n a d därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn är en plasmid.

28. Transformerad värdcell enligt patentkravet 26 eller 27, k ä n n e t e c k n a d därav, att genen som uttrycker en funktionell polypeptid är en naturligt förekommande gen, en icke naturligt förekommande och dels syntetisk eller icke naturligt förekommande.

29. Transformerad värdcell enligt patentkravet 26, 27 eller 28, k ä n n e t e c k n a d därav, att genen som uttrycker en funktionell polypeptid är en gen som kodar för humant insulin, humant pre-proinsulin, humant proinsulin, humant tillväxthormon, icke humant interferon, viral antigen, urokinas någon polypeptid eller något peptidhormon eller

25 enzym.

30. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-29, k ä n n e t e c k n a d därav, att repressorgen är en kromosomal DNA-replikationsmutationsrepressor, cellvägg-syntesmutationsrepressor, ribosommutationsrepressor, RNA-polyerasmutationsrepressor, tRNA-mutationsrepressor, aminoacyl-tRNA-syntetasmutationsrepressor, celledelning-mutationsrepressor eller en nonsensmutationsrepressor.

31. Transformerad värdcell enligt patentkravet 30, k ä n n e t e c k n a d därav, att repressorgen är en cI-repressorgen av bakteriofag lambda.

32. Transfomerad värdcell enligt patentkravet 31, k ä n n e t e c k n a d därav, att cI-repressorgenen är cI857.

33. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-32, k ä n n e t e c k n a d därav, att kromosomala markören är en bakteriofag λ cI-gen som ej producerar en funktionell cI-repressor.

34. Transfomerad värdcell enligt patentkravet 33, k ä n n e t e c k n a d därav, att λ cI-genen är bakteriofag lambda cI90.

35. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-33, k ä n n e t e c k n a d därav, att kromosomala markören är bakteriofag cI857.

36. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-36, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är ett proaryot.

37. Transformerad värdcell enligt patentkravet 36, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är en bakterie.

38. Transformerad värdcell enligt patentkravet 36 eller 37, k ä n n e t e c k n a d därav, att bakterien är E.coli K12 RV308 som innehåller plasmid pAR1, pAR2, pPR1 eller pPR3.

39. Transfomerad värdcell enligt patentkravet 36 eller 37, k ä n n e t e c k n a d därav, att bakterien är E.coli K12 c600 som innehåller plasmid pSR1, pAR2, pPR1 eller pPR3.

40. Transformerad värdcell enligt patentkravet 36 eller 37 k ä n n e t e c k n a d därav, att bakterien är E.coli K12 C600R_k-M_k- som innehåller plasmid pAR1, pAR2, pPR1 eller pPR3.

41. Transfomerad värdcell enligt patentkravet 38, 39 eller 40, k ä n n e t e c k n a d därav, att den lyso-geniserats med bakteriofag λ cI90.

42. Transfomerad värdcell enligt patentkravet 38, 39 eller 40, k ä n n e t e c k n a d därav, att den lyso-geniserats med bakteriofag λ cI857.

43. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-35, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är ett fritt levande eukaryot, varvid eukaryotet är mottagligt för odling.

5 44. Transformerad värdcell enligt patentkravet 43, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är en svamp.

45. Tranfomrmerad värdcell enligt patentkravet 44, k ä n n e t e c k n a d därav, att svamparna valts bland Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium och jäst.

10 46. Transformerad värdcell enligt något av patentkraven 26-35, k ä n n e t e c k n a d därav, att den deriverats från vävnad av en multicellulär organism.

47. Transformerad värdcell enligt patentkravet 26, k ä n n e t e c k n a d därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn är ett bakteriofag.

48. Förfarande för lyserande av värdceller, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar införande av en dödande eller villkorligt dödande markör, vilken för orsakar värdcellysering, i

20 a) värdceller, vilka transformerats med en rekombinant-DNA-kloningsvektor som innehåller en repressorgen som undertrycker en markör som förorsakar värdcellysering och inaktiveras vid eller ovanför en temperatur inom ett visst temperaturområde, och lysogeniserande av de transformerade, och
25 lysogeniserande av de transformerade värdcellerna med en lysogenisk organism som innehåller en märkör som är dödande eller villkorligt dödande i värdcellerna men som undertrycks i de transformerade värdcellerna genom repressorgen som innehålls i rekombinant-DNA-kloningsvektorn; eller

30 b) i värdceller genom lysogeniserande av värdcellerna med en lysogenisk organism som innehåller en villkorligt dödande markör, eller genom transformerande av värdcellerna med en rekombinant-DNA-kloningsvektor som innehåller en villkorligt dödande markör,

35 och odlar de resulterande värdcellerna vilka inaktiverar ..

repressorn eller, då det är fråga om en villkorligt dödande markör, vid en temperatur som ej ligger inom temperaturområdet för tillåtlig odling av värdcellerna.

