



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 282 473 A5

5(51) C 12 N 15/14

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 319 742 1	(22)	13.09.88	(44)	12.09.90
(31)	8703539-0	(32)	14.09.87	(33)	SE
(71)	siehe (73)				
(72)	Aberg, Bertil, SE; Simoncsits, András, HU; Kálmán, Miklós, HU; Cserpán, Imre, HU; Bajszár, György, HU				
(73)	Scandigen AB, Stockholm, SE; MTA Szegedi Biológiai Központja, Szeged, HU; Biotechnika Rt. Budapest, HU				
(54)	Verfahren zur Herstellung eines Strukturgens mit der Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin				

(55) Gen strukturell – Herstellung, Kodierung Serumalbumin authentisch-menschlich; Serumalbumin-Herstellung, menschlich authentisch; Arzneimittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines strukturellen Gens mit der Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin – wahlweise ergänzt durch eine flußaufwärts befindliche Triplette mit einer Kodierung für Methionin und wahlweise erweitert durch eine synthetische prepro*-Führungskodierungssequenz-, worin die Kodone der Nukleotidfolge selektiert wurden unter Berücksichtigung eines nichtmenschlichen Wirts, z. B. Hefe, der für die Expression von authentischen menschlichen Serumalbumin ausgewählt wurde. Offengelegt wird auch ein rekombinantes DNA-Molekül, das besteht aus diesem strukturellen Gen, eingefügt in einen Vektor, und aus einem Wirt, der mit diesem rekombinanten Molekül von DNA transformiert wurde. Außerdem wird ein Verfahren zur Herstellung von authentischem menschlichen Serumalbumin, das in pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet wird, offengelegt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines strukturellen Gens mit der Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin, **gekennzeichnet durch** die folgenden Schritte:
 - a) Aufbau einer Nukleotidfolge mit einer Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin durch Selektierung von Kodonen unter Berücksichtigung eines nichtmenschlichen Wirts, der für die Expression des authentischen menschlichen Serumalbumins gewählt wurde, wobei der Kodone so vorgenommen wird, daß im ersten Fall die am häufigsten durch den gewählten nichtmenschlichen Wirt verwendeten Kodone selektiert wurden und im zweiten Fall die von dem gewählten nichtmenschlichen Wirt an zweiter oder dritter Stelle verwendeten Kodone selektiert werden, um das Auftreten solcher Restriktionsstellen zu vermeiden, die während des Zusammenbaus des Gens zu nutzen sind, um eine eindeutige Schneidestelle für ein spezifisches Enzym zu schaffen und um innerhalb von Oligonukleotiduntereinheiten von Fragmenten, die zu klonieren sind, Palindrome mit einer Länge von 8 Basenpaaren oder mehr auszuschalten,
 - b) Teilen der konstruierten Nukleotidfolge in ein 5'-Fragment, das chemisch zu synthetisieren ist, und einige zu klonierende Fragmente, so daß die Verbindungspunkte zwischen diesen einigen Fragmenten sich an G-C-Dinukleotidfolgen von geeigneter Position befinden,
 - c) Modifizieren der konstruierten einigen Fragmente von
 - b) durch Ergänzung von deren konstruierten Nukleotidfolgen mit einer zusätzlichen Nukleotidfolge GGTAC am 5'-Terminus, ausgenommen das Fragment, das mit dem 5'-Fragment von b) zu verbinden ist, und weiteres Teilen dieser einigen Fragmente in Untereinheiten mit einem 3'-Nukleotid G, wobei diese Untereinheiten wiederum einzeln ergänzt werden durch eine zusätzliche Nukleotidfolge GGCC,
 - d) einzelnes chemisches Synthetisieren der modifizierten, ergänzten Untereinheiten von c) in einzelsträngiger Form auf die bekannte Weise und chemisches Synthetisieren des 5'-Fragmentes von b) in doppelsträngiger Form auf die bekannte Weise,
 - e) konsekutives Klonieren der synthetisierten Untereinheiten von d), beginnend beim 5'-Terminus der modifizierten einigen ergänzten Fragmente von c), in einige einzelne Rekombinantvektoren auf die bekannte Weise mit Hilfe von Adaptern und der enzymatischen Auffüllreaktion zur Bildung von klonierten, doppelsträngigen Fragmenten des Gens, die den modifizierten, ergänzten einigen Fragmenten von c) entsprechen,
 - f) Zusammenbau der klonierten, doppelsträngigen Fragmente von e), durch Schneiden der einigen Rekombinantvektoren von e), paarweise, mit dem Enzym Kpn I bzw. dem Enzym Apa I – einem an der geschaffenen 5'-Terminal-Kpn I-Restriktionsstelle und dem anderen an der geschaffenen 3'-Terminal-Apa I-Restriktionsstelle – um kohäsive Enden zu bilden, die durch ein einzelsträngiges spezifisches Enzym auf die bekannte Weise zu glatten Enden gemacht werden – Lassen eines Endnukleotids C bzw. eines Endnukleotids G –, gefolgt vom Schneiden mit einem anderen Restriktionsenzym mit einer Schneidestelle, die in beiden Rekombinantvektoren des in Frage kommenden Paares einzigartig ist, um einerseits einen linearen Vektor zu schaffen, der ein kloniertes Fragment des Gens enthält, und andererseits ein abgeschnittenes Fragment des Gens, wobei diese beiden Fragmente auf die bekannte Weise enzymatisch an den glatten Enden verbunden werden – wobei am Verbindungspunkt ein Dinukleotid G-C gebildet wird, das in die Nukleotidfolge des Gens einbezogen wird –, um einen Rekombinantvektor zu erhalten, der schließlich alle die einigen konstruierten Fragmente von b) in doppelsträngiger Form einschließt, und
 - g) Ergänzen des in f) erhaltenen Rekombinantvektors mit dem chemisch synthetisierten 5'-Fragment von d) zur Bildung des vollständigen strukturellen Gens mit der Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin.
2. Verfahren zur Herstellung eines strukturellen Gens nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - bei a) der gewählte nichtmenschliche Wirt Hefe ist,
 - bei b) der konstruierte Nukleotidfolge lautet

GAC	GCT	CAC	AAG	TCT	GAA	GTC	GCT	CAC	AGA	TTC	AAG	GAT
CTA	GGT	GAA	GAA	AAC	TTC	AAG	GCT	TTG	GTT	TTG	ATT	GCT
TTC	GCT	CAA	TCA	TTG	CAA	CAA	TGT	CCA	TTC	GAA	GAC	CAC
GTC	AAG	TTG	GTC	AAC	GAA	GTT	ACT	GAA	TTT	GCT	AAG	ACC
TGT	GTT	GCT	GAC	GAA	TCT	GCT	GAA	AAC	TGT	GAC	AAG	TCC

TTG	CAC	ACT	TTG	TTC	GGT	GAC	AAG	TTG	TGT	ACT	GTT	GCT
ACT	TTG	AGA	GAA	ACT	TAC	GGT	GAA	ATG	GCT	GAC	TGT	TGT
GCT	AAA	CAG	GAA	CCA	GAA	AGA	AAC	GAA	TGT	TTC	TTA	CAA
CAC	AAG	GAC	GAC	AAC	CCA	AAC	TTG	CCA	AGA	TTG	GTT	AGA
CCA	GAA	GTC	GAC	GTT	ATG	TGT	ACT	GCT	TTC	CAC	GAC	AAC
GAA	GAG	ACT	TTC	TTG	AAG	AAG	TAC	TTG	TAC	GAA	ATC	GCC
AGA	AGA	CAC	CCA	TAC	TTC	TAC	GCT	CCA	GAA	TTG	TTG	TTC
TTC	GCT	AAG	AGA	TAC	AAG	GCT	GCT	TTC	ACT	GAA	TGT	TGT
CAA	GCT	GCC	GAC	AAG	GCT	GCT	TGT	TTG	TTG	CCA	AAG	TTG
GAC	GAA	TTG	AGA	GAC	GAA	GGT	AAG	GCT	TCT	TCC	GCT	AAG
CAA	AGA	TTG	AAG	TCT	GCT	TCC	TTG	CAA	AAG	TTC	GGT	GAA
AGA	GCC	TTC	AAG	GCC	TGG	GCT	GTT	GCT	AGA	TTG	TCT	CAA
AGA	TTC	CCA	AAG	GCT	GAA	TTT	GCT	GAA	GTT	TCT	AAG	TTG
GTT	ACT	GAC	TTG	ACT	AAG	GTT	CAC	ACT	GAA	TGT	TGT	CAC
TCT	CAC	TGT	ATC	GCT	GAA	GTT	GAA	AAC	GAC	GAA	ATG	CCA
GCT	GAC	TTG	CCA	TCT	TTG	GCT	GCT	GAC	TTC	GTT	GAA	TCT
AAG	GAC	GTT	TGT	AAG	AAC	TAC	GCT	GAA	GCT	AAG	GAC	GTT
TTC	TTG	GGT	ATG	TTC	TTG	TAC	GAA	TAC	GCT	AGA	AGA	CAC
CCA	GAC	TAC	TCC	GTT	GTT	TTG	TTG	TTG	AGA	TTG	GCT	AAG
ACT	TAC	GAA	ACT	ACT	TTG	GAA	AAG	TGT	TGT	GCT	GCT	GCT
GAC	CCA	CAC	GAA	TGT	TAC	GCT	AAG	GTT	TTC	GAC	GAA	TTT
AAG	CCA	TTG	GTT	GAA	GAA	CCA	CAA	AAC	TTG	ATT	AAG	CAA
AAC	TGT	GAA	TTG	TTC	AAG	CAA	TTG	GGT	GAA	TAC	AAG	TTC
CAA	AAC	GCT	TTG	TTG	GTT	AGA	TAC	ACT	AAG	AAG	GTT	CCA
CAA	GTC	TCC	ACT	CCA	ACT	TTG	GTT	GAA	GTC	TCT	AGA	AAC
TTG	GGT	AAG	GTT	GGT	TCT	AAG	TGT	TGT	AAG	CAC	CCA	GAA
GCT	AAG	AGA	ATG	CCA	TGT	GCT	GAA	GAC	TAC	TTG	TCT	GTT
GTT	TTG	AAC	CAA	TTA	TGT	GTT	TTG	CAC	GAA	AAG	ACT	CCA
GTT	TCT	GAC	AGA	GTT	ACT	AAG	TGT	TGT	ACT	GAA	TCT	TTG
GTT	AAC	AGA	AGA	CCA	TGT	TTC	TCT	GCC	TTG	GAA	GTT	GAC
GAA	ACT	TAC	GTC	CCA	AAG	GAA	TTT	AAC	GCT	GAA	ACT	TTC
ACT	TTC	CAC	GCC	GAC	ATC	TGT	ACC	TTG	TCC	GAA	AAG	GAA
AGA	CAA	ATC	AAG	AAG	CAA	ACT	GCT	TTG	GTT	GAA	TTG	GTT
AAG	CAC	AAG	CCA	AAG	GCT	ACT	AAG	GAA	CAA	TTG	AAG	GCT
GTT	ATG	GAC	GAC	TTC	GCT	GCT	TTC	GTT	GAA	AAG	TGT	TGT
AAG	GCT	GAC	GAC	AAG	GAA	ACT	TGT	TTG	GCT	GAA	GAA	GGT
AAG	AAG	TTG	GTT	GCT	GCT	TCT	CAA	GCT	GCT	TTG	GGT	TTG
TAA	TAG											

in welcher die Pfeile die Teilungspunkte zwischen dem ersten 5'-Fragment, das chemisch zu synthetisieren ist, und 4 zu klonierenden Fragmenten,

in c) die ergänzten, einzelsträngigen Untereinheiten der modifizierten Fragmente von b) lauten

TAGGTGAAGAAACTTCAAGGCTTTGGTTTTGATTGCTTCGCTCAATACTTGCAACAATGTCCAT-TCGAAGGGCC

ACCACGTCAAGTTGGTCAACGAAGTTACTGAATTTGCTAAGACCTGTGTTGCTGACGAATCTGCT-GAAAACTGGGGCC

TGACAAGTCCTTGACACTTTGTTCGGTGACAAGTTGTGTACTGTTGCTACTTTGAGAGAAACTTA-CGGTGGGGCC

AAATGGCTGACTGTTGTGCTAAACAGGAACCAGAAAGAAACGAATGTTTCTTACAACACAAGGA-CGGGGCC

ACAACCCAAACTTGCCAAGATTGGTTAGACCAGAAGTCGACGTTATGTGTACTGCTTTCCACGA-CAACGAAGGGCC

AGACTTTCTTGAAGAAGTACTTGTACGAAATCGCCAGAAGACACCCATACTTCTACGCTCCAGA-ATTGTTGTTCTTCGGGGCC

GGTACCTAAGAGATACAAGGCTGCTTCACTGAATGTTGTCAAGCTGCCGACAAGGCTGCTTGTT
GTTGGGCC

CCAAAGTTGGACGAATTGAGAGACGAAGGTAAGGCTTCTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGTGC
TTCCTTGGGCC

CAAAAGTTCGGTGAAAGAGCCTTCAAGGCCTGGGCTGTTGCTAGATTGTCTCAAAGATTCCCAAAG
GCTGGGCC

AATTTGCTGAAGTTTCTAAGTTGGTACTGACTTGACTAAGGTTCACTGAATGTTGTCACGGTGA
CTTGGGCC

TTGGAATGTGCTGACGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTATATCTGTGAAAACCAAGACTCTATCTCT
TCTAAGGGCC

TTGAAGGAATGTTCTGAAAAGCCATTGTTGGAAAAGTCTCACTGTATCGCTGAAGTTGAAAACGAC
GAAATGGGCC

GGTACCCAGCTGACTTGCCATCTTTGGCTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGACGTTTGTAAGAACT
ACGCTGAAGGGCC

CTAAGGACGTTTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGECTAGAAGACACCCAGACTACTCCGT
GTTTTGTTGTTGGGCC

AGATTGGCTAAGACTTACGAACTACTTTGGAAAAGTGTGTGCTGCTGCTGACCCACACGAATGT
TACGCTAAGGGCC

GTTTTCGACGAATTTAAGCCATTGGTTGAAGAACCACAAAACCTTGATTAAGCAAACTGTGAATTG
TTCAAGGGCC

CAATTGGGTGAATACAAGTTCCAAAACGCTTTGTTGGTTAGATACACTAAGAAGGTTCCACAAGTC
TCCACTCCAACCTTTGGGCC

GTTGAAGTCTCTAGAACTTGGGTAAGGTTGGTTCTAAGTGTGTAAGCACCCAGAAGCTAAGAG
AATGGGCC

GGTACCCATGTGCTGAAGACTACTTGTCTGTTGTTTTGAACCAATTATGTGTTTTGCACGAAAAGG
GCC

ACTCCAGTTTCTGACAGAGTTACTAAGTGTGTACTGAATCTTTGGTTAACAGAAGACCATGTTTC
TCTGGGCC

CCTTGGAAGTTGACGAACTTACGTCCCAAAGGAATTTAAGCTGAACTTTCACTTTCCACGCCG
ACATCTGGGCC

TACCTTGTCCGAAAAGGAAAGACAAATCAAGAAGCAAACCTGCTTTGGTTGAATTGGTTAAGCACA
AGCCAAAGGGCC

GCTACTAAGGAACAATTGAAGGCTGTTATGGACCACTTCGCTGCTTTCGTTGAAAAGTGTGTAA
GGCTGACGGGCC

ACAAGGAACTTGTTCGCTGAAGAAGGTAAGAAGTGGTTGCTGCTTCTCAAGCTGCTTTGGGT
TGTAATAGGGCC

in c) die synthetisierten Untereinheiten von d) konsekutiv in vier einzelne E-coli-Vektoren kloniert werden mit Hilfe der Adapter

Apa I	Eco R I
CGGACGGCGACGCCGACGGCCACCG	
CCCGGGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGCTTAA	
Apa I	Eco R I
CGAGTATGCGACAGCTGG	
CCCGGGCTCATACGCTGTCGACCTTAA	

in f) das einzelsträngige spezifische Enzym Klenow-Polymerase ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein strukturelles Gen hergestellt wird, welches eine flußaufwärts angeordnete Nukleotidfolge mit einer Kodierung für Methionin aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein strukturelles Gen hergestellt wird, welches durch eine flußaufwärts angeordnete Nukleotidfolge erweitert wird, in welcher die

Kodone unter Berücksichtigung eines nichtmenschlichen Wirtes selektiert wurden und welches für die Aminosäurefolge kodiert

Met – Lys – Trp – Val – Thr – Phe – Ile – Ser – Leu – Leu – Phe – Leu – Phe – Ser – Ser – Ala – Tyr – Ser – Arg – Gly – Val – Phe – Lys – Arg.

5. Verfahren nach Anspruch 4, gekennzeichnet dadurch, daß die Nukleotidfolge, welche die Aminosäurefolge kodiert, folgende ist

ATG	AAC	TGG	CTT	ACT	TTC	ATC	TCT	TTG	TTG	TTC	TTG	TTC
TCT	TCT	GCT	TAC	TCT	ACA	GGT	GGT	TTC	AAG	AGG		

Hierzu 12 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines strukturellen Gens mit der Kodierung für authentisches menschliches Serumalbumin – wahlweise ergänzt durch eine oberhalb befindliche Triplettkodierung für Methionin und wahlweise erweitert durch synthetische Prepro*-Leader-Kodierungsfolge – auf ein Rekombinant – DNA-Molekül, welches dieses Gen in einen Vektor eingefügt enthält und einen mit diesem DNA-Molekül transformierten Wirt. Authentisches menschliches Serumalbumin wird in Arzneimitteln verwendet.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Serumalbumin ist die Proteinhauptkomponente des Serums bei höheren Lebewesen. Es spielt bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts eine Rolle und ist beteiligt an der Bindung und dem Transport von schwer löslichen Stoffwechselprodukten aus einem Gewebe in ein anderes, besonders am Transport von freien Fettsäuren. Menschliches Serumalbumin wird in der Therapie für die Behandlung von Hypovolämie, Schock und Hypoalbuminämie eingesetzt. Verwendet wird es auch als Zusatz in der Perfusionsflüssigkeit für die extrakorporeale Zirkulation. Außerdem wird menschliches Serumalbumin häufig als experimentelles Gen verwendet.

Menschliches Serumalbumin setzt sich zusammen aus einer einzigen langen Polypeptidkette, die annähernd 600 Aminosäurereste aufweist. Die Aminosäurefolge ist veröffentlicht. (Siehe z. B. Lawn, R. M. u. a., Nucleic Acids Research, Bd. 9, Nr. 22 [1981], S. 6103–6113.) Kommerzielles menschliches Serumalbumin wird aus menschlichem Plasma hergestellt. Die Verfügbarkeit menschlichen Plasmas ist begrenzt.

Es muß eine sorgfältige Wärmebehandlung des aus menschlichem Plasma hergestellten Produktes durchgeführt werden, um eine potentielle Kontamination des Produktes durch den Virus Hepatitis B und den HIV-Virus zu vermeiden.

Da es eine der Besonderheiten des HIV-Virus ist, seine antigene Struktur häufig zu ändern, gibt es keine Garantien, daß er nicht wärmeresistente Varianten entwickeln wird.

Die Notwendigkeit eines künstlichen, authentischen menschlichen Serumalbumins, das in unbegrenzten Mengen hergestellt werden kann, ist offensichtlich.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, unter Anwendung von Rekombinat-DNA-Methoden Produkte herzustellen, welche dem reifen, menschlichen Serumalbumin entsprechend, und u. a. in den folgenden Patentanmeldungen veröffentlicht. EP-A-O 073646 (Genentech Inc), EP-A-O 079739 (The Upjohn Co.), EP-A-O 091527 (President and Fellows of Harvard College) und EP-A-O 198745 (Genetica).

Alle oben genannten Patentanmeldungen sind von der Isolierung der mRNA aus der menschlichen Leber ausgegangen, und diese mRNA wurde zur Herstellung doppelsträngiger cDNA (oder deren Fragmente) genutzt. Anschließend wird die Kodonnutzung in den cDNA ihrer Natur nach für die menschliche Expression optimiert.

Es wird in Fachkreisen allgemein davon ausgegangen, daß die menschliche Kodonnutzung für die nicht-menschliche Expression nicht ideal ist.

Vor der vorliegenden Erfindung wurden keine so langen DNA-Folgen erzeugt, wie sie für authentisches menschliches Serumalbumin (strukturelles Gen = 1761 bp) erforderlich sind, in denen die Kodone für nicht-menschliche Expression optimiert sind.

In EP-A-O 182383 (Vepex Contractor Ltd. und MTA Szegedi Biológiai Központja) wird ein Verfahren für die Produktion von Oligo- und Polydeoxyribonukleotiden durch Synthetisierung des komplementären Strangs eines einsträngigen DNA-Stückes auf enzymatische Weise offengelegt. Diese Methode wurde teilweise im Verfahren für die Herstellung einer strukturellen Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin (HSA) nach der vorliegenden Erfindung angewendet, sie wurde aber kombiniert mit einer neuen Technik zur Verbindung einiger großer Fragmente des Gens.

Ziel der Erfindung

Durch die vorliegende Erfindung wird ein neues Verfahren zur Herstellung eines künstlichen strukturellen Gens mit der Kodierung für authentisch-menschliches Serumalbumin bereitgestellt, das die im Stand der Technik erwähnten Nachteile herkömmlicher Verfahren nicht aufweist.

Außerdem wird ein Verfahren zur Herstellung von authentischem menschlichem Serumalbumin zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, authentisches menschliches Serumalbumin mit Hilfe eines künstlichen strukturellen Gens herzustellen, das eine Nukleotidfolge hat, in welcher die Kodone für nichtmenschliche Expression optimiert sind.

Dazu war es zuerst notwendig, ein künstliches strukturelles Gen zu entwickeln und ein Verfahren zur Herstellung dieses Gens zu erfinden.

Um das künstliche strukturelle Gen zu entwickeln, entschied man sich dafür, Kodone zu wählen, die besonders geeignet sind für die Hefeexpression als einem brauchbaren Beispiel der nicht-menschlichen Expression.

Die Kodone wurden aus Hefekodonen für stark exprimierte Hefeproteine ausgewählt (Bonnetzen, J. L. und Hall, B. D. [1982], J. Biol. Chem. 257, 3026–3031, und Sharp, P. M., Tsuchy, T. M. F. und Mosurski, K. R. [1986], Nucleic Acids Res. 14, 5125–5143).

Zunächst wurden die Kodone ausgewählt, die am häufigsten durch Hefe genutzt werden, dort aber, wo es angezeigt war, wurde das zweite oder dritte Kodon verwendet.

Für die Wahl des zweiten oder dritten Kodons gab es folgende Gründe: a) das Erscheinen solcher Restriktionsstellen zu vermeiden, die während der Montage des Gens genutzt werden, b) eine eindeutige Teilungsstelle für ein spezifisches Enzym zu schaffen und c) innerhalb der Teile des Gens, die chemisch synthetisiert und geklont werden müssen, Palindrome mit einer Länge von 8 Basenpaaren oder mehr auszuschalten; mögliche Innenschleifen oder sekundäre Strukturbildungen innerhalb der einzelnen synthetischen Oligonukleotide zu vermeiden.

Nach einem Gesichtspunkt der Erfindung wird eine Strukturelle Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin geschaffen. Dieses Gen ist gekennzeichnet durch die Nukleotidfolge, in welcher die Kodone unter Berücksichtigung eines nicht-menschlichen Wirts für die Expression des authentischen menschlichen Serumalbumins ausgewählt wurden, wodurch die Auswahl der Kodone so vorgenommen wurde, daß im ersten Fall die Kodone ausgewählt wurden, die am häufigsten vom gewählten nicht-menschlichen Wirt genutzt werden, und im zweiten Fall die Kodone ausgewählt werden, die vom nicht-menschlichen, gewählten Wirt an zweiter oder dritter Stelle genutzt werden, um das Auftreten solcher Restriktionsstellen zu vermeiden, die während der Montage des Gens genutzt werden,

um eine eindeutige Spaltungsstelle für ein spezifisches Gen zu schaffen und um Palindrome mit einer Länge von 8 Basenpaaren oder mehr in den Teilen des Gens auszuschalten, die chemisch synthetisiert und geklont werden müssen.

In einer Variante dieses Gesichtspunktes der Erfindung wird eine strukturelle Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin und ein zusätzliches Initialmethionin geschaffen. Bei dieser Variante des Gens beginnt die Nukleotidfolge mit einer Triplettkodierung für Methionin, und der Rest der Nukleotidfolge kodiert wie oben für menschliches Serumalbumin. Wenn dieses Gen exprimiert wird, wird entweder authentisches menschliches Serumalbumin oder dessen Methionylderivat, in Abhängigkeit vom verwendeten Expressionssystem, erzeugt.

Nach einer anderen Variante dieses Gesichtspunktes der Erfindung wird eine strukturelle Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin geschaffen, erweitert durch eine oberhalb angeordnete Nukleotidfolge, in welcher die Kodone unter Berücksichtigung eines nicht-menschlichen Wirtes gewählt wurden und welches für folgende Aminosäurefolge kodiert:

Met–Lys–Trp–Val–Thr–Phe–Ile–Ser–Leu–Leu–Phe–Leu–Phe–Ser–Ser–Ala–Tyr–Ser–Arg–Gly–Val–Phe–Lys–Arg

Ein „strukturelles Gen“ ist eine DNA-Folge, welche durch die Templat- oder Botschaft-RNA für ein spezielles Peptid oder Protein kodiert und (einen) Stoppkodon(e) einschließt.

Ein „funktionelles Gen“ schließt neben einem strukturellen Gen Flankierungsfolgen ein. Diese Flankierungsfolgen weisen regulatorische Bereiche, beispielsweise eine Promoter-Folge und eine Transkriptionsterminatorfolge, auf. Die Flankierungsfolgen sollten für die speziellen Vektoren und Wirte optimiert werden, die für die Expression (und die Erzeugung) des Peptids oder Proteins, das durch das strukturelle Gen kodiert wird, verwendet werden.

Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung hat die strukturelle Genkodierung für authentisches HSA eine Nukleotidfolge, in welcher die Kodone unter Berücksichtigung der Hefeexpression von authentischem HSA ausgewählt werden. Obwohl in der vorliegenden Patentbeschreibung nur Kodone veranschaulicht werden, welche unter Berücksichtigung der Hefeexpression von authentischem HSA ausgewählt werden. Obwohl in der vorliegenden Patentbeschreibung nur Kodone veranschaulicht werden, welche unter Berücksichtigung der Hefeexpression ausgewählt wurden, gestatten es die hier beschriebenen Erkenntnisse Fachleuten, eine strukturelle Genkodierung für authentisches HSA zu entwickeln und zu konstruieren, in welcher die Nukleotidfolge Kodone hat, die unter Berücksichtigung eines anderen nicht-menschlichen Wirts, beispielsweise eines bakteriellen Wirts oder eines Pflanzenwirts, ausgewählt worden sind.

In der vorliegenden Patentbeschreibung und in den Patentansprüchen wurde der Begriff „authentisches menschliches Serumalbumin“ verwendet, um ein künstlich hergestelltes Protein nicht-menschlichen Ursprungs mit einer Aminosäurefolge zu definieren, welche der Aminosäurefolge des natürlichen, reifen, menschlichen Serumalbumins entspricht.

Nach einem anderen Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Rekombinant-DNA-Molekül geschaffen, das ein strukturelles Gen nach der Erfindung, eingefügt in einen Vektor, aufweist.

Damit weist das Rekombinant-DNA-Molekül einem Vektor auf, in welchen ein funktionelles Gen (einschließlich eines strukturellen Gens nach der Erfindung) eingefügt wurde, worin die Flankierungsfolgen für den Vektor und den zu verwendenden Wirt abgestimmt sind.

Häufig verwendete Vektoren sind Plasmide von Bakterien, insbesondere E. coli, und Bakteriophagen, z. B. dem Lambda-Phag.

Spezielle Beispiele für diesen Aspekt der Erfindung werden in dem Teil der Patentbeschreibung offengelegt, welcher die bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung beschreibt.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Wirt geschaffen, der mit einem Rekombinant-DNA-Molekül nach der Erfindung transformiert ist.

Obwohl die Kodone der Nukleotidfolge im strukturellen Gen (bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung) unter Bezugnahme auf einen Hefewirt ausgewählt werden, sind Hefestämme nicht die einzigen Wirte, mit denen gearbeitet werden kann. Das für die Hefeexpression entwickelte strukturelle Gen kann auch für die bakterielle oder Pflanzenexpression geeignet sein. So kann der Wirt eine Hefezelle, z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, eine bakterielle Zelle, wie *E. coli* oder *Bacillus subtilis*, oder eine Zelle einer Pflanze, wie Bohnenpflanzen, Erbsenpflanzen oder Tabakpflanzen, sein.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird einem Verfahren zur Herstellung einer strukturellen Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin geschaffen. Dieses Verfahren besteht aus den folgenden Schritten;

- a) Entwicklung der Nukleotidfolgekodierung für authentisches menschliches Serumalbumin durch Auswahl von Kodonen unter Berücksichtigung eines nicht-menschlichen Wirts, der für die Expression von authentischem menschlichen Serumalbumin gewählt wurde, wodurch die Auswahl der Kodone so getroffen wird, daß im ersten Fall Kodone ausgewählt werden, die am häufigsten von dem gewählten nicht-menschlichen Wirt genutzt werden, und im zweiten Fall Kodone ausgewählt werden, die an zweiter oder dritter Stelle von dem gewählten nicht-menschlichen Wirt genutzt werden, um das Erscheinen solcher Restriktionsstellen zu vermeiden, die während der Montage des Gens genutzt werden, um eine eindeutige Teilungsstelle zwischen einem 5'-Fragment und dem Rest des gesamten Gens zu schaffen und um Palindrome mit einer Länge von 8 Basenpaaren oder mehr innerhalb von Oligonukleotiduntereinheiten von zu klonenden Fragmenten auszuschalten;
- b) Teilung der entwickelten Nukleotidfolge in ein 5'-Fragment, das chemisch zu synthetisieren ist, und einige zu klonende Fragmente, so daß sich die Verbindungspunkte zwischen diesen eigenen Fragmenten an geeignet lozierten G-C-Dinukleotidfolgen befinden;
- c) Modifikation der konstruierten einigen Fragmente von b) durch Ergänzung von deren konstruierten Nukleotidfolgen mit einer zusätzlichen Nukleotidfolge GGTAC am 5'-Terminus, ausgenommen das mit dem 5'-Fragment von b) zu vereinende Fragment, und weitere Teilung dieser einigen Fragmente in Untereinheiten mit einem 3'-Nukleotid G, wobei diese Untereinheiten wiederum einzeln mit einer zusätzlichen Nukleotidfolge GGCC ergänzt werden;
- d) einzelne chemische Synthetisierung der modifizierten, ergänzten Untereinheiten von c) in einsträngiger Form in der bekannten Weise und chemische Synthetisierung des 5'-Fragmentes von b) in doppelsträngiger Form in der bekannten Weise;
- e) anschließendes Klonen der synthetisierten Untereinheiten von d), beginnend beim 5'-Terminus der modifizierten, ergänzten einigen Fragmente von c), in einige einzelne Rekombinantvektoren auf die bekannte Weise, mit Hilfe von Adaptern und der enzymatischen Auffüllreaktion, um geklonte, doppelsträngige Fragmente des Gens zu bilden, die den modifizierten, ergänzten einigen Fragmenten von c) entsprechen;
- f) Montage der geklonten, doppelsträngigen Fragmente von e) durch Teilung der einigen Rekombinantvektoren von e), paarweise, mit dem Enzym KpnI bzw. dem Enzym ApaI – einem an der geschaffenen 5'-Terminal-KpnI-Restriktionsstelle und dem anderen an der geschaffenen 3'-Terminal-ApaI-Restriktionsstelle –, um haftende Enden zu schaffen, durch ein einzelsträngiges, spezifisches Enzym in der bekannten Weise stumpf gemacht werden – wobei ein Endnukleotid C bzw. ein Endnukleotid G bleiben –, gefolgt von der Spaltung mit einem anderen Restriktionsenzym mit einer Spaltungsstelle, die in beiden Rekombinantvektoren des in Frage kommenden Paares eindeutig ist, um zum einen einen linearen Vektor zu bilden, der ein geklontes Fragment des Gens enthält, und zum anderen ein abgespaltenes Fragment des Gens, wobei diese beiden Fragmente in der bekannten Weise enzymatisch mit den stumpfen Enden verbunden werden – wobei ein Dinukleotid G-C, das in die Nukleotidfolge des Gens eingezogen wird, an der Verbindungsstelle gebildet wird – um einen Rekombinantvektor zu erhalten, der schließlich alle der einigen konstruierten Fragmente von b) in doppelsträngiger Form einschließt, und
- g) Ergänzung des in f) geschaffenen Rekombinantvektors mit dem chemisch synthetisierten 5'-Fragment von d), um die vollständige strukturelle Genkodierung für authentisches, menschliches Serumalbumin zu bilden.

Das konstruierte strukturelle Gen mit 1761 Nukleotiden zur Kodierung von authentischem, reifen menschlichen Serumalbumin mit 585 Aminosäureresten wurde nach einem bevorzugten Ausführungsbeispiel in fünf große Fragmente unterteilt. Das erste Fragment wurde doppelsträngig in der bekannten Weise synthetisiert, und das zweite bis fünfte Fragment wurden nach der Methode hergestellt, die in EP-A-O 182383 offengelegt wurde, wonach ein einzelner Strang chemisch synthetisiert und der komplementäre Strang enzymatisch synthetisiert werden.

Unter dem Ausdruck „eindeutige Spaltungsstelle“ versteht man, daß die Spaltungsstelle für ein spezielles Enzym charakteristisch ist und daß sie sonst an keiner anderen Stelle in den zu verbindenden Fragmenten auftritt.

Die Methode der Verbindung von zwei Fragmenten mit ausgewählten Endnukleotiden wurde später auch bei der Konstruktion von Zwischenplasmiden angewendet, die zum Hefeexpressionsvektor führten.

Die Einzelheiten der Methoden der Erfindung werden in Verbindung mit den bevorzugten Ausführungsbeispielen der Erfindung beschrieben.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung von authentischem menschlichen Serumalbumin durch Vermehrung eines Wirts geschaffen, der mit einem Vektor transformiert wurde, welcher eine Rekombinant-DNA-Folge unter Expression enthält, ebenso wahlweise Sekretionsbedingungen, und Isolierung des exprimierten und wahlweise sekretierten Proteinproduktes. Die charakteristischen Merkmale dieses erfindungsgemäßen Verfahrens sind a) die Verwendung eines Wirts, der mit einem Vektor transformiert wurde, welcher ein strukturelles Gen nach der Erfindung enthält, und b) die Isolierung von authentischem menschlichen Serumalbumin oder wahlweise von dessen Methionylderivat. Bei einem bevorzugten Ausführungsbeispiel dieses Gesichtspunkts der Erfindung ist der verwendete Wirt *Saccharomyces cerevisiae*, transformiert mit einem Shuttle-Vektor (*E. coli*-Hefe), der eine strukturelle Genkodierung für authentisches menschliches Serumalbumin aufweist, wobei dieses Gen aus einer Nukleotidfolge zusammengesetzt ist, in welcher die Kodone unter Berücksichtigung des Hefewirts ausgewählt wurden.

Nach einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird authentisches menschliches Serumalbumin geschaffen, das aus dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren resultiert. Dieses authentische HSA kann anstelle natürlichen, reifen HSA für alle Anwendungen eingesetzt werden.

Nach einem zusätzlichen Gesichtspunkt der Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung geschaffen, die authentisches menschliches Serumalbumin nach der Erfindung in Mischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger- und/oder Verdünnungsmittel enthält. Geeignete Träger- und/oder Verdünnungsmittel sind die für natürliches HSA

verwendeten, beispielsweise Salzlösung, und es wird beispielsweise auf die US Pharmacopoeia zur Vermittlung von Richtlinien verwiesen. Das gleiche gilt für herkömmliche Zusätze, wie Präservative, pH-Wert-Regler, Puffer usw., die wahlweise einbezogen werden können.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Die Zeichnungen beziehen sich auf Plasmidkonstruktionen und ein Fluorograph. In den Zeichnungen ist

- Abb. 1: die physische Karte des Coliplasmids pGB 1;
 Abb. 2: die Karte des Plasmids pGB 2, das ein HIS3-Hefegen enthält;
 Abb. 3: die Karte des Plasmids pGB 3-229 T (a) und die Konstruktion durch die Schritte 1 und 2 des Grundexpressionsvektors pPT2 HK₁ (c) über eine Zwischenkonstruktion pGB 3-229 TK⁰ (b);
 Abb. 4: die Karte von pGB 2 (HIS3 m PHC 5, PHO3);
 Abb. 5: die Karte von Plasmid pUC 18/623 P (a), welches den Promotor des PHO5-Hefegens enthält, und die Modifikationen (1, 2 und 3), die zur Konstruktion von Plasmid pUC 18*/623 P (b) und pUC 18*/622 PH (c) führen;
 Abb. 6: die physische Karte des Plasmids pPT 2 HK₁ des Grundexpressionsvektors;
 Abb. 7: die Konstruktion des Hefe-E. coli-Shuttle-Vektorplasmid pBY200;
 Abb. 8: die Konstruktion von zwei Expressionsvektorplasmiden pYHSA 221 und pBY2/HSA, welche die vollständige „HSA-Expressionspatrone“ von pPT 2/HSA enthalten;
 Abb. 9: das Ablaufschema der Konstruktion von Hefevektoren zur Expression eines synthetischen HSA-Gens;
 Abb. 10: das Fluorograph von ³⁵S-methioninmarkierten Proteinen, die mit Pferde-Anit-HSA-Serum immunoausgefällt und in SDS-Polyakrylamid-Gel aufgelöst wurden;
 Abb. 11: die Konstruktion eines Hefeexpressionsplasmids, das eine künstliche PrePro-Leader-Kodierungsfolge und eine künstliche Genkodierung für HSA enthält (Nr. 1);
 Abb. 12: die Darstellung der Produkte der CNBr-Spaltung von gereinigtem, natürlichen HSA (A und C) und von der hefeerzeugten HSA (B und D), aufgelöst durch SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese. Das Commassie-gefärbte Gel wurde auch einer Laserabtastung unterzogen (unter Verwendung des LKB-Ultro-Scan);
 Abb. 13: eine Western-Blot-Darstellung von HSA, expressiert durch Hefe, „YEprepro-HSA“ (Spuren B und C), verglichen mit Proteinen, die durch YHSA-221 expressiert worden sind (Spuren D und E). Spur A zeigt eine gereinigte HSA-Probe.

Schema 1 – Karte des künstlichen HSA-Gens

I		II				G		C		III		G		C		IV		G		C		V	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Römische Zahlen: Große HSA-Fragmente: HSA I, II, III, IV, V.

Arabische Zahlen: Synthetische Oligodeoxyribonukleotide

HSA 1, 2, 3... 24, enthalten jeweils am 3'-Terminus eine zusätzliche GGCC-Folge. Diese zusätzliche Folge wird in der HSA-Folge nicht sichtbar. Oligonukleotide HSA 7, 13 und 19 enthalten auch eine zusätzliche GGTAC-Folge am 5'-Terminus, die nicht in der abschließenden HSA-Folge sichtbar wird.

Wenn ein Oligonukleotid (HSA 1) mit einem Adaptermolekül ligiert wird, wird es beispielsweise als HSA 1 + A bezeichnet (siehe Schema 2).

Wenn HSA 1 + A in den allgemein verwendeten E. coli-Vektor pUC19 (Yannisch-Perron, C., Vieira, J., und Messing, J., Gene 33, 103-119 [1985]) geklont wird, wird das gewonnene Plasmid als pHSA 1 bezeichnet.

Wenn HSA 2 + A in das oben gewonnene pHSA 1 geklont wird, wird das resultierende Plasmid pHSA (1-2) bezeichnet.

Nachfolgende Klonungen führen zu pHSA (1-6), und dieses Plasmid enthält das große Fragment HSA II, geklont in pUC19, und kann als pHSA II bezeichnet werden.

Ebenso werden die großen Fragmente HSA III, HSA IV und HSA V aus den Oligonukleotiden 7-12, 13-18 bzw. 19-24 gewonnen, was die Plasmide pHSA III, pHSA IV und pHSA V ergibt.

Wenn die großen Fragmente HSA II und HSA III in den Vektor pUC19 eingebunden werden, kann das resultierende Plasmid als pHSA (1-12) oder einfach als pHSA (II-III) bezeichnet werden.

Ebenso können, wenn HSA IV und HSA V als große Fragmente im Vektor pUC19 verbunden werden, für das resultierende Plasmid die Bezeichnungen pHSA (13-24) bzw. einfach pHSA (IV-V) verwendet werden.

Wenn HSA (II-III) und HSA (IV-V) verbunden werden, ergeben sie pHSA (II-V), in welchen annähernd der gesamte Kodierungsbereich von HSA (von 13-585 die Aminosäuren des reifen HSA – ohne das N-Terminal Met) geklont wird.

Wenn pHSA (II-V) mit dem Fragment HSA I in pUC19 ergänzt wird, wird das resultierende Plasmid pHSA bezeichnet.

Das Fragment HSA I wurde als partieller Duplex in zwei Formen synthetisiert (Schema 4).

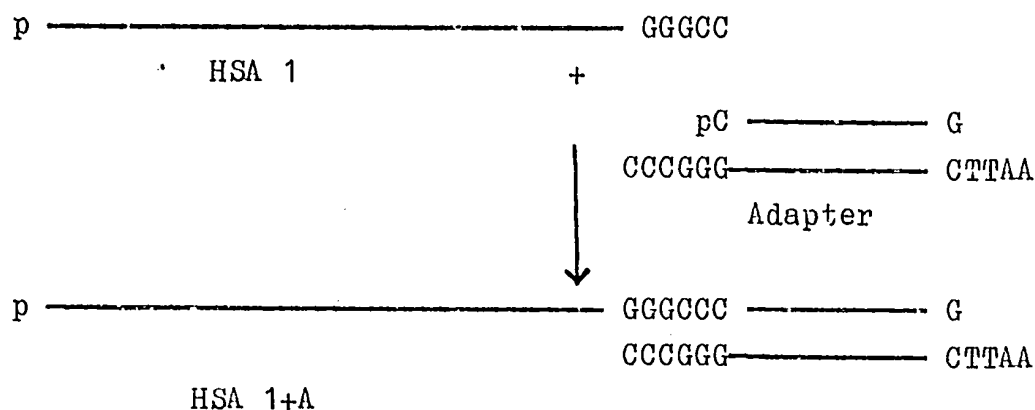
Demzufolge erhält man zwei Versionen von pHSA, d. h., pHSA Nr. 1 und pHSA Nr. 2 (Schema 5).

Aus pHSA Nr. 2 kann das Met-HSA-Kodierungsgen gewonnen werden (als Fragment mit stumpfem Ende und mit SacI-Ende, Schema 6).

Aus pHSA Nr. 1 kann das reife HSA-Kodierungsgen gewonnen werden (als Fragment mit stumpfem Ende und mit SacI-Ende, Schema 7).

Der Met-HSA- oder der reife HSA-Kodierungs-DNA-Bereich können in den E. coli-Vektor pPT2HK₁ geklont werden, welcher den PHO5-Hefepromoter- + Signalfolgekodierungsbereich und den His3-Hefetranskriptionsterminator enthält. (Um pPT2/HSA zu erhalten.) Die Promotersignalfolge-HSA-Gen-1 terminator-kassette wird zur HSA-Expression in einen selbstreplizierenden Hefevektor pBY200 einbezogen.

Schema 2 – Beispiel für die Ligation eines Oligonukleotids mit einem Adaptermolekül



Das Oligonukleotid HSA 1 und der Adapter des oberen Stranges werden 5'-phosphoryliert, während das mit dem Adapter des unteren Strangs nicht geschieht.

Schema 3 – Während des HSA-Klonens verwendete Adapter

Apal	EcoRI	
CGGACGGCGACGGCGACGGCGAGGC		
CCCGGGCCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGGCTTAA	Adapter 1	
Apal	EcoRI	
CGAGTATGCGACAGCTGG		
CCCGGGCTCATACGCTGTCGACCTTAA	Adapter 2	
Apal	SacI	EcoRI
CTGGAGCTCACTCTG		
CCGGGACCTCGAGTCAGACTTAA	Adapter 3	

Adapter 1 wurde dazu verwendet, das Klonen der meisten der HSA-Oligonukleotide zu erleichtern.

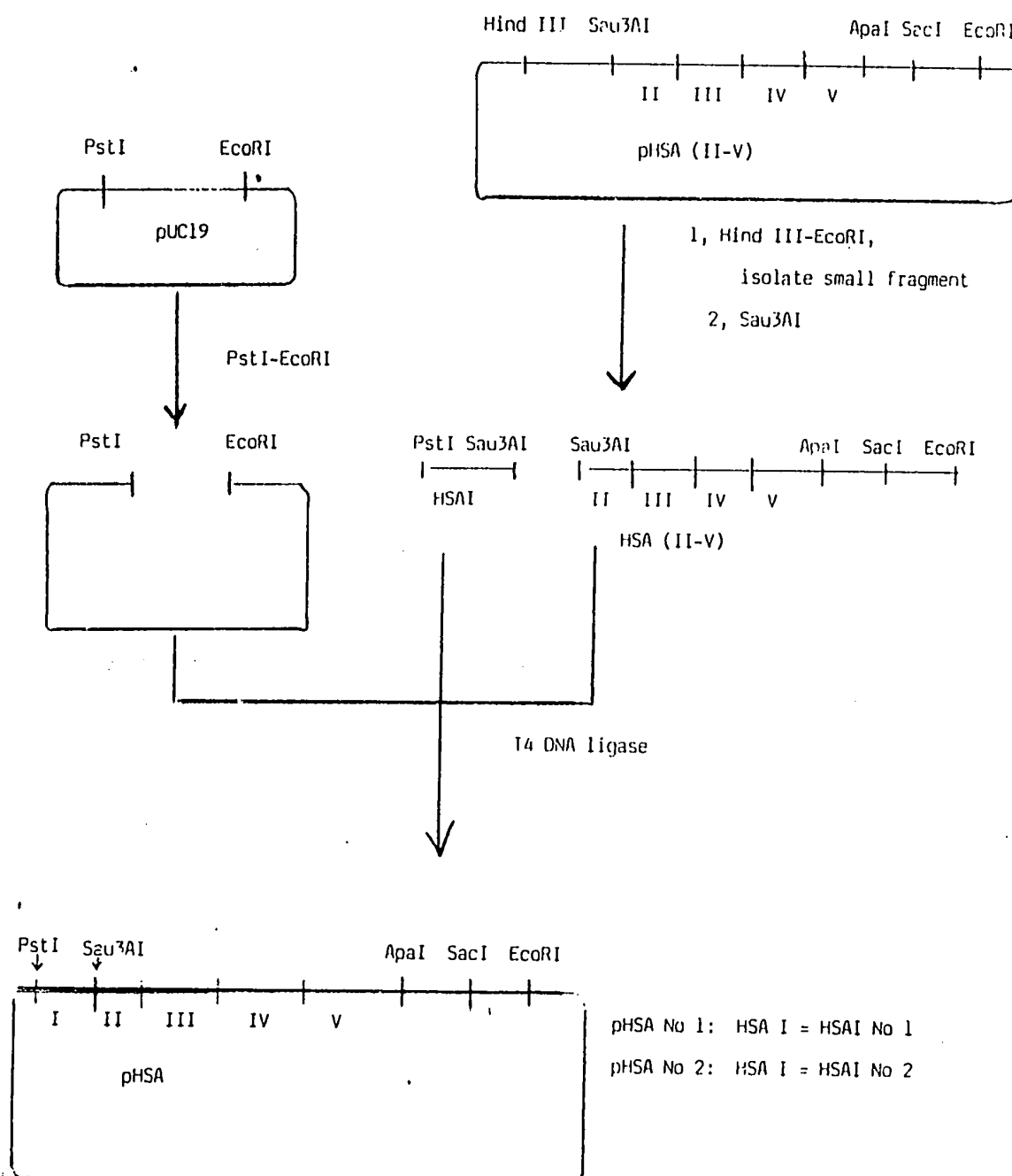
Adapter 2 wurde für die Oligonukleotide HSA 16, 17 und 18 verwendet.

Adapter 3 wurde dazu genutzt, den Adapter 1 unterhalb des HSA-Gens zu ersetzen, um eine SacI-Stelle einzufügen, die zum Klonen des HSA-Gens in den E.coli-Vektor pPT2HK₁ notwendig ist, der den Hefepromoter- und den Terminatorbereich enthält.

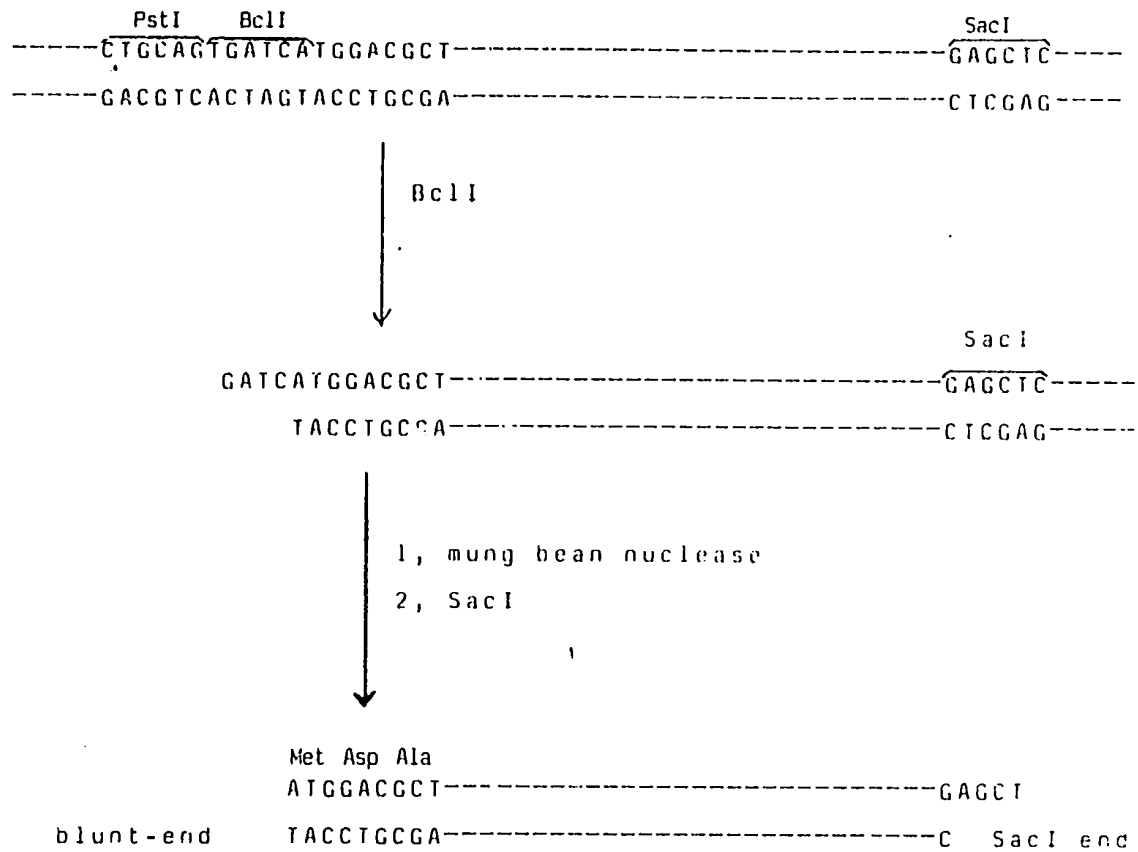
Schema 4 – HSA I-Fragmente

	PstI		Sau3AI
	Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys		
	GACGCTCACAAGTCTGAAGTCGCTCACAGATTCAAG		
Nr. 1	ACGTCTGCGAGTGTTTCAGACTTCAGCGAGTGTCTAAGTTCCTAG		
	PstI		Sau3AI
	BclI Met Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys		
	GTGATCATGGACGCTCACAAGTCTGAAGTCGCTCACAGATTCAAG		
Nr. 2	ACGTCACTAGTACCTGCGAGTGTTTCAGACTTCAGCGAGTGTCTAAGTTCCTAG		

Scheme 5 - Klonen der vollständigen HSA-Gen-Versionen in pUC19



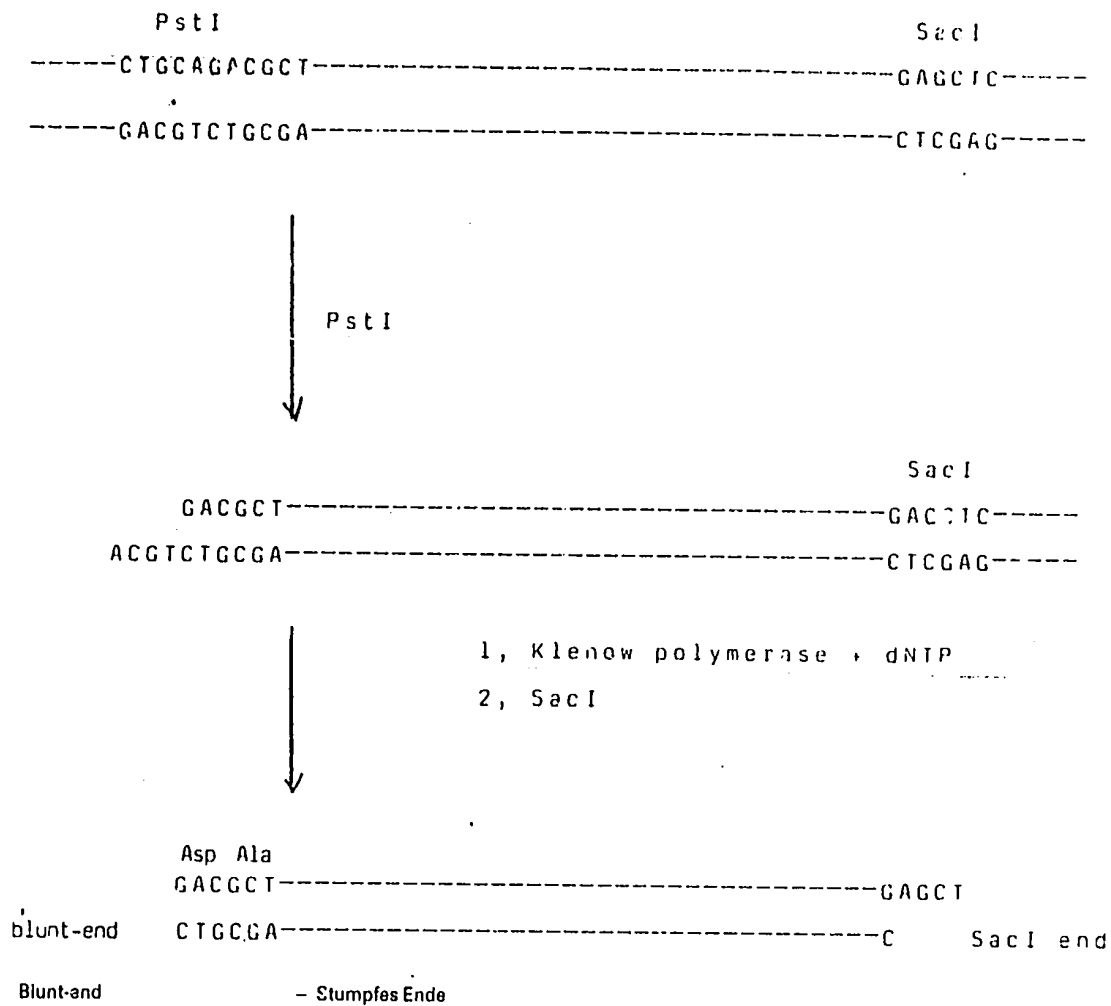
Schema 6 – Gewinnung des Met-HSA-Kodierungs-DNA-Stücks aus pHSA Nr.2



Anmerkung: Um den Met-HSA-Kodierungsbereich zu erhalten, wurde eine einzigartige Restriktionsstelle in HSA I (dann in pHSA) eingeführt, d.h. die BclI-Erkennungsfolge in HSA I (dann in pHSA, was zur pHSA Nr.2-Version führt).

Mung bean nuclease – Mung-Bohannuklease
blunt end – Stumpfes Ende

Schema 7 -- Gewinnung der reifen HSA-Kodierungs-DNA von pHSA Nr. 1



Schema 3 -- Konstruierte DNA-Folge zum Kodieren für reifes HSA

1/1

ASP ALA HIS LYS SER GLU VAL ALA HIS ARG PHE LYS ASP LEU GLY GLU ASN PHE
GAC GCT CAC AAG TCT GAA GTC GCT CAC AGA TTC AAG GAT CTA GGT GAA GAA AAC TTC

→ HSA1

20/58

LYS ALA LEU VAL LEU ILE ALA PHE ALA GLN TYR LEU GLN GLN CYS PRO PHE GLU ASP HIS
AAG GCT TTG GTT TTG ATT GCT TTC GCT CAA TAC TTG CAA CAA TGT CCA TTC GAA GAC ~~CAE~~

→ HSA2

40/118

VAL LYS LEU VAL ASN GLU VAL THR GLU PHE ALA LYS THR CYS VAL ALA ASP GLU SER ALA
GTC AAG TTG GTC AAC GAA GTT ACT GAA TTT GCT AAG ACC TGT GTT GCT GAC GAA TCT GCT

60/178

GLU ASN CYS ASP LYS SER LEU HIS THR LEU PHE GLY ASP LYS LEU CYS THR VAL ALA THR
GAA AAC TGT GAC AAG TCC TTG CAC ACT TTG TTC GGT GAC AAG TTG TGT ACT GTT GCT ACT

→ HSA3

80/238

LEU ARG GLU THR TYR GLY GLU MET ALA ASP CYS CYS ALA LYS GLN GLU PRO GLU ARG ASN
TTG AGA GAA ACT TAC GGT GAA ATG GCT GAC TGT TGT GCT AAA CAG GAA CCA GAA AGA AAC

→ HSA4

100/298

GLU CYS PHE LEU GLN HIS LYS ASP ASP ASN PRO ASN LEU PRO ARG LEU VAL ARG PRO GLU
GAA TGT TTC TTA CAA CAC AAG GAC GAC AAC CCA AAC TTG CCA AGA TTG GTT AGA CCA GAA

→ HSA5

Schleife E - fortgesetzt

120/358

VAL ASP VAL MET CYS THR ALA PHE HIS ASP ASN GLU GLU THR PHE LEU LYS LYS TYR LEU
GTC GAC GTT ATG TGT ACT GCT TTC CAC GAC AAC GAA GAG ACT TTC TTG AAG AAG TAC TTG

↳HSA6

140/418

TYR GLU ILE ALA ARG ARG HIS PRO TYR PHE TYR ALA PRO GLU LEU LEU PHE PHE ALA LYS
TAC GAA ATC GCC AGA AGA CAC CCA TAC TTC TAC GCT CCA GAA TTG TTG TTC TTC GCT AAG

↳HSA7

160/478

ARG TYR LYS ALA ALA PHE THR GLU CYS CYS GLN ALA ALA ASP LYS ALA ALA CYS LEU LEU
AGA TAC AAG GCT GCT TTC ACT GAA TGT TGT CAA GCT GCC GAC AAG GCT GCT TGT TTG TTG

180/538

PRO LYS LEU ASP GLU LEU ARG ASP GLU GLY LYS ALA SER SER ALA LYS GLN ARG LEU LYS
CCA AAG TTG GAC GAA TTG AGA GAC GAA GGT AAG GCT TCT TCC GCT AAG CAA AGA TTG AAG

↳HSA8

200/598

CYS ALA SER LEU GLN LYS PHE GLY GLU ARG ALA PHE LYS ALA TRP ALA VAL ALA ARG LEU
TGT GCT TCC TTG CAA AAG TTC GGT GAA AGA GCC TTC AAG GCC TGG GCT GTT GCT AGA TTG

↳HSA9

220/658

SER GLN ARG PHE PRO LYS ALA GLU PHE ALA GLU VAL SER LYS LEU VAL THR ASP LEU THR
TCT CAA AGA TTC CCA AAG GCT GAA TTT GCT GAA G/T TCT AAG TTG GTT ACT GAC TTG ACT

↳HSA10

240/718

LYS VAL HIS THR GLU CYS CYS HIS GLY ASP LEU LEU GLU CYS ALA ASP ASP ARG ALA ASP
AAG GTT CAC ACT GAA TGT TGT CAC GGT GAC TTG TTG GAA TGT GCT GAC GAC AGA GCT GAC

↳HSA11

260/778

LEU ALA LYS TYR ILE CYS GLU ASN GLN ASP SER ILE SER SER LYS LEU LYS GLU CYS CYS
TTG GCT AAG TAT ATC TGT GAA AAC CAA GAC TCT ATC TCT TCT AAG TTG AAG GAA TGT TGT

↳HSA12

280/838

GLU LYS PRO LEU LEU GLU LYS SER HIS CYS ILE ALA GLU VAL GLU ASN ASP GLU MET PRO
GAA AAG CCA TTG TTG GAA AAG TCT CAC TGT ATC GCT GAA GTT GAA AAC GAC GAA ATG CCA

↳HSA13

300/898

ALA ASP LEU PRO SER LEU ALA ALA ASP PHE VAL GLU SER LYS ASP VAL CYS LYS ASN LYS
GCT GAC TTG CCA TCT TTG GCT GCT GAC TTC GTT GAA TCT AAG GAC GTT TGT AAG AAC TAC

320/958

ALA GLU ALA LYS ASP VAL PHE LEU GLY MET PHE LEU TYR GLU TYR ALA ARG ARG HIS PRO
GCT GAA GCT AAG GAC GTT TTC TTG GGT ATG TTC TTG TAC GAA TAC GCT AGA AGA CAC CCA

↳HSA14

340/1018

ASP TYR SER VAL VAL LEU LEU LEU ARG LEU ALA LYS THR TYR GLU THR THR LEU GLU LYS
GAC TAC TCC GTT GTT TTG TTG TTG AGA TTG GCT AAG ACT TAC GAA ACT ACT TTG GAA AAG

↳HSA15

360/1078

CYS CYS ALA ALA ALA ASP PRO HIS GLU CYS TYR ALA LYS VAL PHE ASP GLU PHE LYS PRO
TGT TGT GCT GCT GCT GAC CCA CAC GAA TGT TAC GCT AAG GTT TTC GAC GAA TTT AAG CCA

↳HSA16

380/1138

LEU VAL GLU GLU PRO GLN ASN LEU ILE LYS GLN ASN CYS GLU LEU PHE LYS GLN LEU GLY
TTG GTT GAA GAA CCA CAA AAC TTG ATT AAG CAA AAC TGT GAA TTG TTC AAG CAA TTG GGT

↳HSA17

Schema 8, fortgesetzt

400/1198

GLU TYR LYS PHE GLN ASN ALA LEU LEU VAL ARG TYR THR LYS LYS VAL PRO GLN VAL SER
GAA TAC AAG TTC CAA AAC GCT TTG TTG GTT AGA TAC ACT AAG AAG GTT CCA CAA GTC TCC

420/1258

THR PRO THR LEU VAL GLU VAL SER ARG ASN LEU GLY LYS VAL GLY SER LYS CYS CYS LYS
ACT CCA ACT TTG GTT GAA GTC TCT AGA AAC TTG GGT AAG GTT GGT TCT AAG TGT TGT AAG

└─HSA18

440/1318

HIS PRO GLU ALA LYS ARG MET PRO CYS ALA GLU ASP TYR LEU SER VAL VAL LEU ASN GLN
CAC CCA GAA GCT AAG AGA ATG CCA TGT GCT GAA GAC TAC TTG TCT GTT GTT TTG AAC CAA

└─HSA19

460/1378

LEU CYS VAL LEU HIS GLU LYS THR PRO VAL SER ASP ARG VAL THR LYS CYS CYS THR GLU
TTA TGT GTT TTG CAC GAA AAG ACT CCA GTT TCT GAC AGA GTT ACT AAG TGT TGT ACT GAA

└─HSA20

480/1438

SER LEU VAL ASN ARG ARG PRO CYS PHE SER ALA LEU GLU VAL ASP GLU THR TYR VAL PRO
TCT TTG GTT AAC AGA AGA CCA TGT TTC TCT GCC TTG GAA GTT GAC GAA ACT TAC GTC CCA

└─HSA21

500/1498

LYS GLU PHE ASN ALA GLU THR PHE THR PHE HIS ALA ASP ILE CYS THR LEU SER GLU LYS
AAG GAA TTT AAC GCT GAA ACT TTC ACT TTC CAC GCC GAC ATC TGT ACC TTG TCC GAA AAG

└─HSA22

520/1558

GLU ARG GLN ILE LYS LYS GLN THR ALA LEU VAL GLU LEU VAL LYS HIS LYS PRO LYS ALA
GAA AGA CAA ATC AAG AAG CAA ACT GCT TTG GTT GAA TTG GTT AAG CAC AAG CCA AAG GCT

└─HSA23

540/1618

THR LYS GLU GLN LEU LYS ALA VAL MET ASP ASP PHE ALA ALA PHE VAL GLU LYS CYS CYS
ACT AAG GAA CAA TTG AAG GCT GTT ATG GAC GAC TTC GCT GCT TTC GTT GAA AAG TGT TGT

560/1678

LYS ALA ASP ASP LYS GLU THR CYS PHE ALA GLU GLU GLY LYS LYS LEU VAL ALA ALA SER
AAG GCT GAC GAC AAG GAA ACT TGT TTC GCT GAA GAA GGT AAG AAG TTG GTT GCT GCT TCT

└─HSA24

580/1738

GLN ALA ALA LEU GLY LEU
CAA GCT GCT TTG GGT TTC TAA TAG

Anmerkung: Die Positionen der einsträngigen, chemisch synthetisierten Oligodeoxyribonukleotide – als Ausgangsmaterial für die gesamte Einheit – werden in dieser Folge mit Pfeilen gekennzeichnet (z. B. HSA 1, HSA 2 ...).

Zu beachten ist auch, daß alle HSA-Oligonukleotide mit einer zusätzlichen GGCC-3'-Terminalfolge und außerdem mit einer zusätzlichen GGTA-5'-Terminalfolge im Falle der Oligonukleotide HSA 7, HSA 13 und HSA 19 hergestellt wurden.

Schema 9 – Chemisch synthetisierte HSA-Oligonukleotide, welche die großen Fragmente HSA II, HSA III, HSA IV und HSA V enthalten

HSA-Oligonukleotidzahl	Länge	Position in reifer HSA-Kodierungsfolge	Anzahl der Fragmente: 24
HSA 1	76	41-112	TAGGTGAAGAAAACTTCAAGGCTTGGTTTGGATTGCTTTGCTCAATATTGCAACAATGTCCATTTCGAAGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 2	77	113-185	ACCACGTCAAGTTGGTCAACGAAGTTACTGAATTTGCTAAGACCTGTGTGCTGACGAATCTGCTGAAAACTGGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 3	75	186-256	TGACAACTCCTTGCACACTTTCGCGTGACAAAGTTCGTACTGTTGCTACTTTGAGAGAAACTTACGSGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 4	70	257-322	AAATGGCTCAGTGTGTGCTAAACAGGAACCCACAAAGAAACGAATGTTTCTTACAACACAAAGGACGGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 5	76	323-394	ACAACCCAAACTTGCCCAAGATTGGTTAGACCAGGAAGTCGACGTTATGTGTACTGCTTCCACGACAAAGGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 6	82	395-472	ACACTTTCITCAAGGAAGTACTTGTACGAAATCGGCGAGACACACCCCATACTTCTACGCTCCAGAATTGTGTCTTCGGGGCC ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Schema 9, fortgesetzt

HSA- Oligo- nukleo- tid- folge	Länge	Position in reifer HSA-Kodie- rungs- folge
HSA 7	74	473-537
		GGTACCTAAGAGATACAAGCGCTGCTTCACTGAATGTTGTCAAGCTGCCGACAAGGCTGCTTGTGTTGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 8	76	538-609
		CCAAAGTTGGACGAATTGACAGACGGAAGGTAAGGCTTCTTCCGCTAAGCAAAGATTGAAGTGTGCTTCCTTGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 9	74	610-679
		CAPAAAGTTCCGTCGAAAGAGCCCTTCAAGGCCCTGGCCTGTTGCTAGATTGTCTCAAAAGATTCCCAAGGCTGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 10	75	680-750
		AATTGCTGAAGTTTCTAAGTTGGTTACTGACTTGACTAAGGTTACACIGAAATGTTGTACCGGTCGACTTGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 11	76	751-822
		TTGGAAATGTGCTGACGACAGAGCTGACTTGGCTAAGTATATCTGTGCAAAACCAAGACTCTATCTTCTAAGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 12	76	823-894
		TTGAAGGAAATGTTGTGAAAAGCCATTGTTGGAAAACCTCACTGTATCGCTGAAGTTGAAAACGACGAAATGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 13	79	895-964
		GGTACCCAGCTGACTTGCCATCTTTGGCTGCTGACTTCGTTGAATCTAAGGACGTTTGTAGAAGTACGCTGAAGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
HSA 14	81	965-1041
		CTAAGGACGTTTTCTTGGGTATGTTCTTGTACGAATACGCTAGAGACACCCAGACTACTCCGTTGTTTGTGTTGGGCC
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Zum Aufreihen von Teilen des HSA-Gens verwendete synthetische Primere

Wenn HSA-Oligonukleotide in den Vektor pUC19 geklont wurden (oder ein anderes HSA-Nukleotid in einen vorher gewonnenen pHSA-Vektor geklont wurde), wurde ein Folgebildungsprimer GTAACGCCAGGGTTTCCCAGT, das vorher synthetisiert und als pKO-Primer I bezeichnet wurde (Simoncsits, A., Kálmán, M., Cserpán, I. und Kari, C., Nucleic Acids Res. Symp. Ser. No 14, 1984, 321–322), dazu verwendet, die Folge der gewonnenen Klone zu überprüfen. Dieses Primer befindet sich zwischen den Nukleotidpositionen 348–369 der veröffentlichten pUC19-Folge (Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J., Gene, 33 [1985], 103–119) und wird dazu genutzt, alle einzeln geklonten HSA-Oligonukleotide (alle 24) aufzureihen.

Wenn die großen Fragmente HSAII und HSAIII verbunden wurden, wurde der Verbindungspunkt durch ein synthetisches Primer GCAGCCTTGTCGGCAGCTTG überprüft, das komplementär zur HSA-Genfolge zwischen den Nukleotidpositionen 508 und 527 (für reifes HSA) ist.

Die Verbindungsstelle von HSAIV und HSAV wurde unter Verwendung eines Primers CTTGCAAAACACATAATTGG überprüft, das zur HSA-Genfolge zwischen den Positionen 1374 und 1393 komplementär ist. Die Verbindungsstelle der großen Fragmente HSAIII und HSAIV in pHSA (II-V) wurde unter Verwendung des eigentlichen HSA 10-Oligonukleotids als Folgebildungsprimer überprüft.

Wenn die HSA-Gensynthese im Vektor pUC19 abgeschlossen ist, erfolgt die Aufreihung des gesamten HSA-Kodierungsbereichs unter Verwendung von Plasmidtemplat und 10 verschiedenen Folgebildungsprimern. Eine weitere Bestätigung der HSA-Kodierungsfolge wurde gewonnen, wenn diese aus dem pUC-19-Vektor in den Vektor M13m19 (Yanisch-Perron, C. usw.) eingesetzt und die Folgebildung an einsträngigen Phag-DNA-Templat unter Verwendung der gleichen 10 Primere durchgeführt wurde.

Synthetische Primere zur Überprüfung des vollständigen HSA-Kodierungsbereichs in pUC19 oder in M13m19

Name des Primers	Nukleotidposition im HSA-Kodierungsbereich
pKO-Primer I	außerhalb von HSA, im lacZ-Teil von pUC19
pHSA-Primer 1	1587–1603
pHSA-Primer 2	1398–1414
pHSA-Primer 3	1195–1211
pHSA-Primer 4	988–1007
pHSA-Primer 5	795–809
pHSA-Primer 6	582–597
pHSA-Primer 7	382–398
pHSA-Primer 8	178–192
pHSA-Primer 9	66–85

Das letzte Primer (Primer 9) wurde auch dazu genutzt, die Verbindungsstelle von HSA (reife oder Met-Form) und Hefe-PH05-Promoter-Signalfolge zu überprüfen, wenn das HSA-Gen aus pUC19 in pPT2HK₁ eingesetzt wurde.

Materialien und Methoden

Enzyme	Quelle
Apal	Boehringer
EcoRI	New England Biolabs (NEB)
Klenow-Polymerase	Boehringer

Enzyme	Quelle
T4-DNA-Ligase	NEB
KpnI	NEB
SacI	NEB
BamHI	Boehringer
XbaI	NEB
Mung-Bohnennuklease	Pharmacia
HindIII	NEB
Sau3AI	NEB
BalI	NEB
PstI	NEB
XhoI	Boehringer
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer
T1-RNase	Calbiochem
Proteinase K	Merck
BclI	NEB
SalI	NEB
Helicase	REACTIFS IBF
Glukuronidase	Boehringer

Isotope

γ-³²P-ATP (<5000 Ci/mMol)
α-³²P-dATP (800 Ci/mMol)
α-³⁵S-dATP (~1200 Ci/mMol) von Amersham
³⁵S-Methionin (~800 Ci/mMol) von Amersham

Chemische Synthese von Oligodeoxyribonukleotiden

Es wurde entweder die Phosphattriester-Methode mit Hilfe eines manuellen DNA-Bank-Synthesizers (Omnifit) unter Verwendung von Monomer- oder Dimerbausteinen (Spratt, B. S. u. a., 1983, *Tetrahedron Letters* 24, 5771) oder die Phosphoramidit-Methode unter Verwendung eines automatischen Gen-Assemblers (Pharmacia) nach den Anweisungen der Hersteller angewendet. Chemikalien wurden entweder von Cruachem (Phosphattriester-Chemie) oder von Pharmacia (Phosphoramidit-Chemie) bezogen.

5'-Phosphorylation der synthetischen Oligodeoxyribonukleotide

Die enzymatische Phosphorylation wurde unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase und ATP durchgeführt. In Abhängigkeit von den speziellen Erfordernissen, wurde diese Reaktion entweder mit radioaktivem oder nichtradioaktivem ATP ausgeführt.

a) Phosphorylation mit γ - ^{32}P -ATP von hoher spezifischer Aktivität

Dieses Verfahren wurde für HSA-Oligonukleotide angewendet, um Hybridisierungssonden zu erhalten, oder für die 5'-Markierung von Folgebildungsprimern, wenn die Folgebildungsreaktionen auf Plasmid-DNA-Templat ausgeführt wurden. Es wurden 10 pMol Oligonukleotid in γ - ^{32}P -ATP (7 μl , ~ 5000 Ci je mMol, 10 mCi/ml), 250 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 50 mM MgCl_2 (2 μl) und 100 mM DTT (1 μl) aufgelöst. Dazu wurden 0,5 μl T4-Polynukleotidkinase (10 Einheiten/ μl) gegeben, und das Gemisch wurde 30 min bei 37°C gehalten, gefolgt von einer Wärmebehandlung (100°C, 3 min), um das Enzym zu inaktivieren. Die Lösung wurde, der weiteren Verwendung entsprechend, entweder mit Hybridisationspuffer oder mit sterilem Wasser verdünnt. Der Überschuss an nichtreagiertem γ - ^{32}P -ATP wurde nicht entfernt.

b) Phosphorylierung mit γ - ^{32}P -ATP mit niedriger spezifischer Aktivität

Dieses Verfahren wurde zur Kennzeichnung der HSA-Oligonukleotide vor deren Ligation mit den Adaptern angewendet. In 10 μl Reaktionsvolumen, das 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl_2 in 10 mM DTT enthielt, wurden 50 pMol Oligonukleotid und 100 pMol γ - ^{32}P -ATP (200 Ci/mMol) aufgelöst, und es wurde 1 μl T4-Polynukleotidkinase (10 Einheiten/ μl) zugesetzt. Nachdem man das Gemisch eine Stunde bei 37°C stehengelassen hatte, wurde es bei 100°C 3 min lang einer Wärmebehandlung unterzogen.

c) Phosphorylation mit nichtradioaktivem ATP

Dieses Verfahren wurde beim oberen Strang von Adapter 1 und Adapter 2 sowie bei beiden Strängen von anderen, adapterähnlichen Molekülen, wie Adapter 3 und Oligonukleotiden von Fragment HSAI, angewendet.

Die Phosphorylation des oberen Stranges von Adapter 1 und Adapter 2 wurde an den Oligonukleotiden im großen Maßstab folgendermaßen ausgeführt.

Es wurden 2,2 nMol Oligonukleotid und 20 nMol ATP in 100 μl Reaktionsvolumen auflöst, das 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT und 10 Einheiten T4-Polynukleotidkinase enthielt. Die Reaktion wurde eine Stunde lang bei 37°C ausgeführt, gefolgt von einer Wärmebehandlung bei 100°C für die Dauer von 3 min.

Andere nichtradioaktive Phosphorylationen wurden im wesentlichen so ausgeführt, wie das für die Phosphorylation mit niedriger spezifischer Aktivität beschrieben wurde, im Maßstab von 50 pMol, dem Reaktionsgemisch wurde jedoch kein radioaktiv markiertes γ - ^{32}P -ATP zugesetzt.