49. Förfarande enligt patentkravet 48, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn, vilken innehåller en repressorgen, även innehåller en gen som uttrycker en funktionell polypeptid och ett replikon och en promotor som ej är känliga för repressorn.

50. Förfarande enligt patentkravet 48 eller 49,
10 k ä n n e t e c k n a t därav, att temperaturen som inaktiverar repressorn är från 38 till 44°C.

51. Förfarande enligt patentkravet 48, 49 eller 50, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-kloningsvektorn är en plasmid.

15 52. Förfarande enligt något av patentkraven 48-51, k ä n n e t e c k n a t därav, att repressorgen är en kromosomal DNA-replikationsmutationsrepressor, cellväggsyntesmutationsrepressor, ribosommutationsrepressor, RNA-polymerasmutationsrepressor, RNA-polymerasmutationsrepressor, tRNA-mutationsrepressor, aminoacyl-tRNA-syntetasmutationsrepressor, celldelning-mutationsrepressor eller en non-sensmutationsrepressor.
20

53. Förfarande enligt patentkravet 52, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att repressorgen är en cI-repressorgen av bakteriofag lambda.
25

54. Förfarande enligt patentkravet 52 eller 53, k ä n n e t e c k n a t därav, att cI-repressorgen är cI857.

55. Förfarande enligt något av patentkraven 48-51, k ä n n e t e c k n a t därav, att den lysogeniska organismen innehåller en bakteriofag cI-gen som ej producerar en funktionell cI-repressor.
30

56. Förfarande enligt patentkravet 55, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att den lysogeniska organismen är bakteriofag lambda cI90.

35 57. Förfarande enligt patentkravet 52, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar alger, varvid de nämnda cellerna är mottagliga för odling.

58. Förfarande enligt något av patentkraven 48-56, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar prokaryoter.

59. Förfarande enligt patentkravet 58, k ä n n e -
5 t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar bakterier.

60. Förfarande enligt patentkravet 58 eller 59, k ä n n e t e c k n a t därav, att bakterierna är E.coli, K12 C600R_k-M_k-, Bacillus, Bacillus subtilis, Staphylococcus, Streptococcus, Actinomycetes, Streptomyces, Serratia, Pseu-
10 domonas eller Agrobacterium.

61. Förfarande enligt något av patentkraven 48-56, k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar fritt levande eukaryoter, varvid de nämnda eukaryoterna är mottagliga för odling.

62. Förfarande enligt patentkravet 61, k ä n n e -
15 t e c k n a t därav, att värdcellerna omfattar svampar.

63. Förfarande enligt patentkravet 61 eller 62, k ä n n e t e c k n a t därav, att svamparna valts bland Neurospora, Cephalosporium, Aspergillus, Penicillium och
20 jäst.

64. Förfarande enligt patentkravet 61, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att värdcellerna deriverats från vävnader av en multicellulär organism, varvid de nämnda cellerna är mottagliga för odling.

65. Förfarande enligt något av patentkraven 48-56, k ä n n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-klonings-
25 vektorn är plasmid pAR2, pPR1 eller pPR3.

66. Förfarande enligt patentkravet 58, 59 eller 60, k ä n n e t e c k n a t därav, att de transformerade värd-
cellerna är E.coli K12 RV308 som innehåller plasmid pAR2,
30 pPR1 eller pPR3.

67. Förfarande enligt patentkravet 58, 59 eller 60, k ä n n e t e c k n a t därav, att de transformerade värd-
cellerna är E.coli K12 C600 som innehåller plasmid pAR2,
pPR1 eller pPR3.

68. Förfarande enligt patentkravet 58, 59 eller 60, k ä n n e t e c k n a t därav, att de transformerade värd-cellerna är E.coli K12 C600R_k-M_k- som innehåller plasmid pAR2, pPR1 eller pPR3.

5 69. Förfarande enligt patentkravet 66, 67 eller 68, k ä n n e t e c k n a t därav, att de transformerade värd-cellerna lysogeniseras med bakteriofag λ c.

70. Förfarandende enligt patentkravet 48, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att rekombinant-DNA-kloningsvek-
10 torn är ett bkateriofag.