Ligation von HSA-Oligonukleotiden mit dem Adapter (allgemeines Verfahren)

Es wurden 25 pMol von 5'- ^{32}P -phosphoryliertem HSA-Oligonukleotid mit 75 pMol 5'-phosphoryliertem oberen Strangadapternukleotid und mit 75 pMol nichtphosphoryliertem unteren Strangadapternukleotid in 50 μl Reaktionsvolumen gemischt, das 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1 mM ATP enthielt. Das Gemisch kühlte sich auf 15°C ab, und es wurden etwa 0,2 μl (etwa 80 Einheiten) T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Reaktion wurde bei 15°C für die Dauer von 4 bis 16 Stunden ausgeführt. Es wurden 50 μl von 1 M NaCl und 1 μl Hefeträger-tRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugesetzt, und die Oligonukleotide wurden mit 300 μl Ethanol in einem flüssigen Stickstoffbad für die Dauer von 2 min ausgefällt. Das Gemisch wurde 5 min lang mit 12000 U/min zentrifugiert, das Pellet wurde getrocknet und in 10 μl Gel-Füllpuffer aufgelöst, der 80% Formamid, 10 mM EDTA, 0,05% Xylenzylanol und 0,05% Bromophenol Blau enthielt. Die Trennung des ligierten HSA-Oligonukleotids vom nichtligierten (und vom Adapter) erfolgte durch Aufbringung der obigen Lösung auf ein 10%iges Acrylamidgel, das keinen Harnstoff enthielt. Bei 400 V wurde eine Gel-Elektrophorese für die Dauer von 3 bis 5 Stunden unter Verwendung von 100 mM TBE als Gel und Durchlaufpuffer (100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH-Wert 8,3) durchgeführt. Nach der Radioautografie des Gels (2 bis 10 min) wurden zwei größere radioaktive Bänder loziert, von denen das untere Band dem nichtligierten HSA-Oligonukleotid entsprach, während das obere Band dem adapterligierten HSA-Oligonukleotid entsprach. Das diesem letzteren entsprechende Gel-Stück wurde herausgeschnitten und in 500 mM NaCl (300 μl) bei 37°C 10–16 Stunden lang getränkt. Die obenaufschwimmende Schicht wurde zweimal mit Phenol (gesättigt mit 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0 300 μl) behandelt, und das Oligonukleotid-Adapter-Addukt wurde nach dem Zusatz von 30 μl 3 M NaOAc, pH-Wert 5,2, 1 μl Hefeträger-tRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 750 μl Ethanol ausgefällt.

Das Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 μl sterilem Wasser aufgelöst, und es wird ein Aliquot in einem Packard-Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt, um den Ertrag der Ligationsreaktion zu bestimmen. Der Ertrag lag, ausgehend vom ^{32}P -Phosphat-HSA-Oligonukleotid-Ausgangsmaterial, zwischen 20 und 50% (isolierte Ausbeute).

21 der 24 HSA-Oligonukleotide wurden mit Adapter 1 ligiert. Die Ausnahmen sind die Oligonukleotide HSA 16, 17 und 18, die mit Adapter 2 ligiert wurden. (Für HSA 16 war dieser neue Adapter offensichtlich notwendig, für HSA 17 und 18 war es aber vielleicht keine bessere Wahl. Auf jeden Fall wurden diese drei Oligonukleotide gleichzeitig mit Adapter 2 ligiert.)

Bakterienstämme

Die meisten der HSA-haltigen Plasmidtransformationen und Vermehrungen wurden unter Verwendung von *E. coli* JM101 ausgeführt (Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P. H., *Nucleic Acids Res.* 9, [1981], 304–321). Dieser Stamm hat folgenden Genotypus: SupE, thi, $\Delta(\text{lac-proAB})$, F', traD36, proAB, lacI q ZAM15.

Ein dam $^{-}$ -*E. coli*-Stamm (GM2) (Morinus, M. G. und Morris, N. R. [1973], *J. Bact.* 114, 1143–1150) wurde für die Plasmidvermehrung verwendet, bevor die BclI-Enzymmanipulation erforderlich war.

Während der Konstruktionen von pBY2/HSA Nr. 1 und pBY2/HSA Nr. 2 wurde ein *E. coli*-Stamm (K12), JF1754-Stamm (hsdR hsdM $^{-}$ lac gal met leuB hisB) als Wirt verwendet; Referenzen: Stroms, R. K., McNeil, J. B., Khanendekar, P. S., An, G., Parker, J.

und Friesen, J. D. (1979), *J. Bacteriol.* **140**, 73–82; Kiss, G. E., Amin, A. A. und Perlman, R. E. (1981), *Molecular and Cellular Biology*, **1**, 535–543.

Die Mutationen *leu B* und *his B* von JF7754 können mit den entsprechenden Hefegenen (*leu 2* bis *his 3*) komplementiert werden; Referenz: Struhl, K. und Davis, R. W. (1980), *J. Mol. Biol.* **136**, 309–332.

Hefestamm

AH220 [*a*, *trp 1*, *leu 2–3*, *2–112*, *his 3–11*, *3–15*, *pho 5*, *pho 3*], ein Labor-Haploid-Stamm, wurde von A. Hinnen, CIBA-CEIGY AG, Biotechnology Department, Basel, Schweiz, bezogen.

E. coli-Transformation mit Plasmid- und Phagvektoren

Sie wurde im wesentlichen so ausgeführt, wie sie von Hanahan, D. (in *DNA Cloning – DNA-Klonung*, Bd. I, herausgegeben von Glover, D. M., IRC Press Limited, 1985, S. 109–135) beschrieben wurde, wobei gefrorene kompetente Zellen verwendet wurden, die nach Protokoll 3 dieses Beitrags hergestellt worden waren.

Hefetransformation

Hefesphäroplaste, die nach der Methode von Hinnen u. a. (Hinnen, A., Hicks, J. B. und Fink, G. R. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929–1933) transformiert werden, wurden durch Helikasebehandlung von AH220 hergestellt.

Plasmidherstellung

Es wurde eine leicht modifizierte Version des alkalischen Schnellextraktionsverfahrens angewendet (Birnboim, H. C. und Doly, J. [1979], *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513–1523).

Eine einzelne Kolonie wurde in ein LB-Medium (Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J., [1982] *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., S. 440; 3 ml) inokuliert, das 100 µg/ml Ampizillin enthielt, und die Kultur wurde 10 bis 18 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet und wieder in 100 µl von Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 10 mM EDTA) zur Suspension gebracht und bei Zimmertemperatur 5 min stehengelassen. Es wurden 200 µl von frisch hergestellter Lösung II (0,2 N NaOH, 1% SDS) zugesetzt und die Lösung kurz gewirbelt, anschließend wurde sie für 5 min auf Eis gegeben. Es wurde eiskalte Lösung III (150 µl, 3 M Kaliumazetat–2 M Essigsäure) zugesetzt und das Gemisch kurz gewirbelt und dann für 15 min auf Eis gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 12000 U/min in der Zentrifuge behandelt, und 400 µl der obenaufschwimmenden Schicht wurden mit der Pipette in ein frisches Röhrchen gegeben. Es wurden 800 µl Ethanol zugesetzt, und das Gemisch wurde 5 min stehengelassen, anschließend bei 12000 U/min 2 min lang rotiert. Das Pellet wurde wieder in 400 µl von 100 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, und 50 mM NaOAc, pH-Wert 6,5, aufgelöst, und es wurde 1 ml 95%iges Ethanol zugesetzt. Nachdem man das Gemisch 30 Minuten lang bei –20°C stehengelassen hatte, wurde es mit 12000 U/min 2 min geschleudert. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0 1 mM EDTA-Lösung aufgelöst, die 0,5 Einheiten T₁RNase enthielt, und die Lösung wurde bei 37°C 30 min gehalten, dann mit 100 µl Phenol, das mit 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, gesättigt war, extrahiert. Es wurde die wäßrige Phase (etwa 90 µl) genommen, 10 µl 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5,2, wurden zugesetzt, gefolgt von 260 µl 95%igem Ethanol und dem schnellen Kühlen des Gemischs in einem flüssigen Stickstoffbad. Nach dem Zentrifugieren (12000 U/min, 3 min) wurde das Pellet wieder in 200 µl von 0,3 M NaOAc, pH-Wert 5,2, aufgelöst, und es wurden 500 µl 95%iges EtOH zugesetzt, um wie oben die Nukleinsäure auszufällen (schnelle Abschreckung in einem Bad flüssigen Stickstoffs, gefolgt vom Zentrifugieren). Das Pellet wurde mit 1 ml 95%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl sterilem Wasser aufgelöst.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde auf 3–5 µg geschätzt. Für die Agarose-Gel-Elektrophorese und die Restriktionsanalyse wurden 1–2 µl der obigen Lösung verwendet, während 3 µl für Folgebildungsreaktionen verwendet wurden. Wenn das oben gewonnene Plasmid für weitere Klonungsexperimente verwendet wurde, wurden 20 µl der Lösung für die Linearisierung mit einem oder in der Regel mit zwei Enzymen, gefolgt von der Isolierung des linearen Vektors, verwendet.

Restriktionsenzymspaltung der Plasmid-DNA

Alle analytischen Restriktionsanalysen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers ausgeführt, mit der Ausnahme, daß aus den Reaktionspuffern immer BSA weggelassen wurde.

Wenn ein bestimmtes Plasmid im präparativen Maßstab gespalten wird mit einem oder mehreren Enzymen gleichzeitig oder nacheinander, werden immer die Reaktionsbedingungen gegeben.

pUC19-Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen

Im allgemeinen werden die ersten HSA-Oligonukleotide der großen HSA-Fragmente (II, III, IV und V) in den mit zwei verschiedenen Enzymen gespaltenen pUC-19-Vektor geklont. Nach diesem ursprünglichen Plan werden nur die Oligonukleotide HSA 1, HSA 7, HSA 13 und HSA 19, die vorher mit einem Adapter (Adapter 1) ligiert wurden, in pUC19 geklont. Während der Arbeit der Gen-Montage stellte sich jedoch heraus, daß es vorteilhafter (oder schneller) ist, zwei weitere HSA-Oligonukleotide, nämlich HSA 4 und HSA 17, in pUC19, statt in die entsprechenden pHSA-Zwischenvektoren zu klonen.

a) pUC19-Spaltung mit PstI und EcoRI

Es wurden 2 µg pUC19 in 100 µl Puffer mit hohem Salzgehalt (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) mit 20 Einheiten PstI und 20 Einheiten EcoRI bei 37°C für die Dauer von 4 Stunden behandelt. Die DNA wurde ethanolisgefällt durch den Zusatz von 5 µl von 3 M Natriumazetat, pH-Wert 5,2, und 300 µl Ethanol, Abschrecken des Gemischs in einem Bad aus flüssigen Stickstoff für die Dauer von 2 min, gefolgt vom Zentrifugieren bei 12000 U/min für die Dauer von 3 min. Das Pellet wurde getrocknet und in 60 µl 4%igem Ficoll 400, 0,05% Bromophenol Blau aufgelöst, und der lineare Vektor wurde nach Trennung durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarosegel in 40 mM Tris-Azetat, 2 mM EDTA-Puffer (TAE-Puffer) isoliert, gefolgt vom Elektroelutieren, der Phenolextraktion und der Ethanolisfällung, unterstützt durch den Zusatz von 10 µg Hefeträger-tRNA (Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory [1982], S. 164–166). Das gewonnene Pellet wurde in 10 µl sterilem Wasser aufgelöst, und die Konzentration des linearen Vektors wurde nach der Minigel-Methode (ebenda, S. 468–469) bestimmt.

Dieser Vektor wurde zum Klonen verwendet: HSA 1.

b) pUC19-Spaltung mit BamHI und EcoRI

Es wurden 2 µg pUC19 in 100 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt mit 20 Einheiten BamHI und 20 Einheiten EcoRI wie oben behandelt, und die Isolierung des linearen Vektors erfolgte im wesentlichen auf die gleiche Weise wie oben.

Dieser Vektor wurde zum Klonen verwendet: HSA 13, HSA 17.

c) pUC19-Spaltung mit XbaI und EcoRI

Sie erfolgte unter Verwendung von 20 Einheiten XbaI und 20 Einheiten EcoRI für 2 µg pUC19 im wesentlichen wie oben.

Der XbaI-EcoRI-pUC19-Vektor wurde zum Klonen verwendet: HSA 4, HSA 7, HSA 19.

Spaltung der pHSA-Zwischenvektoren mit Apal und EcoRI

20 µl pHSA-Plasmid, die wie oben beschrieben hergestellt worden waren, wurden auf 100 µl mit einem Reaktionsvolumen aufgefüllt, das 6 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 6 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT und 40 Einheiten des Enzyms Apal enthielt, und das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C gehalten. Eine Probe von 2 µl wurde auf einem 0,5%igen Agarosegel in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 8 mM EDTA) behandelt. Wenn die Spaltung abgeschlossen zu sein scheint (nach 1 bis 4 Stunden) werden 10 µl 1 M NaCl, 5 µl 1 M Tris-HCl, pH-Wert 7,5, und 20 Einheiten EcoRI zugesetzt, und das Gemisch wird weitere 4 bis 16 Stunden bei 37°C gehalten. Der lineare DNA-Vektor wurde mit Ethanol ausgefällt und auf einem 0,5%igen Agarosegel gereinigt, wie das oben für die Isolierung des linearen pUC19-Vektors beschrieben wurde. Diese Apal-EcoRI-Doppeldigestion wurde mit den folgenden Plasmiden durchgeführt: HSA 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23.

Klonung von HSA-Oligonukleotid-Adapter-Komplexen in pUC19 oder in pHSA-Vektoren

Allgemeines Verfahren

Etwa 0,1 µg des doppeltgespaltenen pUC19- oder pHSA-Vektors wurden mit 5 pMol des HSA-Oligonukleotid-Adapter-Komplexes in 10 µl Reaktionsvolumen gemischt, das 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 80 Einheiten T₄-DNA-Ligase enthielt, und das Reaktionsgemisch wurde 4 bis 16 Stunden bei 15°C gehalten. Das Gemisch wurde für die Dauer von 5 min auf 60°C erhitzt, und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 1 µl 1 mM dNTP (das alle vier Deoxyribonukleosid-5-triphosphate bei einer Konzentration von 1 mM enthielt) und 1 µl von 0,5 Einheiten/µl Klenow-Polymerase zugesetzt und das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur 15 min stehengelassen. Dann wurde es für die Dauer von 10 Minuten auf 60°C erhitzt, und es wurden 4 µl steriles Wasser, 2 µl eines Puffers, der 250 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, und 50 mM MgCl₂ enthielt, 1 µl von 100 mM DTT, 1 µl von 10 mM ATP und 200 Einheiten T₄-DNA-Ligase bei 15°C zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 6 bis 20 Stunden lang bei 15°C gehalten und dann in gefrorene, kompetente E. coli-Zellen JM 101 transformiert, wie das oben beschrieben wurde. Die auf LB-Platten, welche 100 µg/ml Ampizillin enthielten, gewonnenen Kolonien wurden auf eine LB-Ampizillin-Grundplatte und eine Nitrozellulose-Replikplatte gebracht (Grunstein, M. und Hogness, D. [1975], Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961). Die auf der Nitrozellulose-Replikplatte gezogenen Kolonien wurden gelöst und mit der entsprechenden 5'-³²P-phosphatmarkierten HSA-Oligonukleotid-sonde hybridisiert (Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J., Molecular Cloning [1982], Cold Spring Harbor Laboratory, S. 314–325). In der Regel wurden 4 bis 10 positive Kolonien in 3 ml LB-Ampizillin-Medium gezogen, und Plasmid-DNA wurde wie oben beschrieben hergestellt.

Dideoxy-Folgebildung auf dem Plasmidtemplat

Es wurde die Folgebildungsmethode der Superspule (Chen, E. Y. und Seeburg, P. H., DNA 4, 165 [1985]) mit einigen Modifikationen angewendet. Es wurden 3 µl Plasmid-DNA – hergestellt wie oben – mit 17 µl von 0,3 M NaOH – 0,3 mM EDTA bei Zimmertemperatur gemischt. Nach 5 min wurden 3 µl 2 M Ammoniumazetat-Essigsäure, pH-Wert 4,5, und 60 µl Ethanol zugesetzt und das Gemisch 15 min bei –80°C gehalten. Das Gemisch wurde zentrifugiert (12 000 U/min, 5 min), und das Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 10 µl Puffer aufgelöst, der 7 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 7 mM MgCl₂, 5 mM β-Merkaptoethanol, 0,1 mM EDTA und 0,25 pMol des 5'-³²P-phosphatmarkierten Folgebildungsprimers enthielt (die im Verlauf der Arbeit verwendeten Primere werden im Schema 10 und oben gezeigt. Gelegentlich wurde auch einer der HSA-Oligonukleotide als Folgebildungsprimer trotz der Tatsache verwendet, daß sie eine zusätzliche 3'-Terminal-GGCC-Folge enthalten). Das Gemisch wurde 15 min auf 45°C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl-Aliquote mit der Pipette in einer Mikro-Titer-Platte in den Vertiefungen abgegeben. Es wurden 2 µl jedes der vier Dideoxy-Terminationsgemische (Hong, G. F., Bioscience Reports, 2, 907 [1982]) und 2 µl von 0,25 Einheiten/µl Klenow-Polymerase mit jedem der vier Primer-Templat-Aliquote gemischt, und die Gemische wurden bei Zimmertemperatur 20 min, anschließend 10 min bei 50°C gehalten. Jedem Reaktionsgemisch wurden bei 3 µl Gel-Füllpuffer zugesetzt, der 80% Formamid, 10 mM EDTA, 0,05% Bromophenol Blau und 0,05% Xylenylanol enthielt, und die Gemische wurden 2 min lang auf 100°C erhitzt. Die Gel-Elektrophorese wurde auf einem 6%igem Arkyramid-Gel ausgeführt, das 8 M Harnstoff, 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH-Wert 8,3, enthielt.

Klonen der einzelnen HSA-Oligonukleotide (HSA 1, 2, ... 24)

Der ursprüngliche Plan sah folgendes vor:

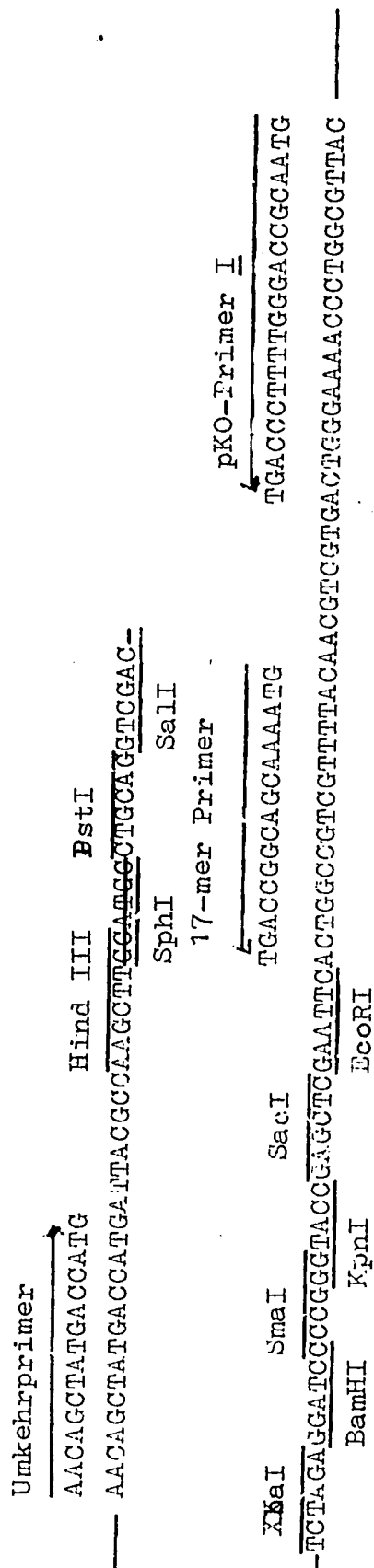
Der gesamte HSA-Kodierungsbereich wurde in fünf Fragmente, HSA I, II, III, IV und V, unterteilt. Die vier letztgenannten Fragmente (II, III, IV und V) wurden weiter in 6–6 einsträngige Oligonukleotide unterteilt (jeweils am 3'-Terminus mit G endend und durch chemische Synthesen mit einer zusätzlichen GGCC-Folge versehen), was insgesamt 24 Oligonukleotide ergibt. Die großen HSA-Fragmente (II, III, IV und V) sollten durch konsekutives Klonen der synthetischen, einsträngigen Oligonukleotide (mit Hilfe eines Adapters) in pUC19- oder pUC19-abgeleitete pHSA-Vektoren gewonnen werden, was hier durch pHSA II veranschaulicht wird:

HSA 1 wird in pUC19	geklont, um pHSA 1	zu erhalten
HSA 2 wird in pHSA 1	geklont, um pHSA (1–2)	zu erhalten
HSA 3 wird in pHSA (1–2)	geklont, um pHSA (1–3)	zu erhalten
HSA 4 wird in pHSA (1–3)	geklont, um pHSA (1–4)	zu erhalten
HSA 5 wird in pHSA (1–4)	geklont, um pHSA (1–5)	zu erhalten
HSA 6 wird in pHSA (1–5)	geklont, um pHSA (1–6)	oder
	pHSA II	zu erhalten

Ebenso wurde pHSAIII aus den Oligonukleotiden HSA 7, 8, 9, 10, 11, 12 gewonnen. pHSAIV wurde aus den Oligonukleotiden HSA 13, 14, 15, 16, 17, 18 gewonnen. pHSAV wurde aus den Oligonukleotiden HSA 19, 20, 21, 22, 23, 24 gewonnen. Diese allgemeine Strategie wurde im allgemeinen für das Klonen von HSA-Oligonukleotiden mit Hilfe von Adapter 1 (siehe Schema 37) angewendet, in einigen Fällen aber gab es Abweichungen von diesem Verfahren. Die Gründe dafür waren entweder die Beschleunigung der Montage-Arbeit durch paralleles Klonen von mehr als einem Oligonukleotid innerhalb eines großen Fragments (wie im Fall von HSAII) oder die Lösung von Klonungsproblemen, die während der Arbeit auftraten. Diese Ausnahmen waren:

- HSA 1 Oligonukleotid konnte als Ganzes nur mit Hilfe eines partiellen Duplexes (am 5'-Terminus von HSA 1) geklont werden.
- HSA II das große Fragment wurde als pHSAII aus den vorher geklonten DNA-Segmenten HSA (1-3) und HSA (4-6) gewonnen.
- HSA 15 Oligonukleotid konnte bei Erzielung der korrekten Folge nur mit Hilfe eines komplementären Oligonukleotids geklont werden, welches annähernd $\frac{2}{3}$ des ursprünglichen HSA 15 umfaßte.
- HSA 16 Oligonukleotid konnte nur mit Hilfe eines neuen Adapters (Adapter 2) geklont werden.
- HSA 17 Oligonukleotid konnte nicht in pHSA (13-16) geklont werden, um das erwartete pHSA (13-17) zu erhalten. Obwohl die HSA 17-Folge in den gewonnenen Plasmiden enthalten war, wurden Streichungen in den vorher geklonten Bereichen beobachtet. Daher wurde HSA 17 in pUC19 geklont.
- HSA 18 Oligonukleotid wurde mit Hilfe von Adapter 2 in pHSA 17 geklont.
- HSA IV das große Fragment wurde aus den vorher geklonten DNA-Segmenten HSA (13-16) und HSA (17-18) gewonnen.

Schema 10 - Polyklonungsbereich von pUC19 (oder M13mp19) in Verbindung mit den Folgebildungsprimern



Primer-Referenzen, Umkehrprimer: Hong, G.F. (1981) Bioscience Reports 1, 243-252. 17-mer Primer: Duckworth, M.L., Gait, M.J., Goelet, P., Hong, G.F., Singh, M. und Titmas, R.C. (1981), Nucleic Acids Res. 9, 1961-1706. pKO-Primer I: Simoncsits, A., Kálmán, M., Cserpán, I. und Kari, C. (1984) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. No. 14, 321-322.

Klonung von HSA 1 in pUC19

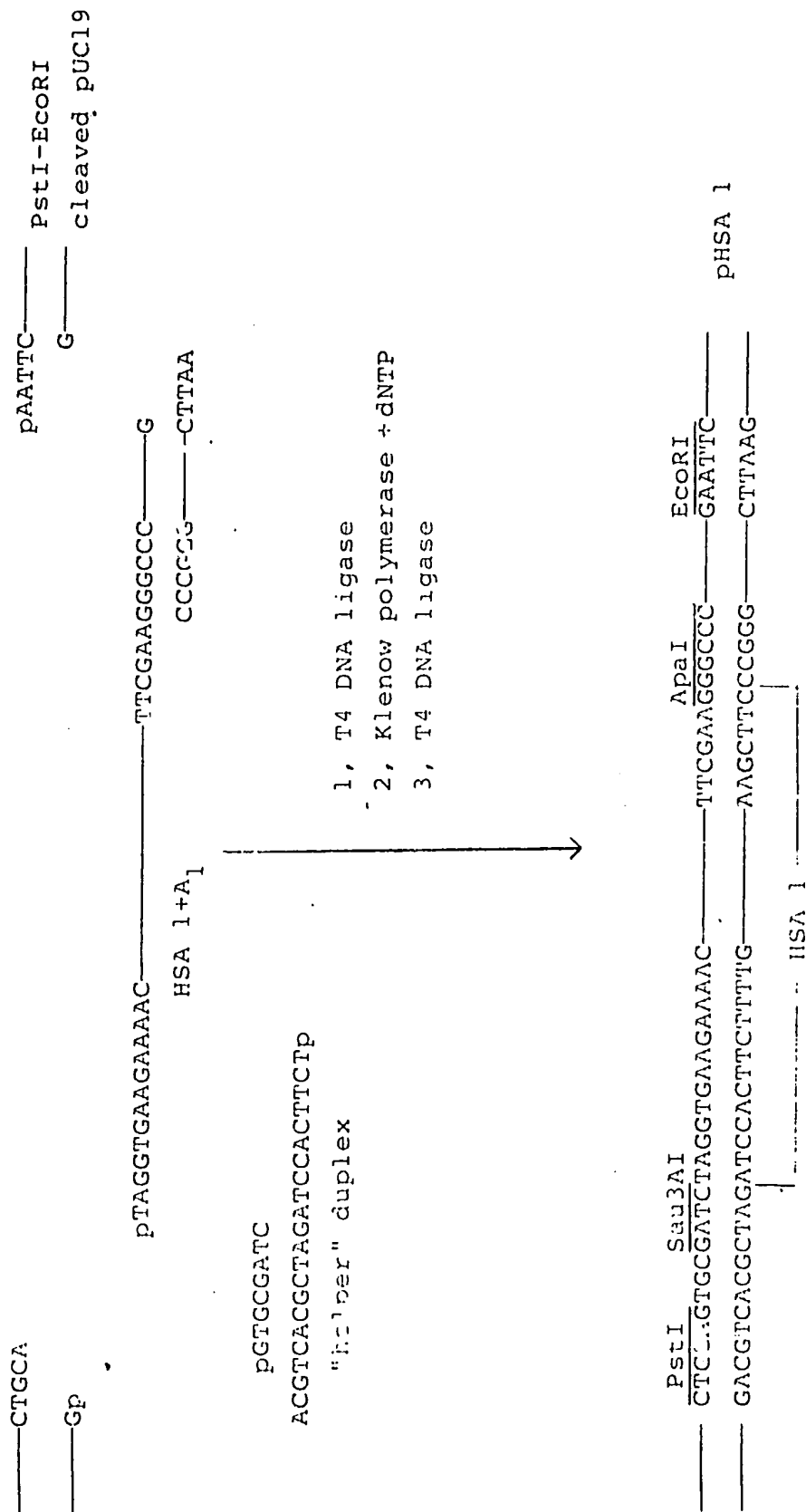
Als versucht wurde, das Oligonukleotid HSA 1, das mit dem Adapter 1 ligiert war (HSA 1 + A₁), in den BamHI-EcoRI-gespaltenen Vektor pUC19 zu klonen, wobei das oben ausführlich beschriebene Klonungsverfahren angewendet werden sollte, konnte nicht der vollständige HSA 1 Bereich in der geklonten Form erreicht werden. Es wurden etwa 50 Klone, hybridisierend mit dem 5'-³²P-markierten Oligonukleotid HSA 1, aufgereiht, und es wurde festgestellt, daß den meisten der Klone der 5'-Terminale A₁-Rest von HSA 1 fehlte (den übrigen fehlte mehr als ein Rest).

Es wurde dann eine neue Strategie angewendet, um die Klonung des vollständigen HSA 1-Oligonukleotids zu erreichen. Als ein Klonungsvektor wurde PstI-EcoRI-gespaltenes pUC19 verwendet, und in das Reaktionsgemisch wurde ein synthetischer, partieller Duplex einbezogen, mit einem PstI-haftenden Ende am 5'-Terminus und einem 10 Nucleotide langen, 5'-vorstehenden Bereich am 3'-Terminus, wobei dieser letztgenannte Bereich zur 5'-Terminalbereich von HSA 1 komplementär ist. Die Anwendung dieses „Helfer-Duplexes“ wird im Schema 11 gezeigt.

Es wurden 0,1 µg des PstI-EcoRI-gespaltenen pUC19-Vektors mit 5 pMol von HSA 1 + A₁, 5 pMol von 5'-phosphoryliertem GTGCGATC und 5 pMol von 5'-phosphoryliertem TCTTACCTAGATCGCACTGCA in einem Reaktionsvolumen von 10 µl gemischt, und das ganze Klonungsverfahren wurde im wesentlichen nach dem allgemeinen Verfahren durchgeführt.

Als Sonde wurden 100 Kolonien durch Hybridisierung mit dem 5'-markierten Oligonukleotid HSA 1 überprüft. Von den 20 positiven Klonen wurden 10 für die Folgebildung mit Hilfe des pKO-Primers 1 und des Umkehrprimers verwendet. Acht der 10 aufgereihten Klone enthielten die richtige Folge. Die Plasmid-DNA eines der richtigen Klone wurde im nächsten Schritt als pHSA 1 für die ApaI-EcoRI-Doppeldigestion und zum Klonen des Oligonukleotids HSA 2 verwendet.

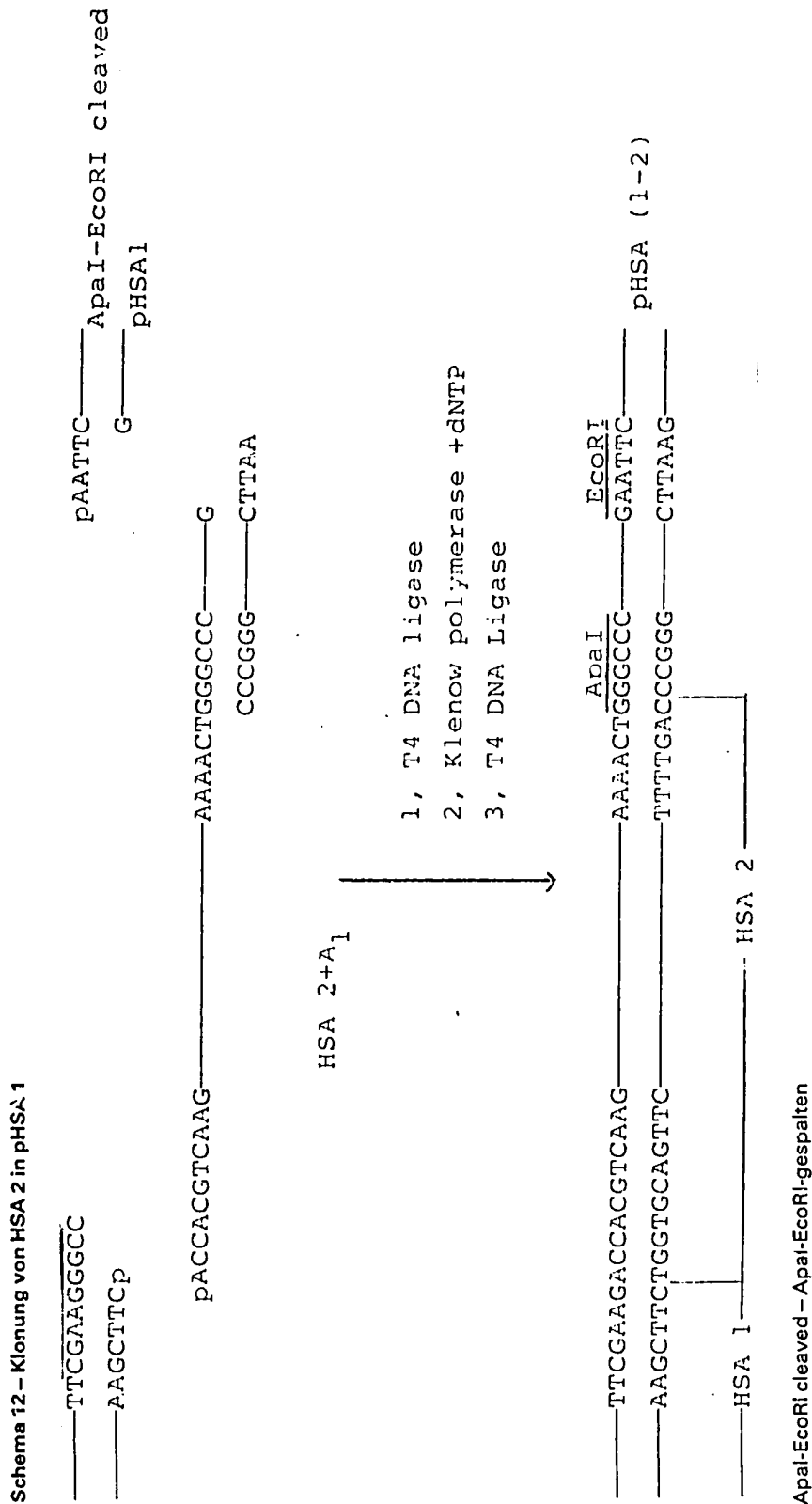
Schema 11



Klonung von HSA 2 in pHSA 1

Es wurden 0,1 µg von Apal-EcoRI-gespaltenem pHSA 1 mit 5 µMol HSA 2 + A₁ in 10 µl Reaktionsvolumen gemischt und die Klonungsschritte wie oben beschrieben ausgeführt (Schema 12).

40 Kolonien wurden replika-plattiert und mit dem 5'-³²P-HSA 2-Oligonukleotiden als S₁nde hybridisiert. Man erhielt 9 positive Kolonien, aus diesen wurde Plasmid-DNA hergestellt, und sie wurden unter Verwendung von pKO-Primer i aufgereiht. Fünf Klone enthielten die korrekte Folge HSA 2. Plasmid-DNA von einem der korrekten Klone (pHSA [1-2]) wurde im nächsten Schritt zum Klonen des Oligonukleotiden HSA 3 verwendet.

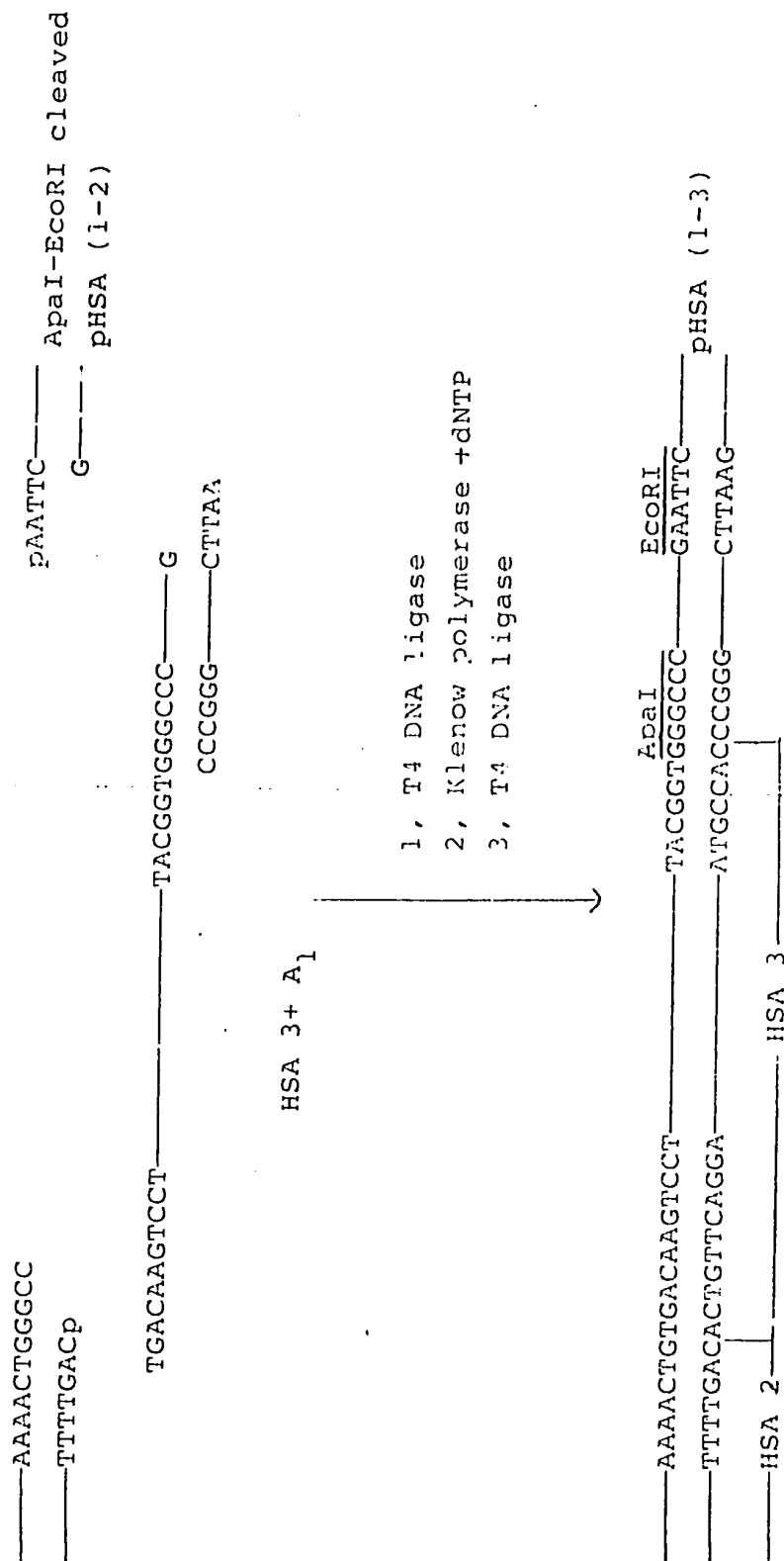


Schema 13

Klonung von HSA 3 in pHSA (1-2)

Es wurden 0,1 µg Apal-EcoRI-gespaltenes pHSA (1-2) mit 5 pMol HSA 3 + A₁ in 10 µl Reaktionsvolumen reagiert, wie das oben beschrieben wurde (Schema 13).

Es wurden 187 Kolonien replika-plattiert und mit einer 5'-³²P-HSA 3-Oligonukleotidsonde hybridisiert. Von den 42 positiven Klonen wurden 10 für die Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, und sie wurden unter Verwendung des pKO-Primers I aufgereiht. Ein Klon war korrekt, und das daraus gewonnene Plasmid wurde als pHSA (1-3) bezeichnet. pHSA (1-3) wurde später zum Klonen des HSA (4-6)-DNA-Segmentes verwendet (siehe unten).

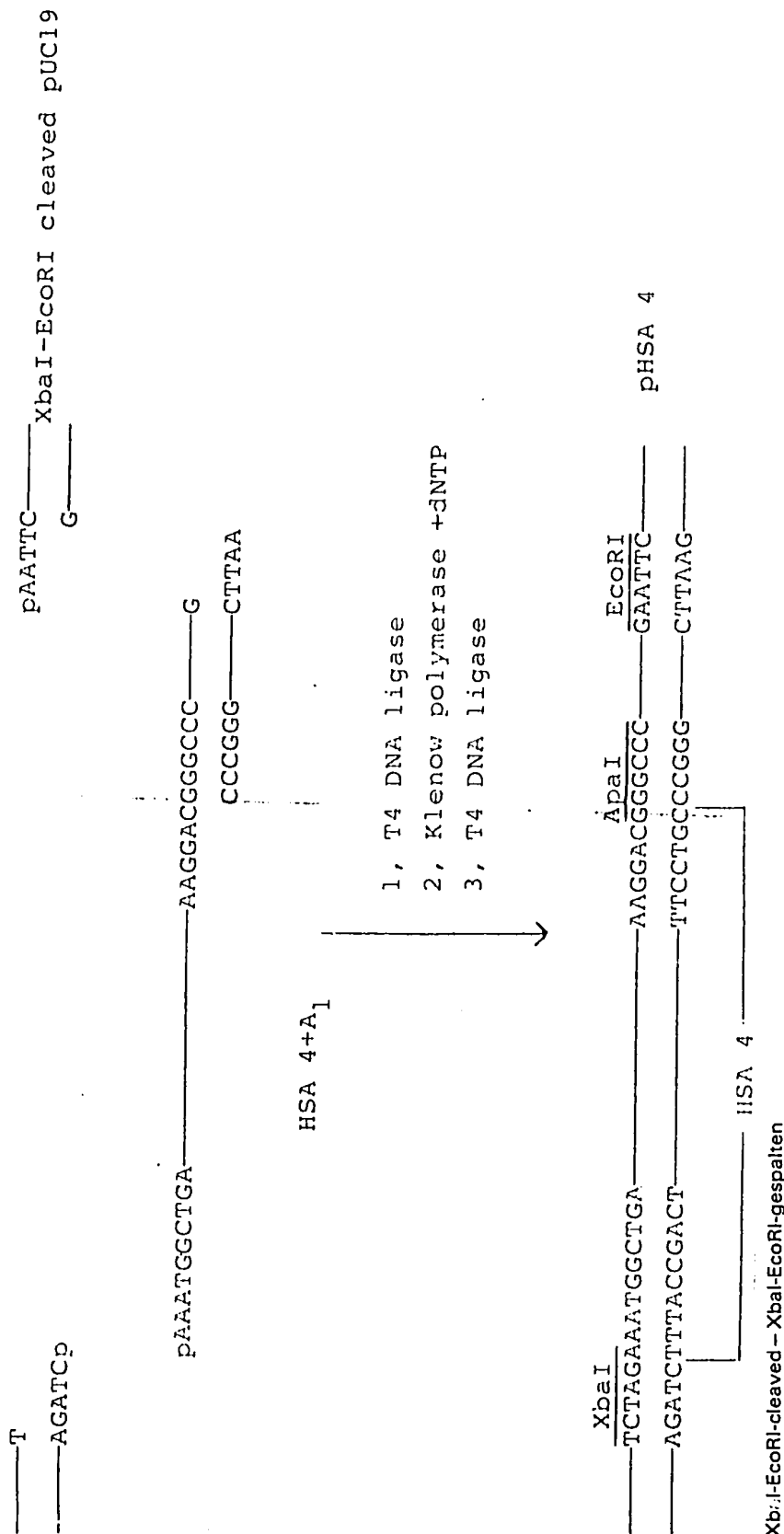


Klonung von HSA 4 in pUC19

In 10 µl Reaktionsvolumen wurden, wie oben beschrieben, 0,1 Mikrogramm XbaI-EcoRI-gespaltener pUC19 und 5 pMol HSA 4 + A₁ reagiert (Schema 14).

Es wurden 110 Kolonien genommen, von denen 45 eine Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA 4-Oligonukleotidsonde aufwiesen. Von 4 positiven Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt, und alle 4 enthielten die korrekte HSA 4-Folge und die erwarteten Flankierungsbereiche. Das so gewonnene pHSA4 enthielt die regenerierte XbaI-Stelle am 5'-Terminus von HSA 4, die später am Verbindungspunkt zwischen HSA 3- und HSA 4-Oligonukleotid ausgeschaltet werden konnte. pHSA4 wurde im nächsten Schritt zum Klonen von HSA 5 verwendet.

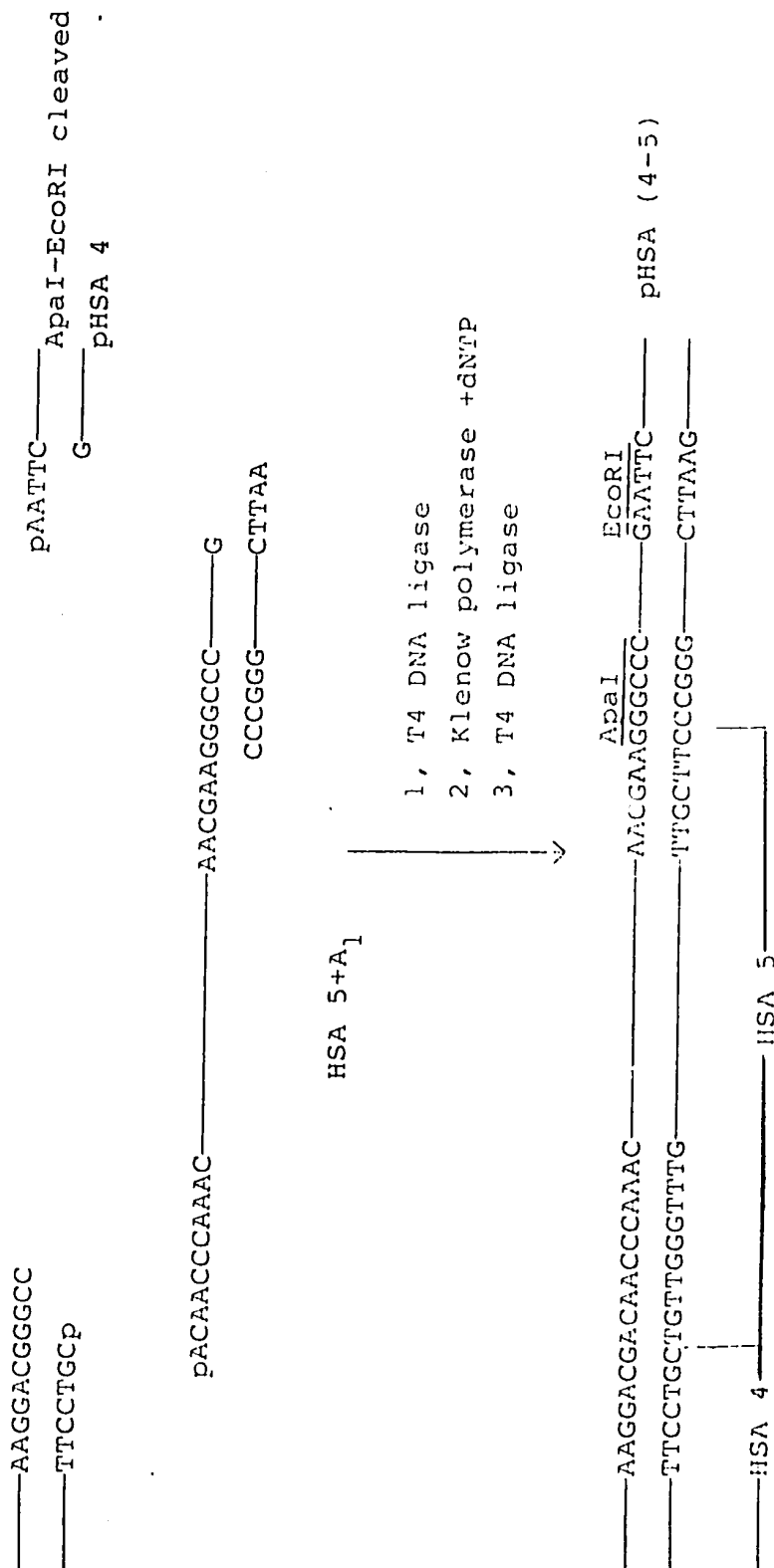
Schema 14



Schema 15

Klonung von HSA 5 in pHSA4

Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg Apal-EcoRI-gespaltenes pHSA4 und 5 pMol HSA 5 + A₁ reagiert (Schema 15). Es wurden 65 Kolonien mit 5'-³²P-HSA 5-Oligonukleotidsonde hybridisiert, und 3 davon erwiesen sich als positiv. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt, wovon eine korrekt war, diese wurde als pHSA (4-5) bezeichnet und im nächsten Schritt zum Klonen von HSA 6 verwendet.

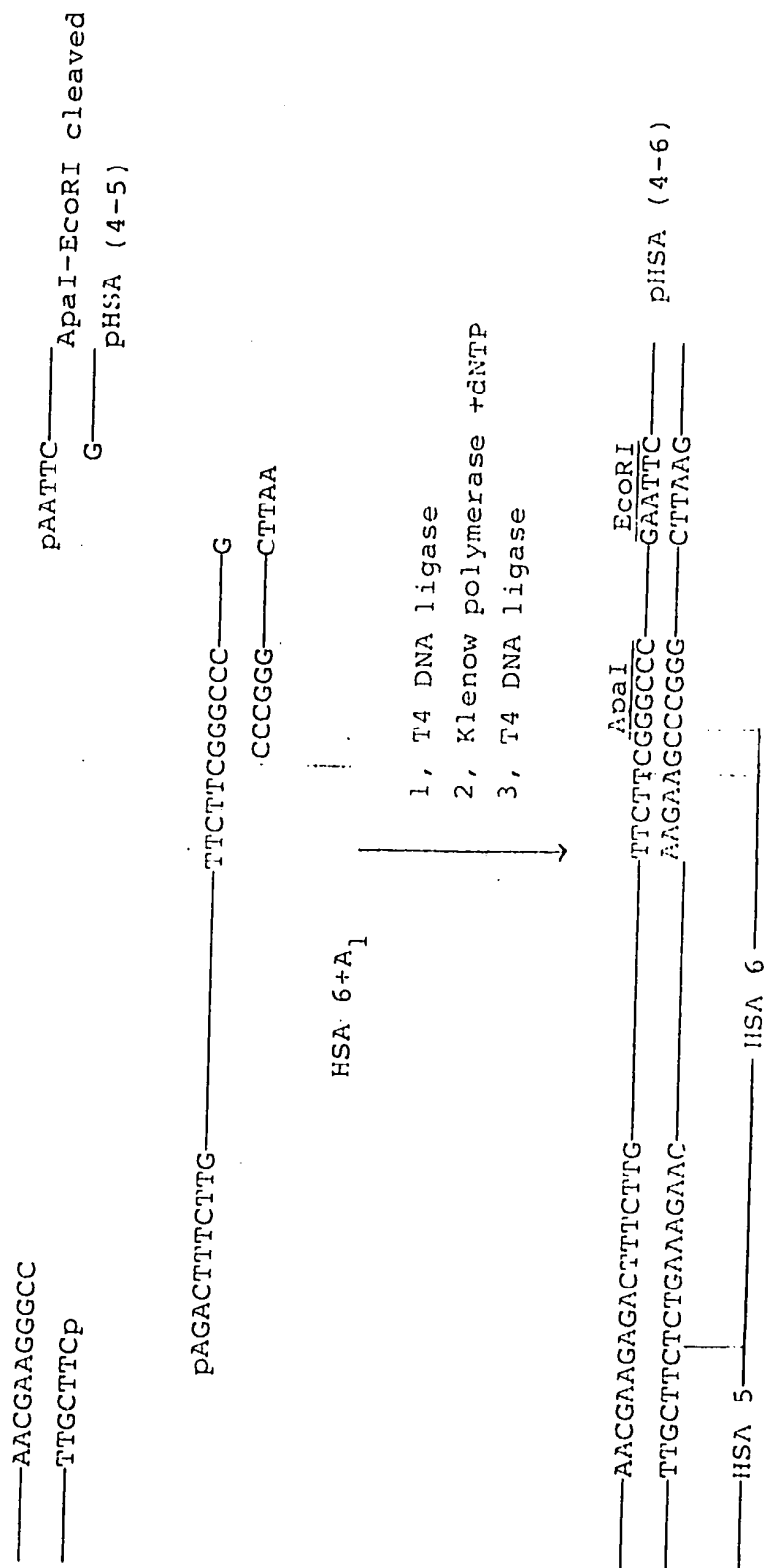


Schema 16

Klonung von HSA 6 in pHSA (4-5)

Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg Apal-EcoRI-gespaltenes pHSA (4-5) und 5 pMol HSA 6 - A₁ reagiert (Schema 16).

Es wurden 225 Kolonien repliziert und mit der 5'-³²P-HSA 6-Oligonukleotidsonde hybridisiert. Es erwiesen sich 72 als positiv, von denen 10 zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet werden. Von den 10 aufgereihten Plasmiden (Verwendung des pKO-Primers I) enthielten 2 die korrekte HSA 6-Folge, eines dieser Plasmide wurde als pHSA (4-6) bezeichnet. pHSA (4-6) wurde später zum Gewinnen von HSA (4-6)-DNA-Segment verwendet, das in pHSA (1-3) geklont wurde, um pHSA (1-6) oder pHSA II zu erhalten.



Klonung von HSA 7 in pUC 19

Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg XbaI-EcoRI-gespaltenes pUC 19 und 5 pMol HSA 7 + A₁ reagiert (Schema 17). Die HSA 7-haltigen Klone wurden nach einer Farbreaktion ausgewählt. Nach der Transformation wurden die transformierten Zellen bei Vorhandensein von IPTG (IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) und X-Gal (X-Gal: 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-galaktosid) (Vieira, J. und Messing, J. [1982], Gene 19, 259–268) plattiert. Es wurde erwartet, daß weiße Kolonien auf blauem Hintergrund die korrekte HSA-Folge enthielten.