FIG. 1

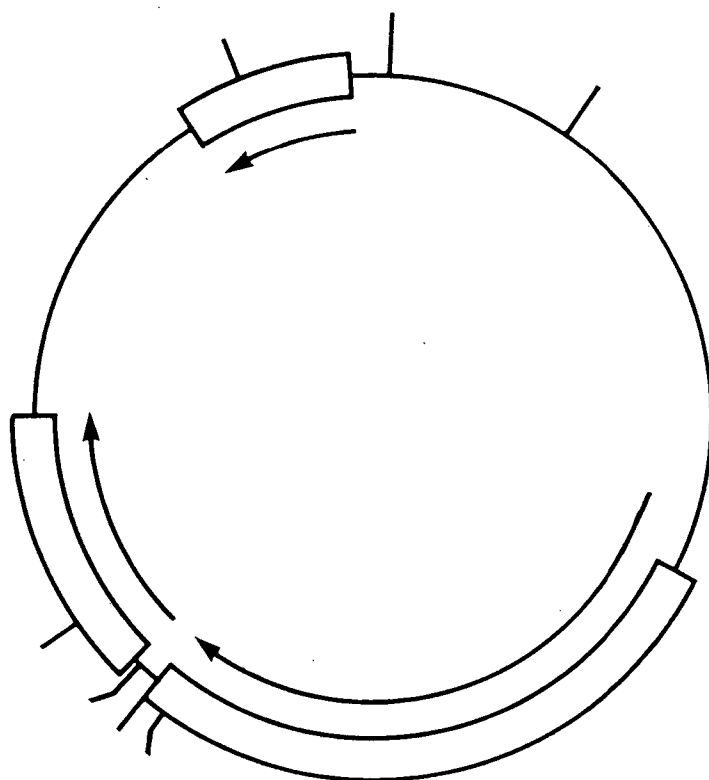


FIG. 2

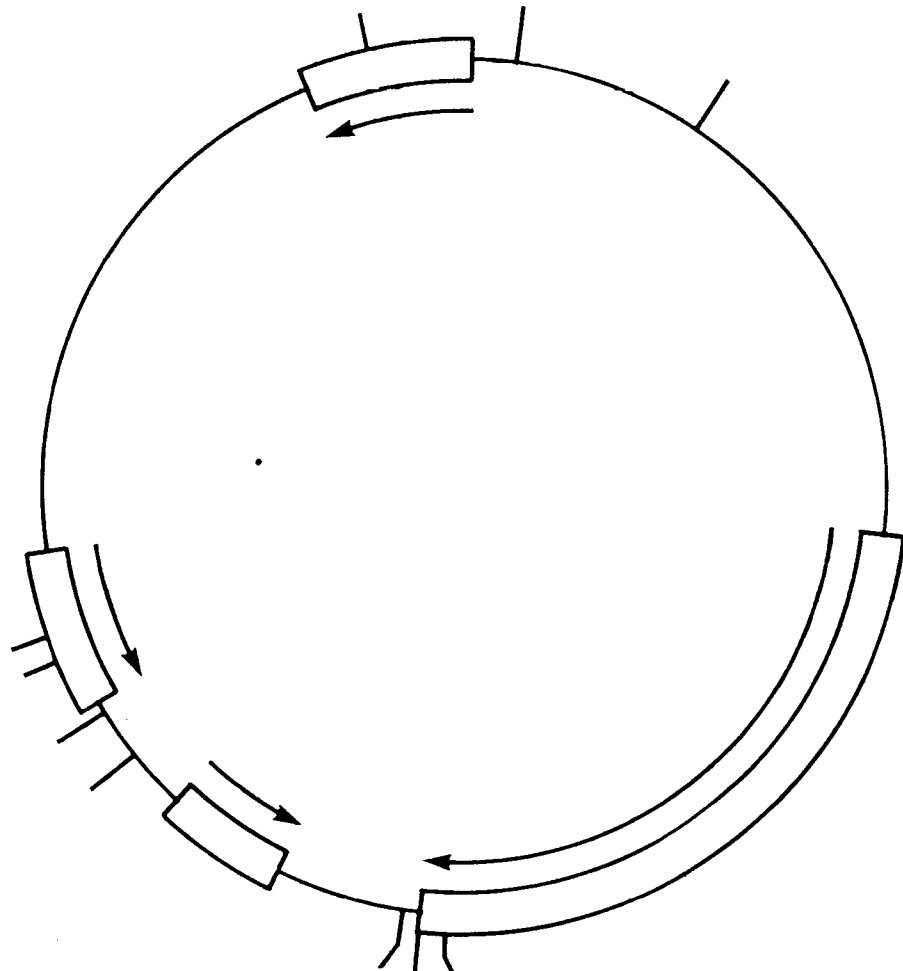


FIG. 3

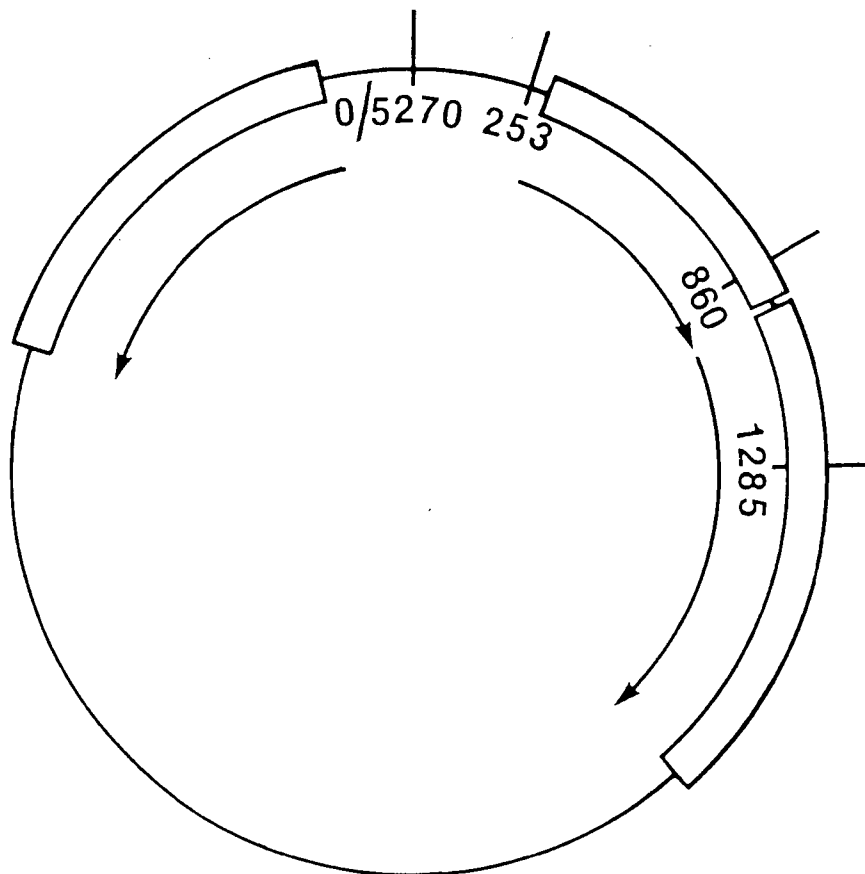


FIG. 4

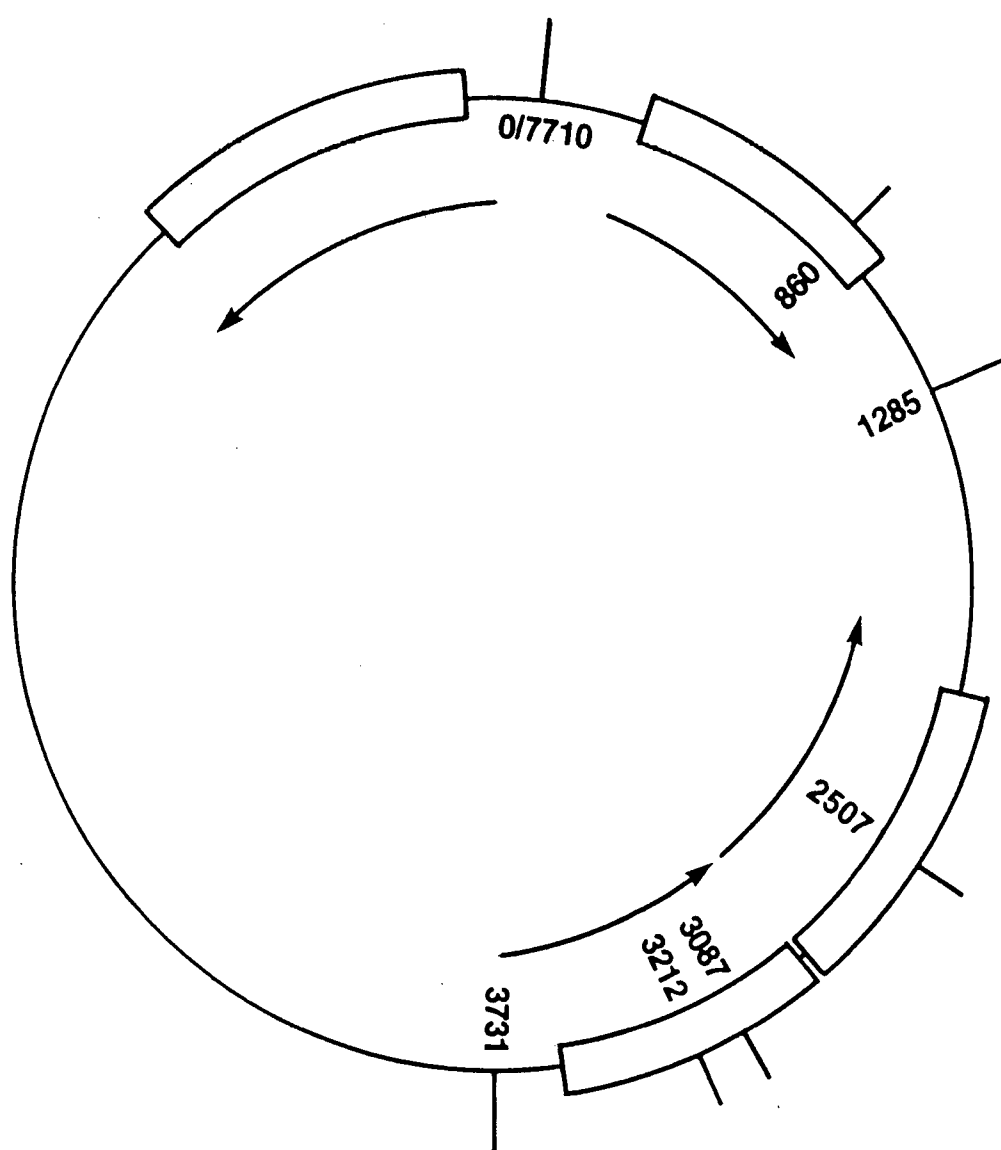


FIG. 5

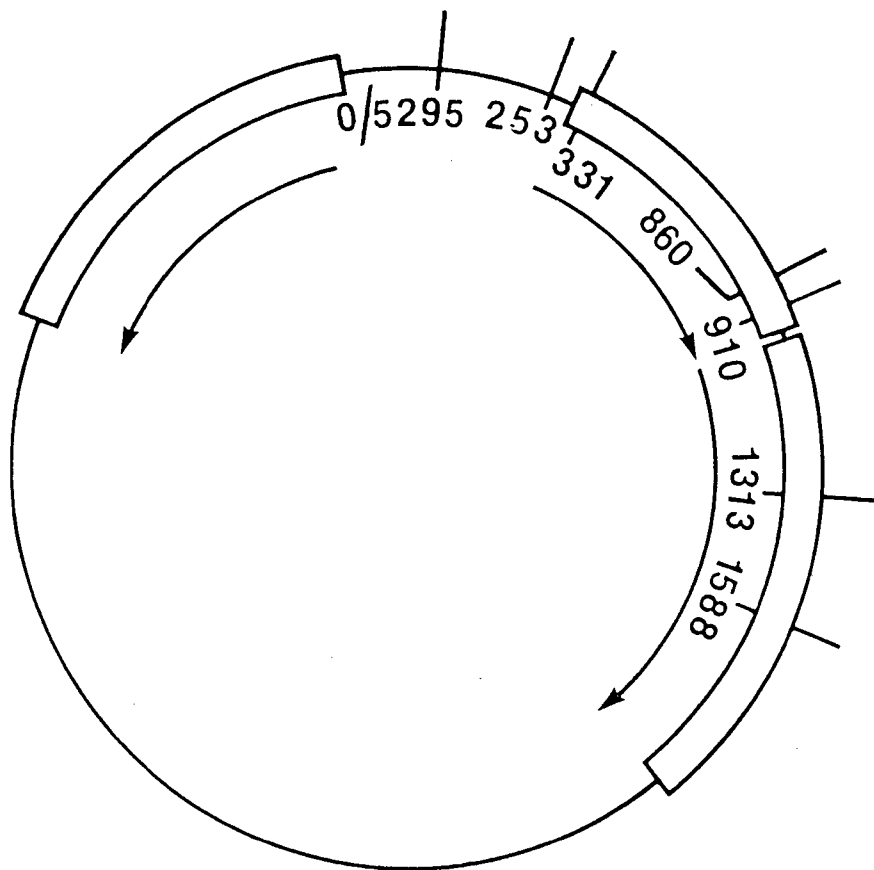


FIG. 6

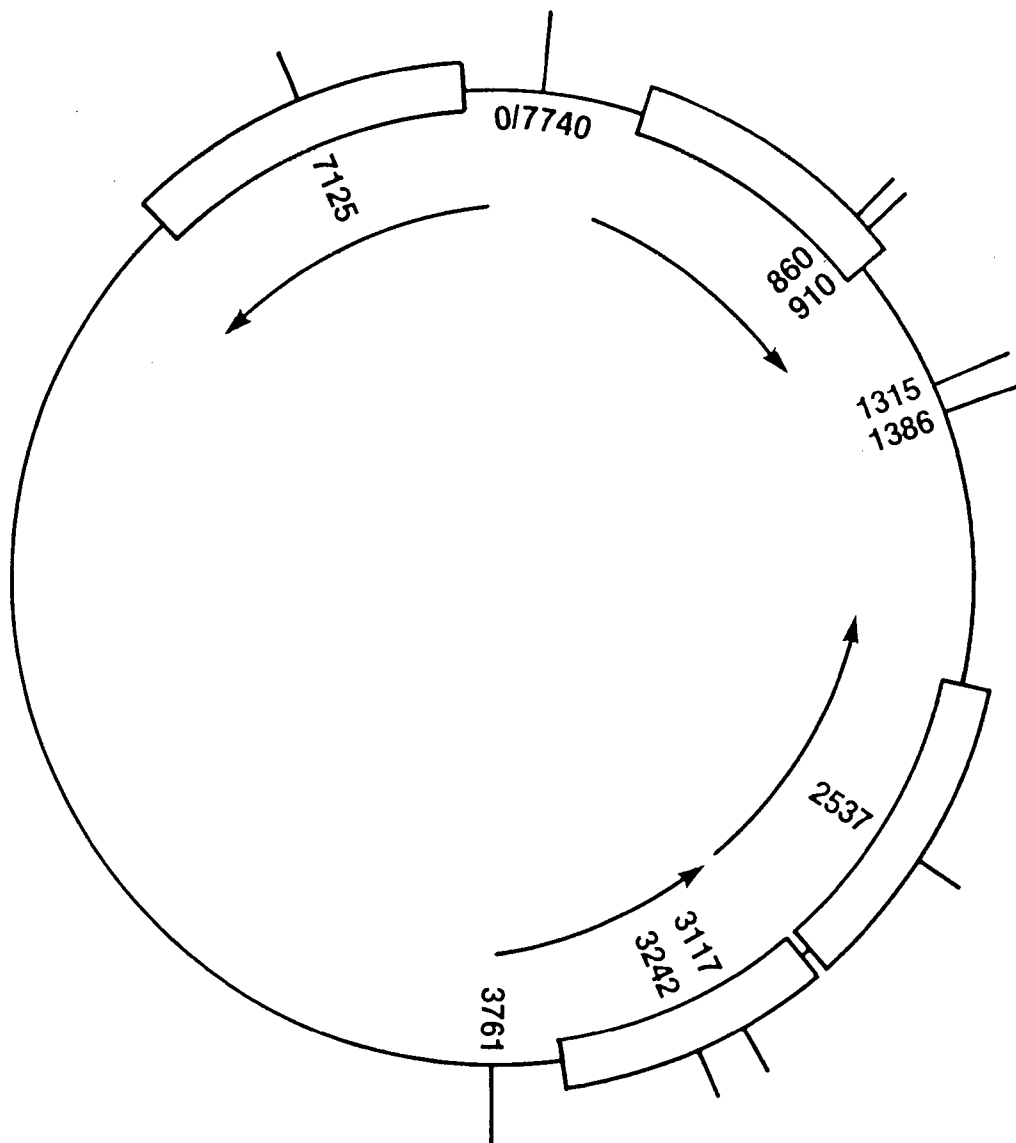