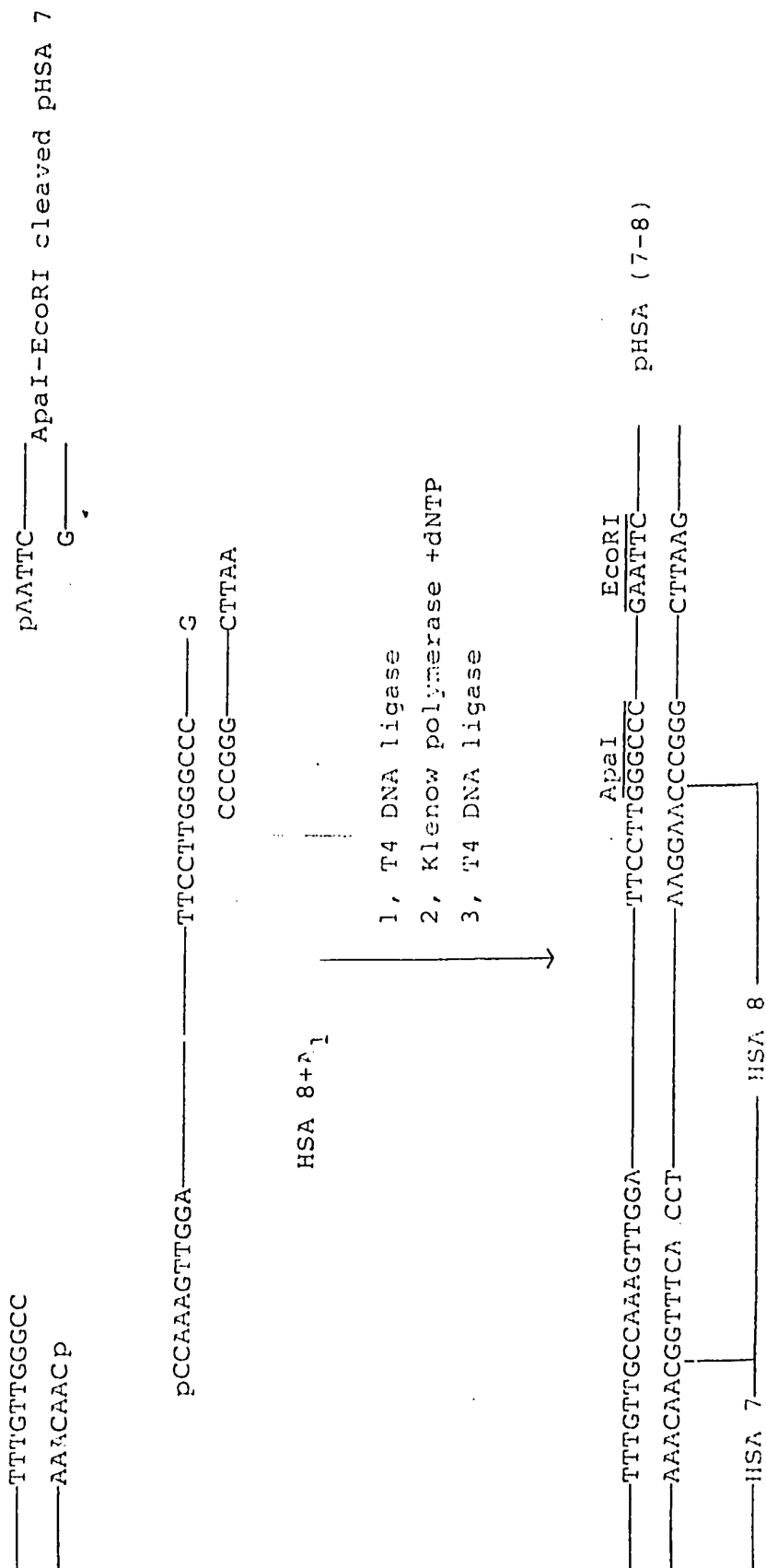
Zehn willkürlich herausgegriffene weiße Kolonien wurden in LB-Ampizillin-Medium inokuliert, und die aus diesen hergestellte Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des pKO-Primers I aufgereiht. Von diesen enthielten 7 die korrekte HSA-Folge, und eine wurde später als pHSA 7 zum Klonen von HSA 8 im nächsten Schritt verwendet.

Das Oligonukleotid HSA 7 als das erste Oligonukleotid des Fragments HSA III enthält eine zusätzliche GGTAC-5'-Terminalfolge, die eingeführt wurde, um diese Folge, welche zusammen mit dem nächsten C-Rest eine KpnI-Stelle bildet, zum Verbinden des großen Fragments HSA III mit dem großen Fragment HSA II verwenden zu können. Diese zusätzliche Folge sollte nach der Ausführung der relevanten Reaktionen verschwinden, deshalb wird diese Folge nicht als Teil von HSA 7 einbezogen, wenn sie bereits in pHSA 7 geklont ist, wie das im Schema 17 gezeigt wird.

Schema 18

Klonung von HSA 8 in pHSA 7

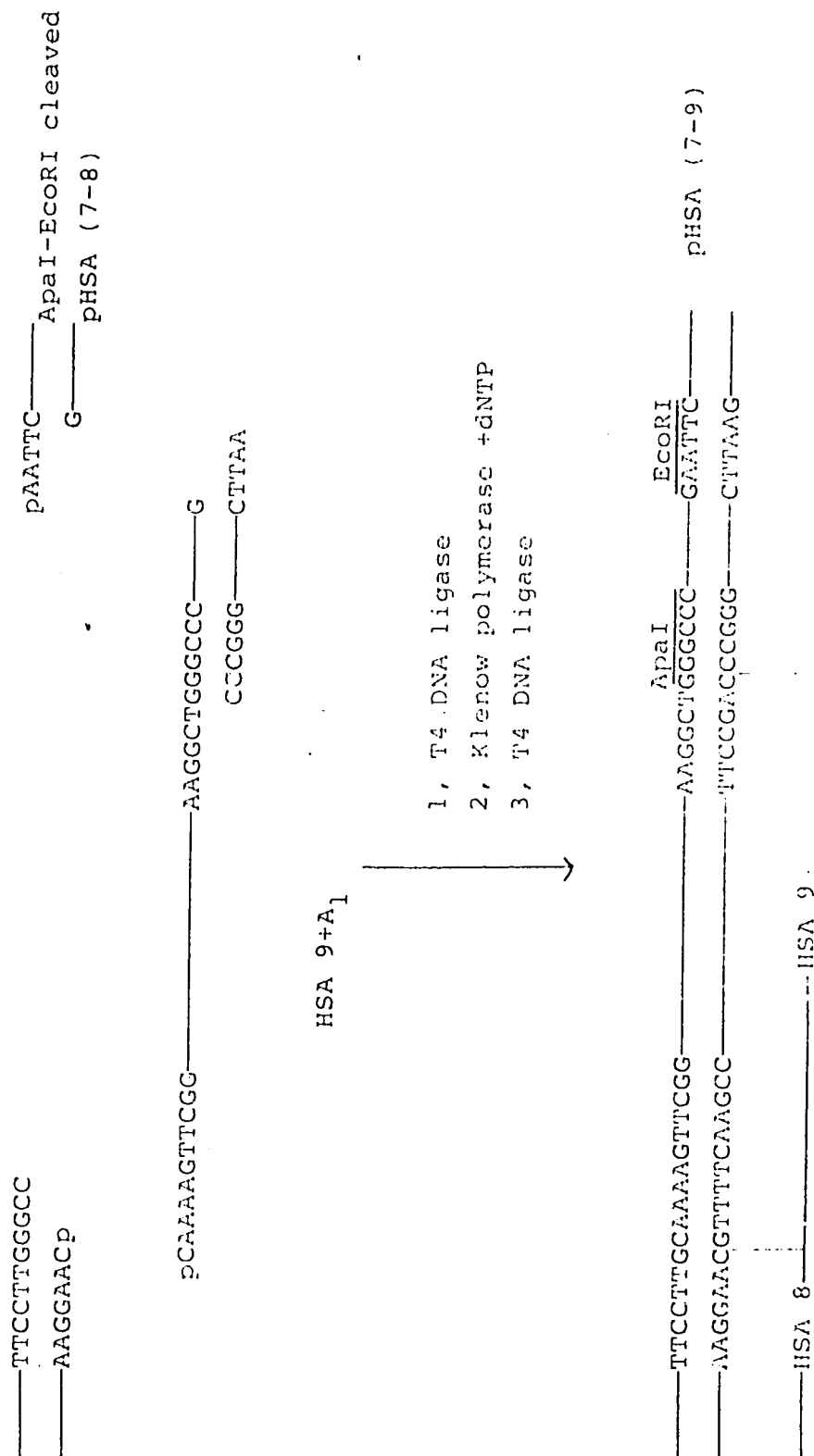
Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg Apal-EcoRI-gespaltenes pHSA 7 mit 5 pMol HSA 8 + A₁ reagiert (Schema 18). Mit der Hybridisierungssonde 5'-³²P-HSA 8 wurden 240 Kolonien geprüft, von denen 6 positiv waren. Von diesen wiesen 2 nach der Folgebildung mit dem pKO-Primer I die korrekte HSA 8-Folge auf. Die Plasmid-DNA eines korrekten Klon wurde der allgemeinen Klonungsstrategie als pHSA (7-8) unterzogen, um HSA 9 im nächsten Schritt zu klonen.



Schema 19

Klonung von HSA 9 in pHSA (7-8)
Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg ApaI-EcoRI-gespaltenes pHSA (7-8) und 5 pMol HSA 9 + A₁ reagiert (Schema 19).

Es wurden 240 Kolonien replika-plattiert und mit der Oligonukleotidsonde 5'-³²P-HSA 9 hybridisiert. Aus 8 der 13 positiven Klone wurde Plasmid-DNA hergestellt und diese aufgereiht. Drei der 8 aufgereihten Klone enthielten das korrekte Plasmid pHSA (7-9).

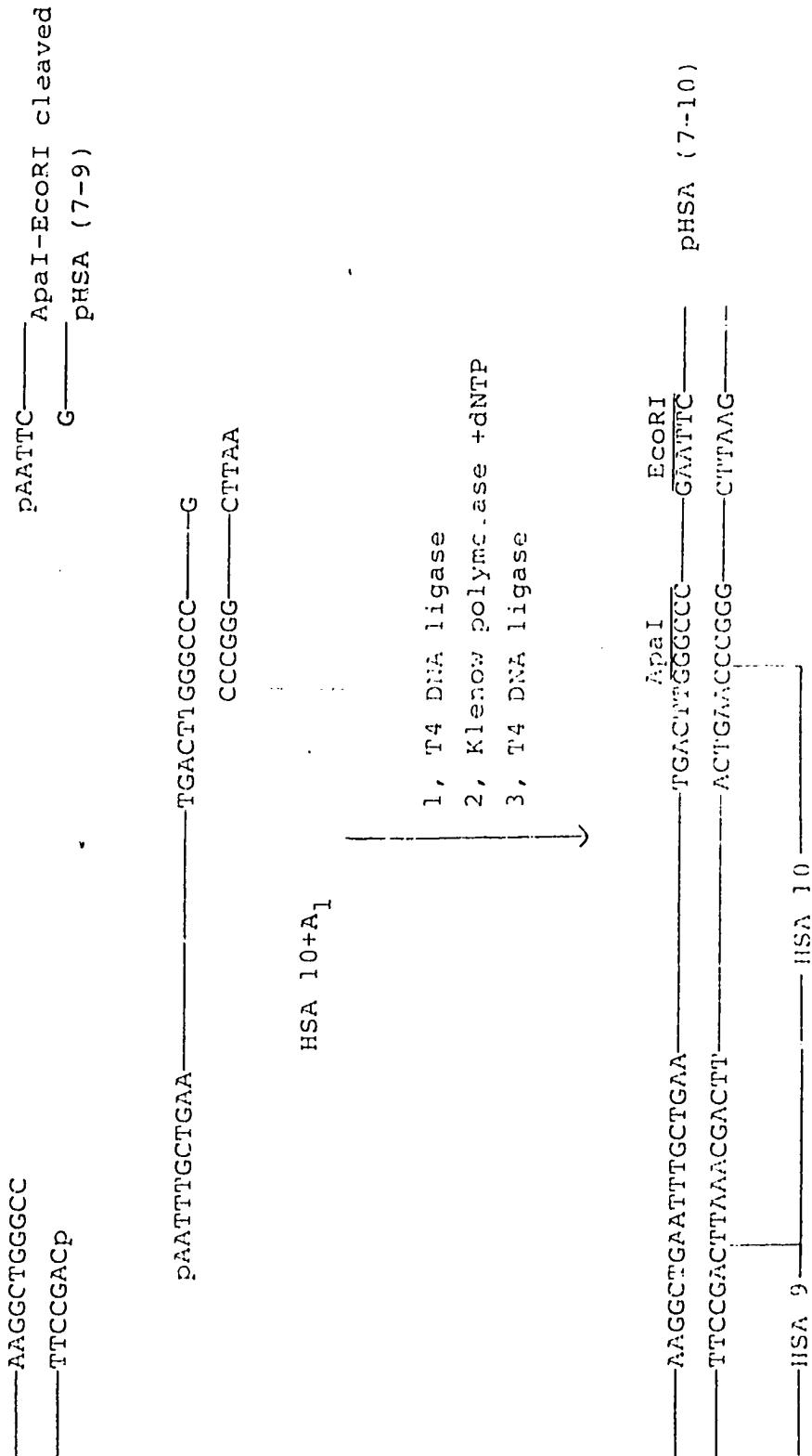


Schema 20

Klonung von HSA 10 in pHSA (7-9)

Auf die übliche Weise wurden 0,1 µg ApaI-EcoRI-gespaltenes pHSA (7-9) und 5 pMol HSA 10 + A₁ reagiert (Schema 20).

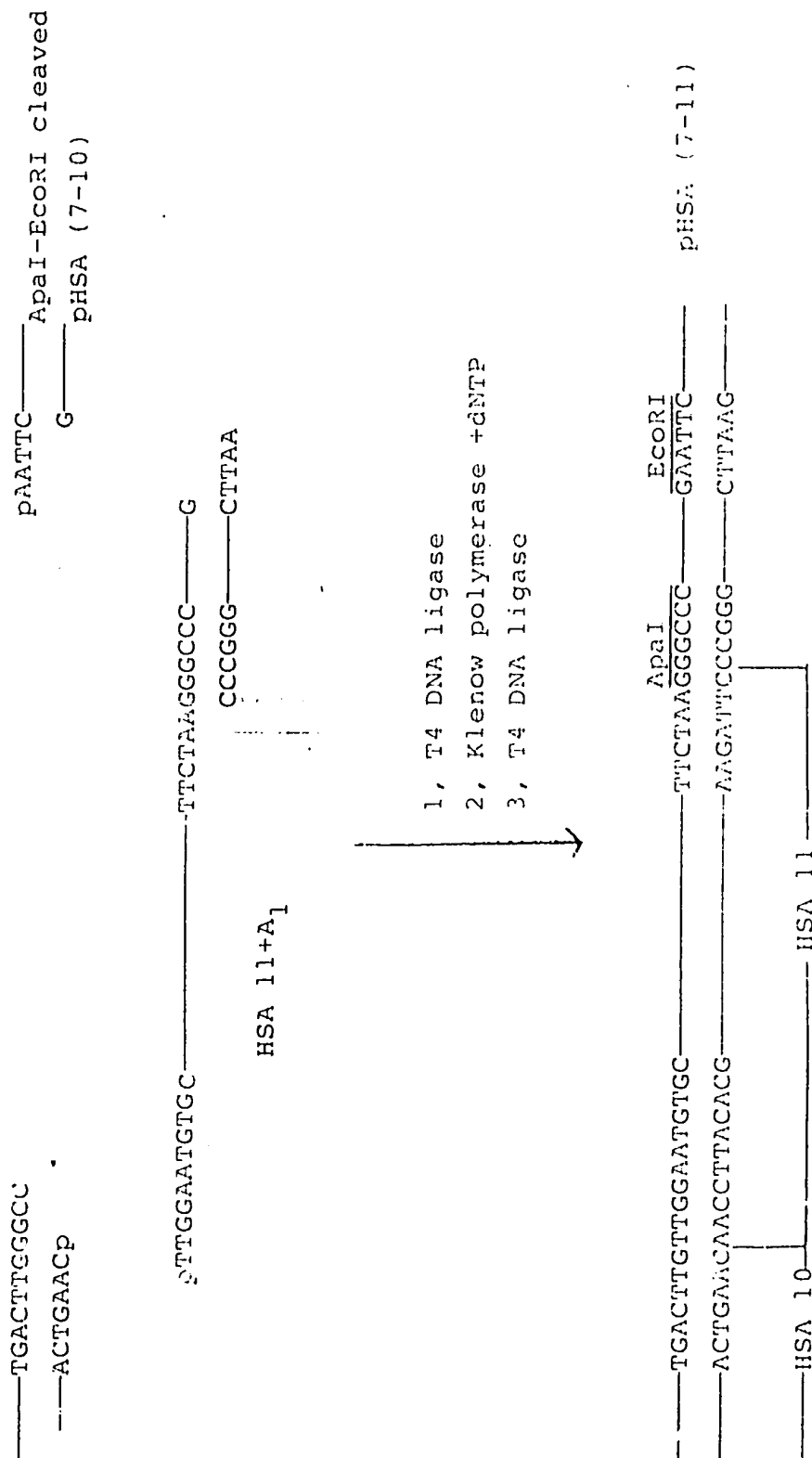
Von 202 Kolonien wiesen 58 eine Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde 5'-³²P-HSA 10 auf. Zehn positive Klone wurden dazu genutzt, Plasmid-DNA zur Folgebildung herzustellen, von denen 8 die richtige Folge pHSA (7-10) enthielten.



Schema 21

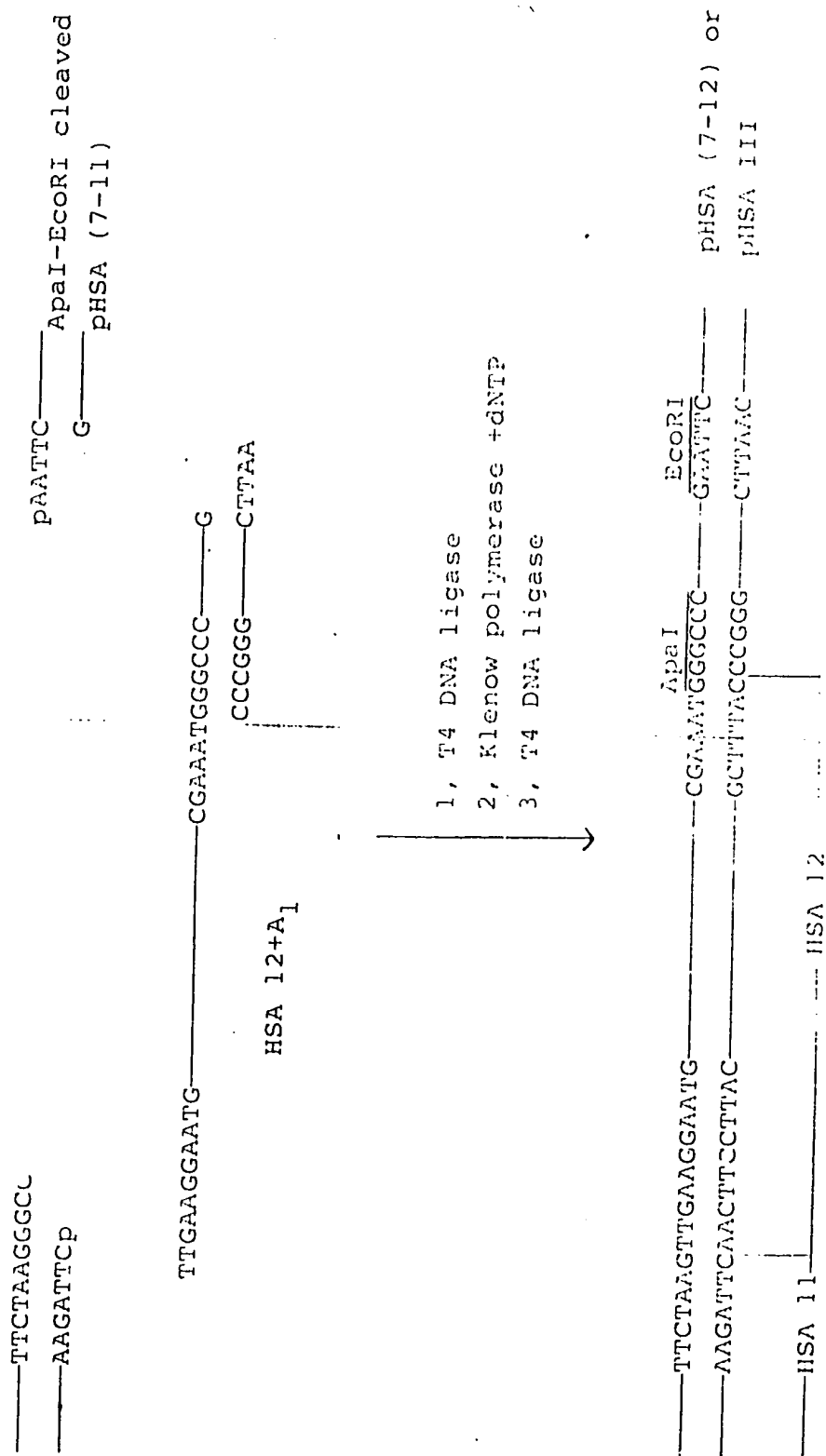
Klonung von HSA 11 in pHSA (7-10)

Auf die übliche Weise wurden 0,1 µg ApaI-EcoRI-gespaltenes pHSA (7-10) und 5 pMol HSA 11 + A₁ reagiert (Schema 21). Es wurden 160 Kolonien replika-plattiert, und 9 davon erwiesen sich nach dem Hybridisieren mit der Oligonukleotidsonde 5'-³²P-HSA 11 als positiv. Die von den positiven Klonen gebildeten Plasmide wurden unter Verwendung des pKO-Primers I aufgereiht. Es wurde festgestellt, daß ein Klon die erwartete Folge enthielt, und die aus diesem Klon hergestellte Plasmid-DNA wurde im nächsten Schritt als pHSA (7-11) verwendet.



Schema 22

Klonung von HSA 12 in pHSA (7-11)
 Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg ApaI-EcoRI-gespaltenes pHSA (7-11) mit 5 pMol HSA 12 + A₁ reagiert (Schema 22).
 Es wurden 240 Klone geprüft, von denen sich 11 nach der Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde 5'-³²P-HSA 12 als positiv erwiesen. Zwei von 10 aufgereihten (pKO-Primer I) Plasmid-DNA schienen korrekt zu sein, von denen eine später als pHSA (7-12) oder pHSA III, d. h., das große HSA III enthaltende Fragment verwendet wurde.
 Die Folge von HSA (7-12) oder des HSA III-Fragmentes wurde durch Folgebildung in den Vektoren M13mp 19 und mp 18 bestätigt. pHSA III wurde mit PstI und EcoRI gespalten, das kleine Fragment wurde isoliert und in PstI-EcoRI-gespaltenen Vektoren M13mp 18 und mp 19 geklont. Aus den Rekombinanten wurde einsträngige Phag-DNA hergestellt, und sie wurden unter Verwendung des 17-mer Primers aufgereiht.



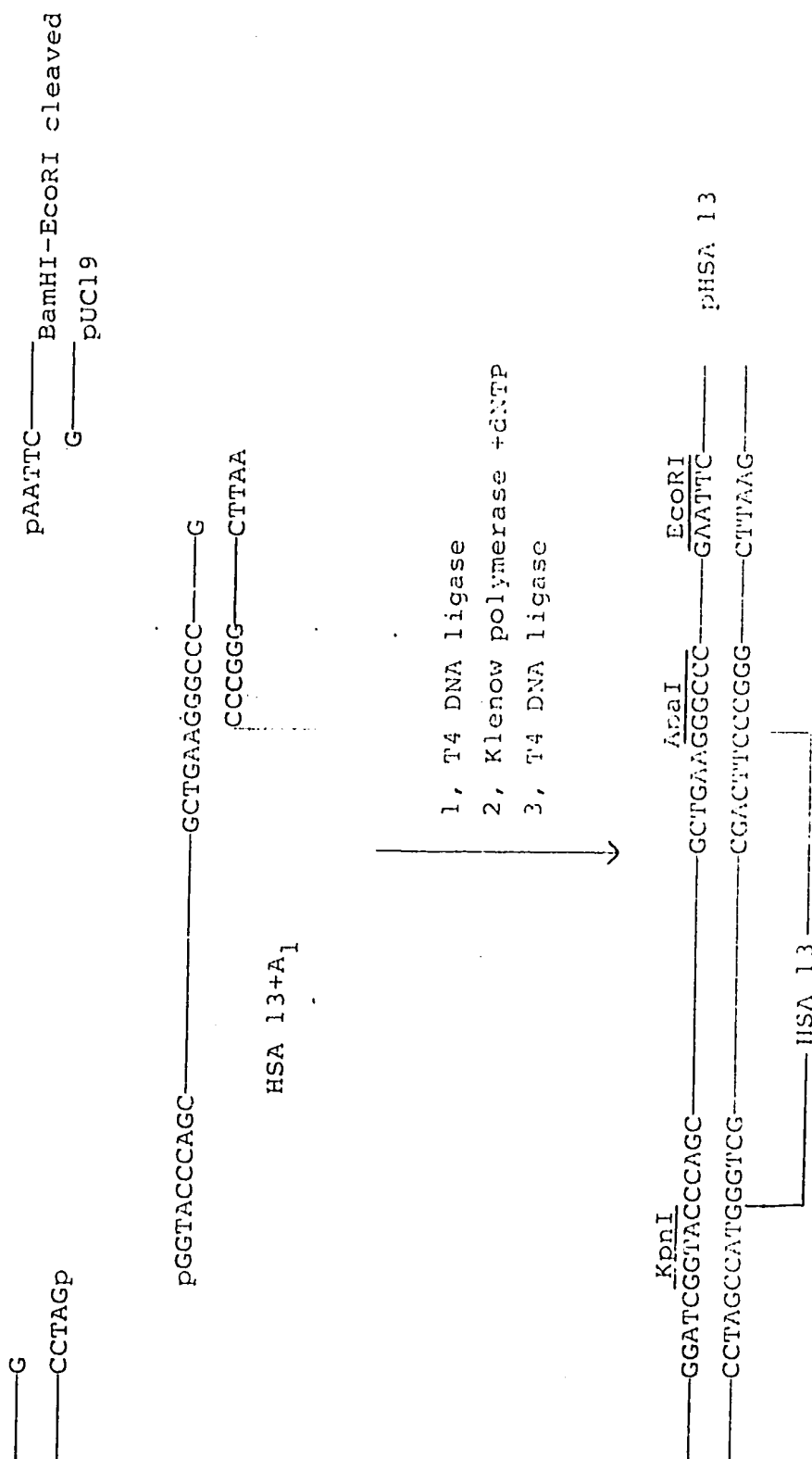
Schema 23

Klonung von HSA 13 in pUC 19

Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg BamHI-EcoRI-gespaltenes pUC 19 und 5 pMol HSA 13 + A₁ reagiert (Schema 23).