FIG. 7

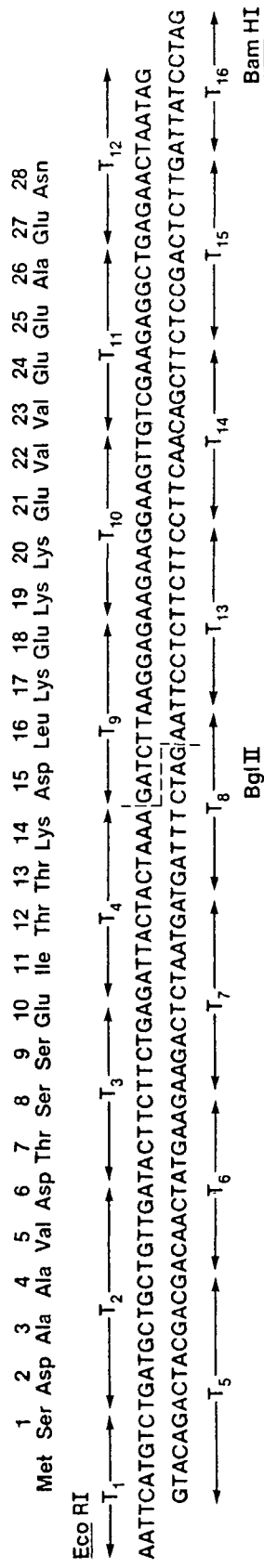


FIG. 8

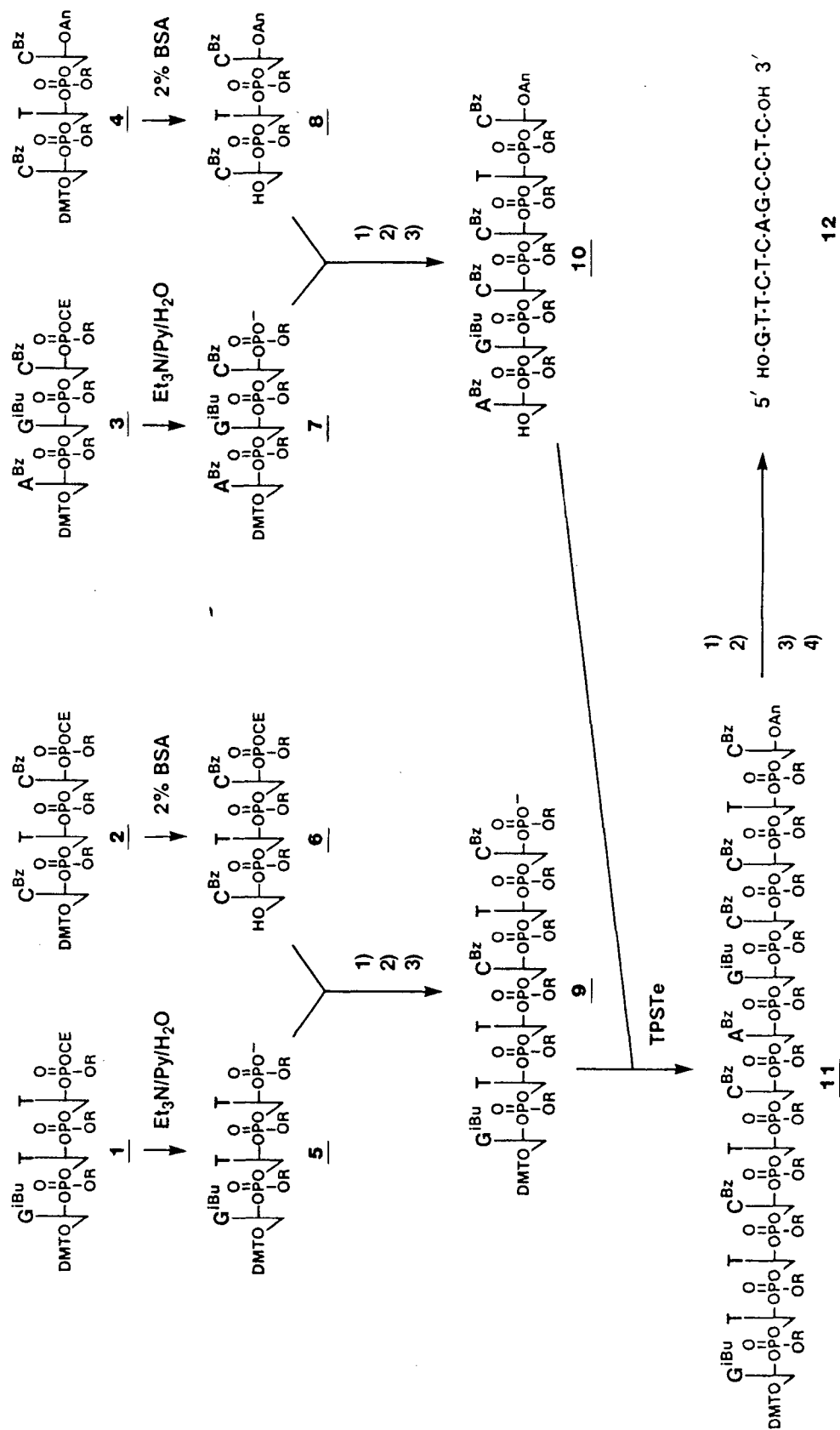
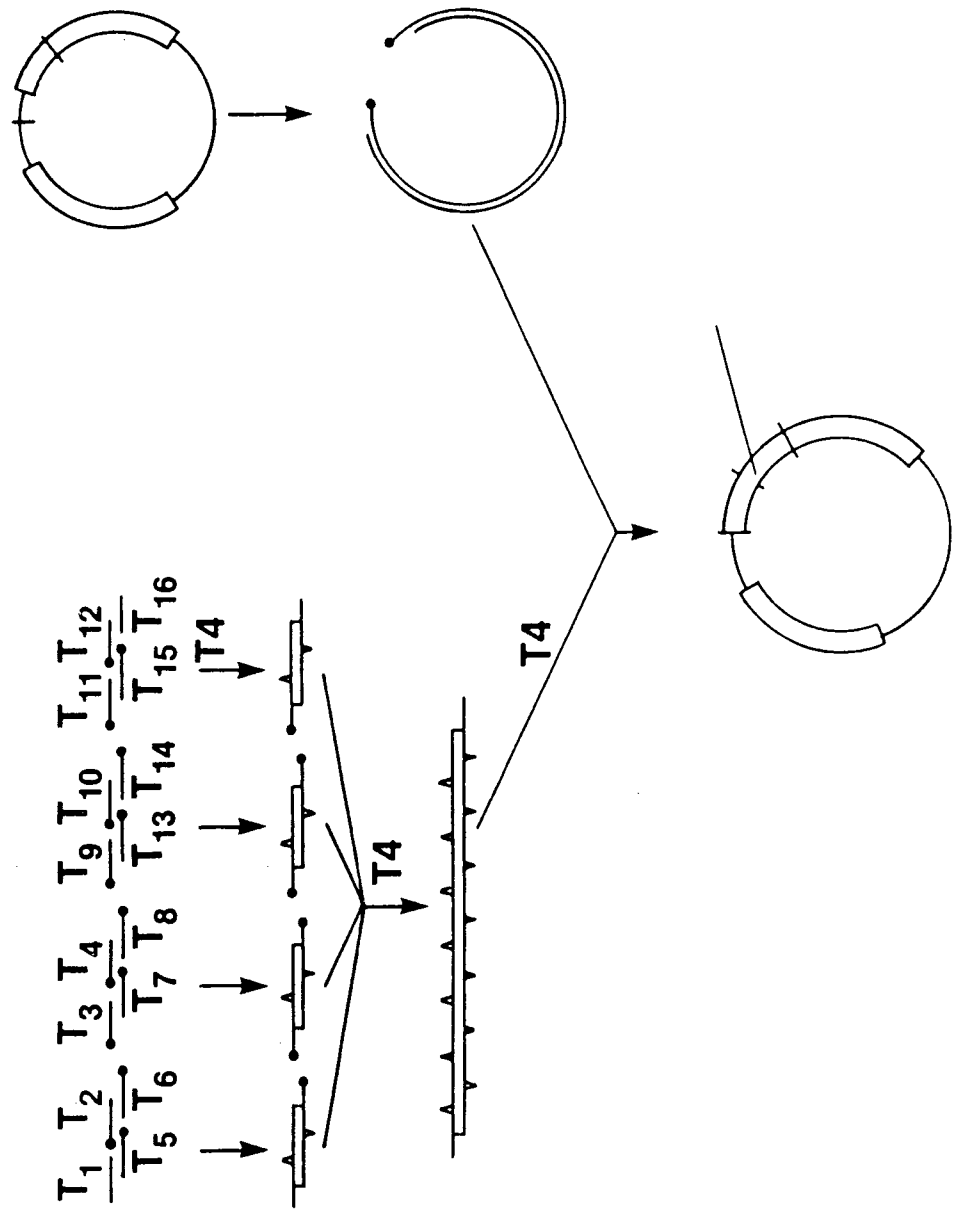


FIG. 9



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

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

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

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

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 73, No. 11, p. 4174-78
Methods in Enzymology vol. 68, 1979, p. 482-52
Chem. Abstr. vol. 90 (1979) 68978 v
- " - - - - 117742 t
- " - - - - vol. 95 (1981) 21092 L

18/3-87 Ferz Kinnin

Allekirjoitus