Durch Hybridisierung mit der Sonde 5'-³²P-HSA 13 wurden 80 Klone geprüft, von denen sich 14 als positiv erwiesen. Aus 10 positiven Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt und unter Verwendung von pKO-Primer I aufgereiht. Sechs davon waren mit dem erwarteten Plasmid pHSA 13 identisch.

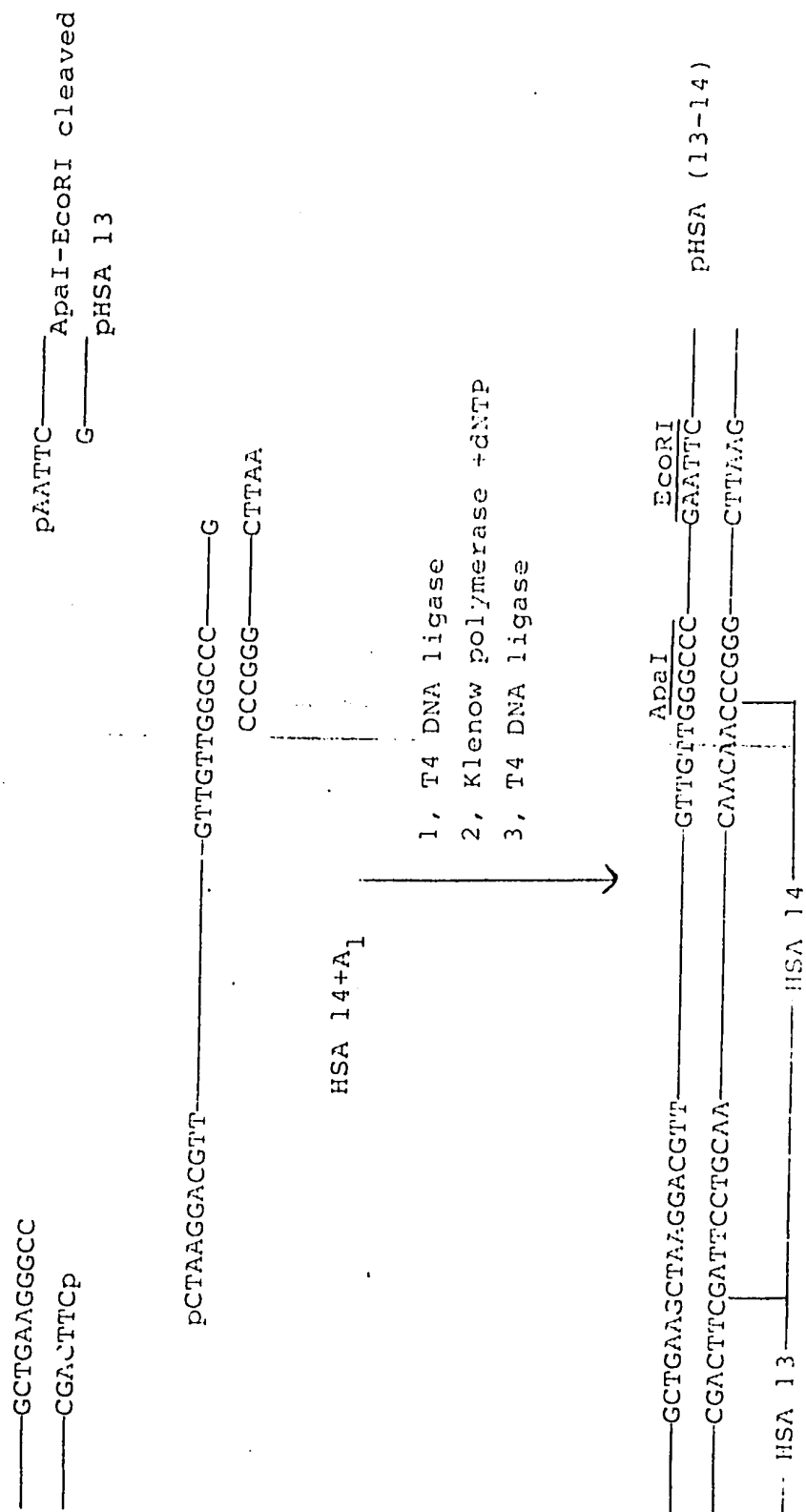
Das Oligonukleotid HSA 13 enthält, wie HSA 7, die zusätzliche GGTAAC-5'-Terminalfolge, da dieses Oligonukleotid das erste im großen Fragment HSA IV ist. In diesem Fall wurde auch eine Kpn I-Stelle gebildet, die später zur Verbindung der großen Fragmente HSA III und HSA IV verwendet werden kann, so daß diese zusätzliche Folge an der Verbindungsstelle entfällt. pHSA 13 wurde im nächsten Schritt zum Klonen von HSA 14 verwendet.



Klonung von HSA 14 in pHSA 13

Nach dem allgemeinen Verfahren wurden 0,1 µg Apal-EcoRI-gespaltenes pHSA 13 mit 5 pMol HSA 14 + A₁ reagiert (Schema 24). Zwei der 160 durch Hybridisierung mit 5'-³²P-HSA 14 geprüften Klone waren positiv. Nach der Plasmidherstellung und der Folgebildung durch pKO-Primer I enthielt eine der beiden Plasmid-DNA die erwartete Folge. Sie wurde als pHSA (13-14) bezeichnet und im nächsten Schritt verwendet.

Schema 24



Klonung von HSA 15 in pHSA (13-14)

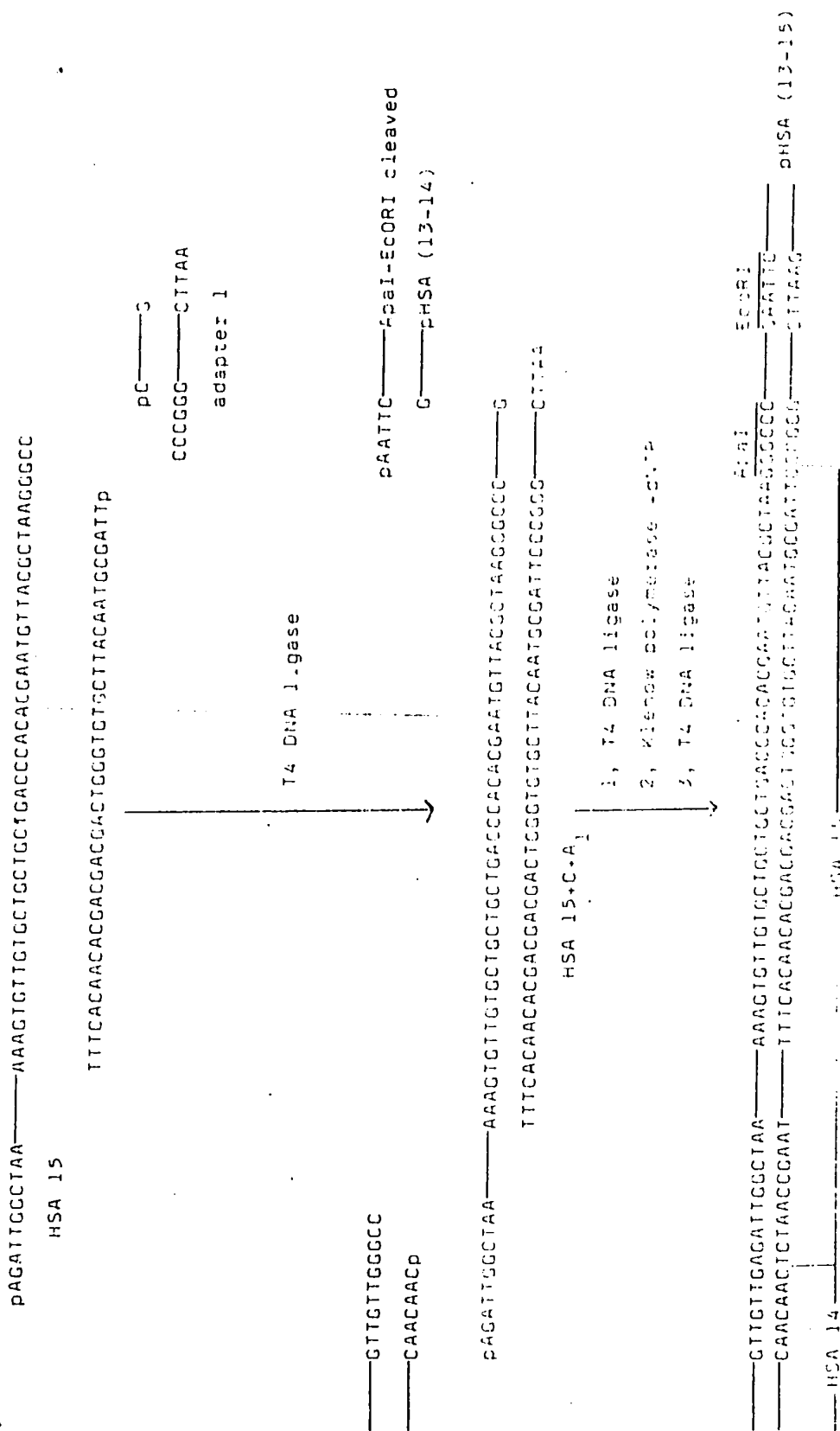
Bei dem Versuch, HSA 15 + A₁ nach dem allgemeinen Verfahren in das Apal-EcoRI-gespaltene pHSA (13-14) zu klonen, erhielt man eine große Zahl von Kolonien, die mit 5'-³²P-HSA 15 hybridisieren, aber nach der Folgebildung der Plasmide konnte die erwartete HSA-15-Folge nicht festgestellt werden. Man erhielt stattdessen ein doppelt-mutiertes HSA 15, bei dem an den Nukleotidpositionen 1072 und 1096 (Nukleotidpositionen in der reifen HSA-Genfolge) G->T-Mutation auftrat. Diese G-Reste wurden von T-Resten umschlossen. Die Möglichkeit, daß diese offenkundigen Mutationen nur auf zweideutige Gel-Ablesungen zurückzuführen waren, wie das manchmal bei der Verwendung eines Plasmid-DNA-Templats der Fall ist, konnte nach dem erneuten Klonen des interessierenden Bereichs in den M 13mp 19-Phagvektor ausgeschlossen werden. Da diese beiden Mutationen gleichzeitig in allen Fällen (es wurden 19 verschiedene positive Klone getestet) auftraten, mußte in diesem Fall die allgemeine Klonungsstrategie dahingehend geändert werden, daß ein komplementäres Oligonukleotid, das die Stellen der Mutationen in HSA 15 umfaßt, eingesetzt wurde.

Es wurde ein 42-meres, komplementäres Oligonukleotid hergestellt und in das Ligationsgemisch von 5'-Phosphat-HSA 15 einbezogen, ebenso wie Adapter 1. Es wurden 50 pMol von 5'-³²P-HSA 15 mit 100 pMol 5'-Phosphat-42-mer, 100 pMol 5'-Phosphadapter 1, oberer Strang, und 100 pMol 5'-Hydroxyladapter 1, unterer Strang, gemischt. Der partielle Duplex wurde, wie das oben beschrieben wurde, nach der Gel-Elektrophorese isoliert und ergab eine Ausbeute von 30% auf der Grundlage von HSA 15. Dieser partielle Duplex wird im Schema 25 als HSA 15 + C + A₁ bezeichnet.

Anschließend wurden 0,1 µg des Apal-EcoRI-gespaltene pHSA (13-14) mit 5 pMol HSA 15 + C + A₁ reagiert, wobei die Reaktionen nach dem allgemeinen Verfahren ausgeführt wurden. Durch die 5'-³²P-HSA 15-Sonde wurden 340 Klone getestet, und von den 17 positiven Klonen wurden 12 zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet. Sie wurden aufgereiht (pKC-Primer I), und 2 davon enthielten die erwartete Folge HSA 15. Diese Folge wurde durch erneutes Klonen des so gewonnenen Bereiches HSA (13-15) in den Phagvektor M 13mp 19 und durch Ausführung von Folgebildungsreaktionen an der einsträngigen DNA-Schablone bestätigt.

Eines der richtigen Plasmide wurde als pHSA (13-15) im nächsten Schritt eingesetzt.

Schema 25

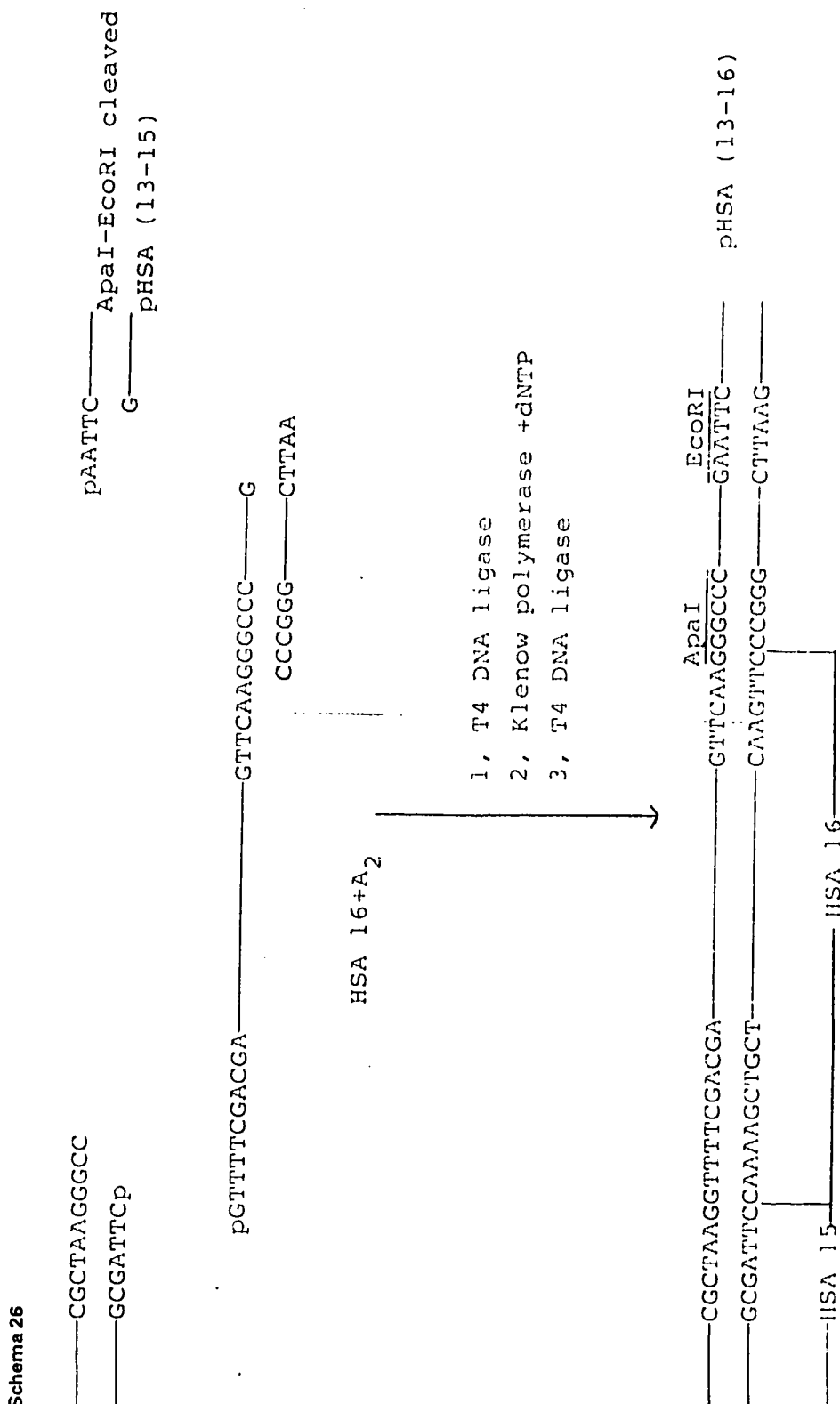


Klonierung von HSA 16 in pHSA (13-15)

Wenn HSA 16 + A₁ in Apal-EcoRI-geschnittene pHSA (13-15) kloniert wurde, hatten alle 16 sequenzierten positiven Klone eine 9-Basenpaardeletion am 5'-Terminus des HSA-16-Bereichs. Die erneute Untersuchung der Sequenz HSA 16 zeigte, daß ihr 5'-Terminalbereich und der 5'-Terminalbereich des unteren Strangs von Adapter 1 annähernd perfekt komplementär waren. Vorgesehen war die Verwendung eines anderen Apal-EcoRI-Adapters ohne diesen komplementären Bereich (Adapter 2, siehe Schema 3). HSA-Oligonukleotide wurden mit Adapter 2 auf genau die gleiche Weise wie mit Adapter 1 ligiert.

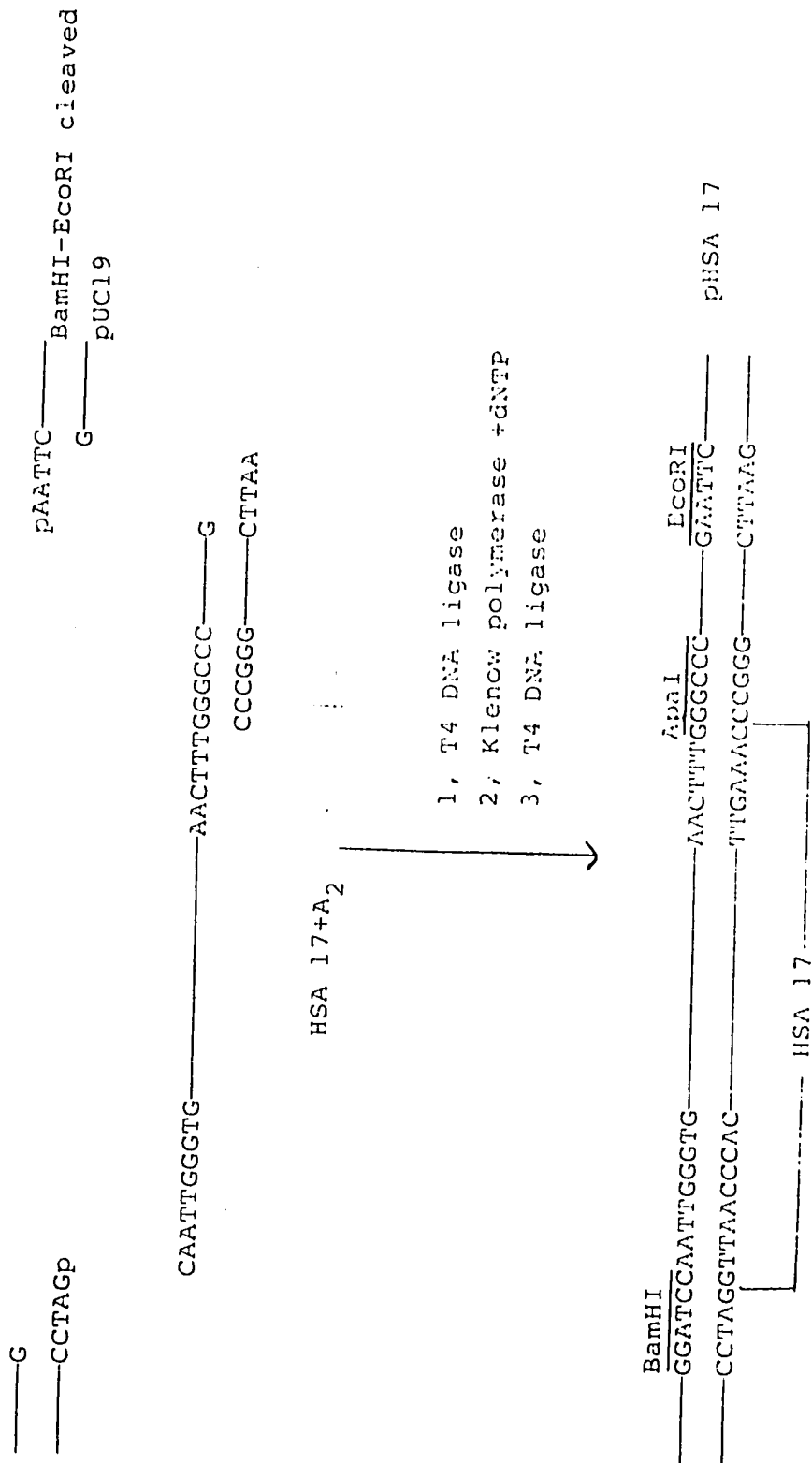
Es wurden 0,1 µg von mit Apal-EcoRI geschnittenem pHSA mit 5 pMol HSA 16 + A₂ nach dem allgemeinen Verfahren reagiert. Von 60 Klonen waren nach der Hybridisierung mit einer 5'-³²P-HSA-16-Sonde 24 positiv. Zehn der positiven Klone wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, sie wurden mit dem pKO-Starter I sequenziert, und zwei davon erwiesen sich als das erwartete pHSA (13-16).

pHSA (13-16) wurde später zur Herstellung des HSA (13-16)-DNA-Bereiches verwendet, der in pHSA (17-18) kloniert wurde, um pHSA (13-18), d. h., pHSA IV, zu erhalten.



Schema 27

Klonierung von HSA 17 in pUC19
 Es wurden 0,1 µg mit Bam HI-Eco RI geschnittenes uPUC 19 mit 5pMol HSA 17 + A₂ auf die übliche Weise reagiert (Schema 27).
 Durch Hybridisierung mit 5'-³²P-HSA 17 wurden 160 Klone getestet. Davon waren 30 positiv, und aus 8 von diesen wurden
 Plasmide hergestellt. Zwei Klone enthielten das erwartete Plasmid pHSA 17 nach den Sequenzdaten (pKO-Starter I).

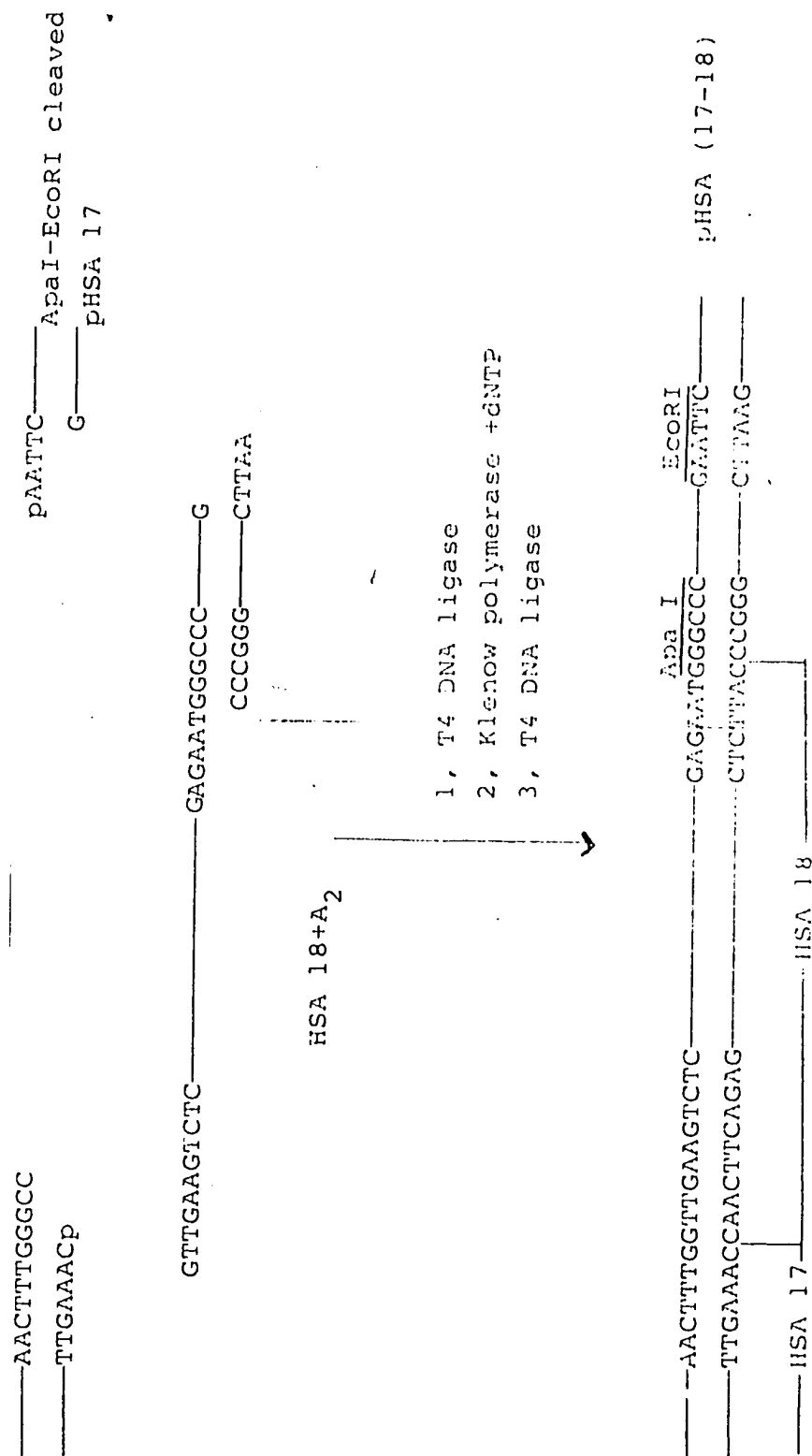


Schema 28

Klonierung von HSA 18 in pHSA 17

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA 17 mit 5 pMol HSA 18 + A₂ reagiert (Schema 28)

Von den 160 durch Hybridisierung mit einer 5'-³²P-HSA 18-Sonde getesteten Klonen waren 24 positiv. Aus 4 der positiven Klone wurde Plasmid-DNA hergestellt, die Sequenzierung erfolgte mit pKO-Starter I. Zwei Klone enthielten das korrekte Plasmid pHSA (17-18).



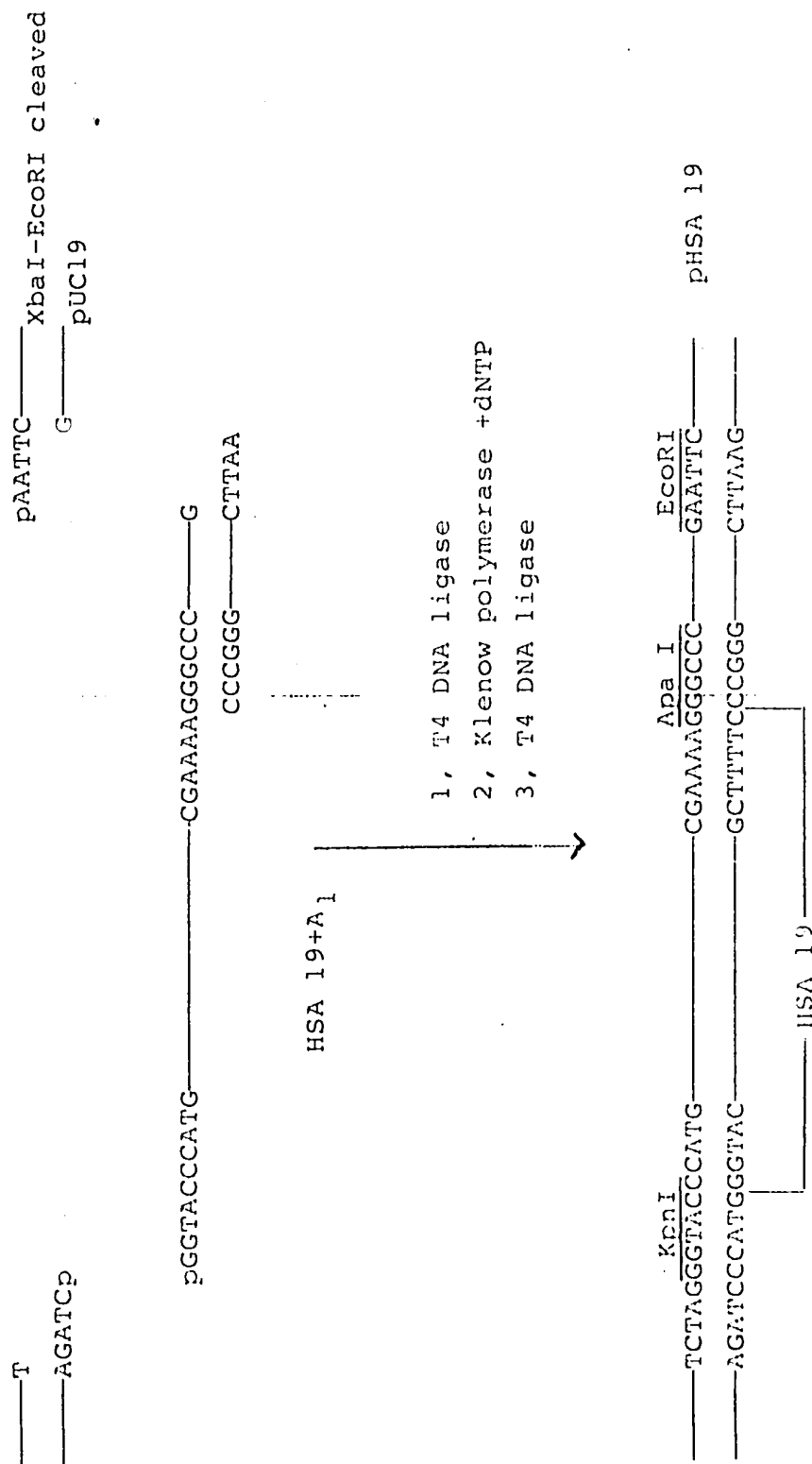
Klonierung von HSA 19 in pUC19

Es wurden 0,1 µg mit Xba I-Eco RI geschnittenes pUC19 mit 5pMol HSA 19 + A₁ nach dem allgemeinen Verfahren reagiert (Schema 29).

Transformierte JM101-E. coli-Zellen wurden auf eine LD-Ampizillinplatte bei Vorhandenseins von X-Gel und IPTG plattiert, wie das für pHSA7 beschrieben wurde. Es wurde Plasmid-DNA von 6 willkürlich herausgegriffenen weißen Kolonien hergestellt und unter Verwendung des pKO-Starters I sequenziert. Zwei von ihnen erwiesen sich als das korrekte pHSA 19.

HSA 19 enthält, wie HSA7 und HSA13, die zusätzliche GGTAC-Folge am 5'-Terminus. Diese Sequenz erleichtert, wie oben beschrieben wurde, die Verbindung des großen Fragmentes HSAV mit HSAIV (siehe auch unten).

Schema 29

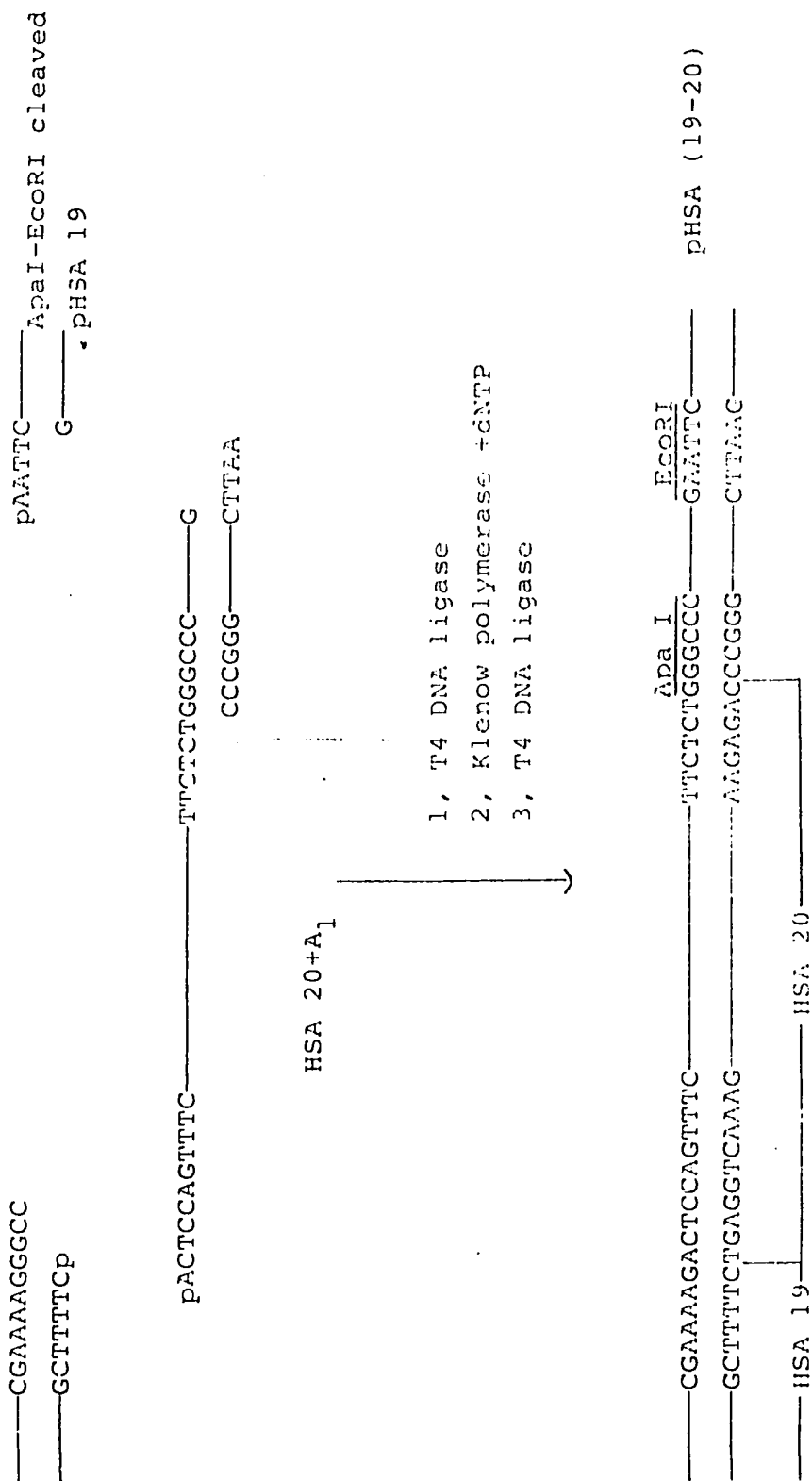


Schema 30

Klonierung von HSA20 in pHSA19

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA19 mit 5 pMol HSA20 + A₁ reagiert, wie das im allgemeinen Verfahren beschrieben wurde (Schema 30).

Mit der 5'-³²P-HSA20-Ligonukleotidsonde wurden 160 Kolonien getestet, von denen sich 58 als positiv erwiesen. Plasmid-DNA, die aus 11 positiven Klonen hergestellt wurde, wurde unter Verwendung des pKO-Starters I sequenziert, und acht von diesen enthielten das korrekte Plasmid pHSA (19-20).

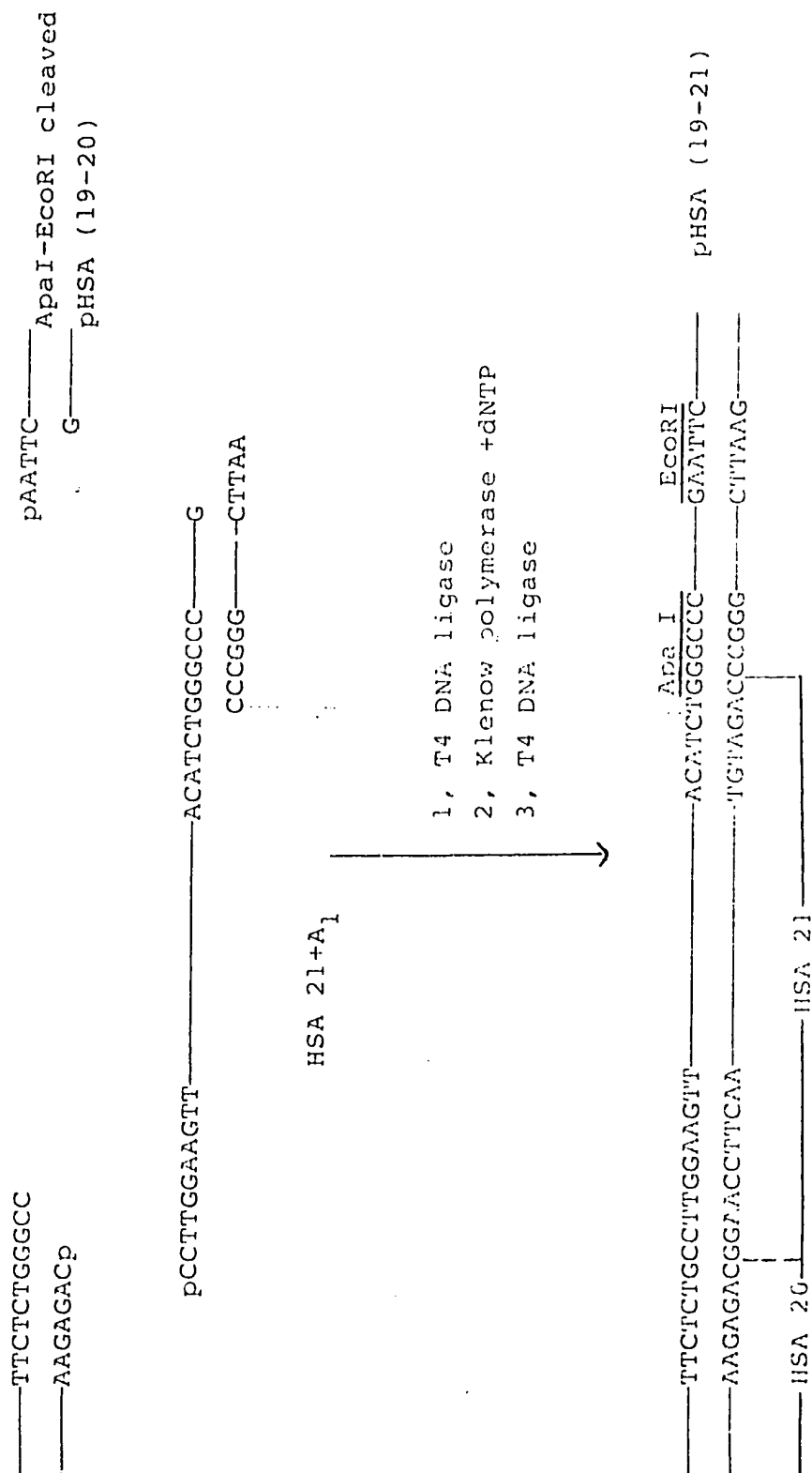


Klonierung von HSA21 in pHSA(19-20)

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA (19-20) und 5 pMol HSA 21 + A₁ auf die üblicher Weise miteinander reagiert (Schema 31).

Nach der Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA21-Sonde wurden 33 positive Klone von 240 getesteten festgestellt. Sechs positive Klone wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, und nach der Sequenzierung mit dem pKO-Starter I wurde festgestellt, daß 3 Klone das erwartete Plasmid pHSA(19-21) enthielten.

Schema 31

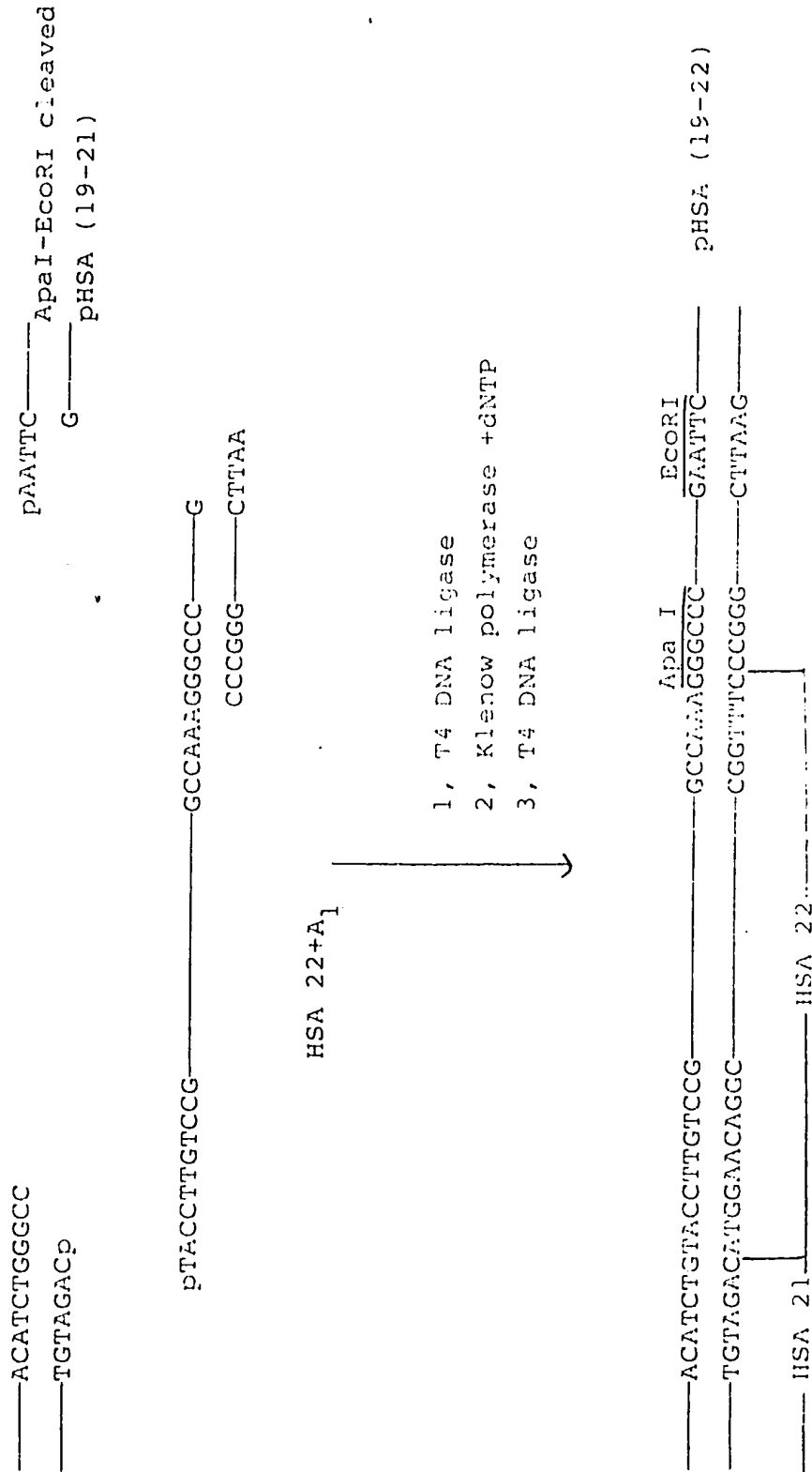


Schema 32

Klonierung von HSA22 in pHSA(19-21)

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA(19-21) und 5 pMol HSA22 + A₁ auf die übliche Weise miteinander reagiert (Schema 32).

Für die Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA22-Sonde wurden 80 Klone getestet, von denen sich 10 als positiv erwiesen. Die aus diesen hergestellte Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des pKO-Starters I sequenziert, und es erwies sich nur eine als korrekt. Sie wird als pHSA(19-22) bezeichnet.

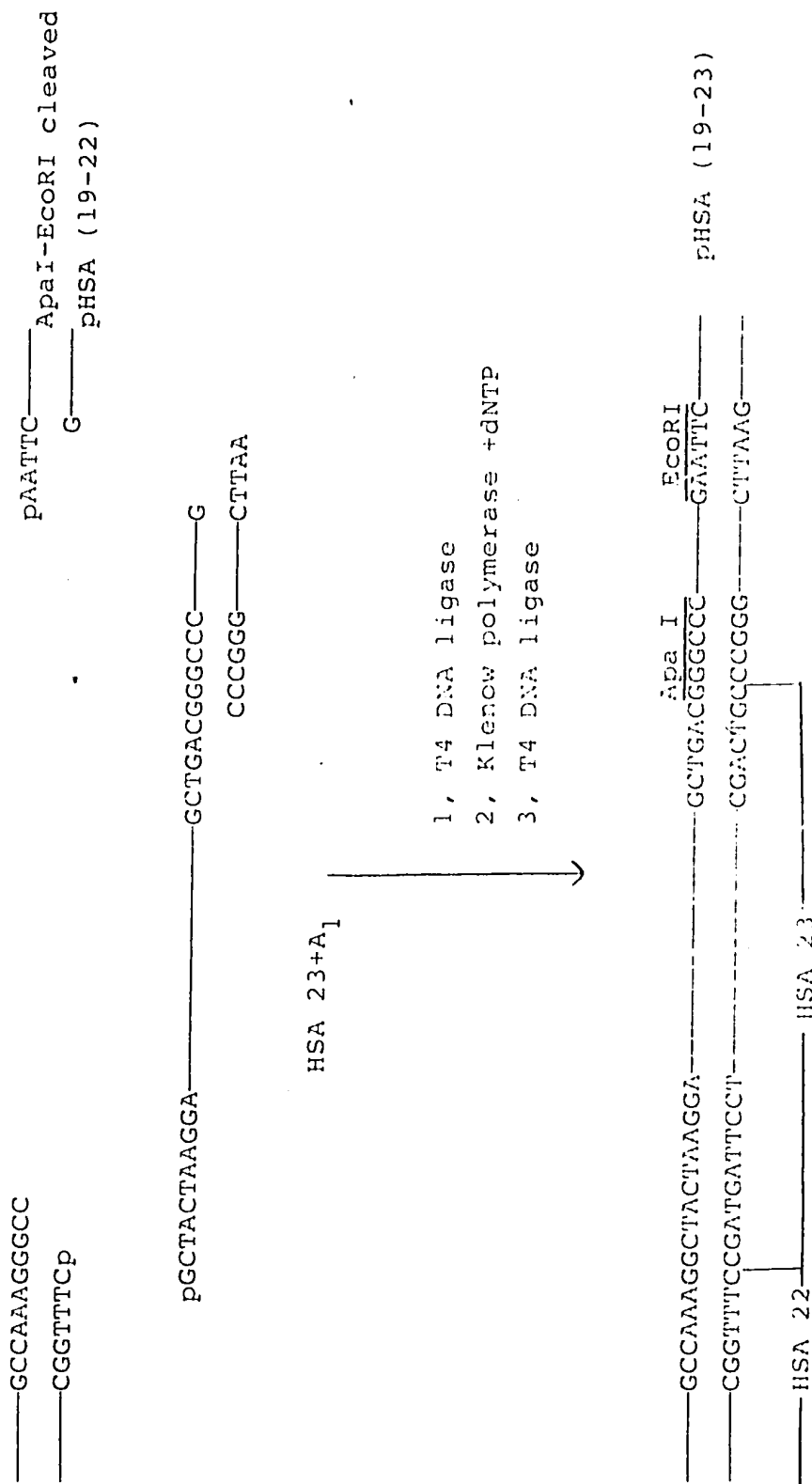


Schema 33

Klonierung von HSA23 in pHSA(19-22)

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA(19-22) und 5 pMol HSA23 + A₁ nach dem allgemeinen Verfahren reagiert (Schema 33).

Es wurden 160 Klone getestet, von denen 100 eine Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA23-Sonde aufwiesen. Aus 6 positiven Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt, und s. . wurden mit dem pKO-Starte I sequenziert. Drei davon enthielten die korrekte Sequenz HSA23 in der entsprechenden Umgebung. Eine davon wurde im nächsten Schritt als pHSA(19-23) verwendet.



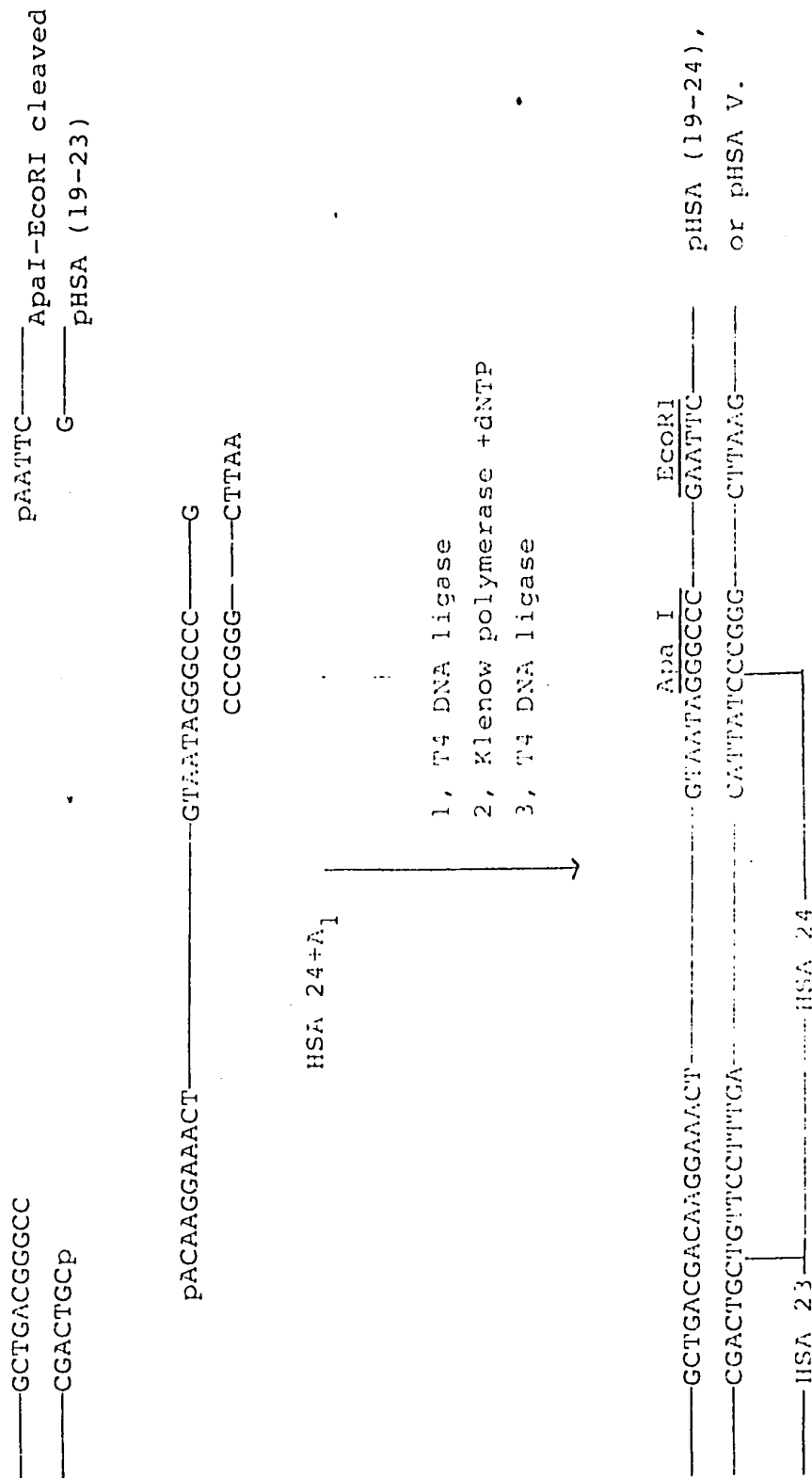
Schema 34

Klonierung von HSA23 in pHSA(19-23)

Es wurden 0,1 µg mit Apa I-Eco RI geschnittenes pHSA(19-23) mit 5 pMol HSA 24 + A₁ auf die übliche Weise reagiert (Schema 34).

Von 160 Klonen wiesen 37 Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA 24-Sonde auf. Von drei positiven Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt, und diese wurde mit dem pKO-Starter I sequenziert. Zwei der genannten Plasmide enthielten die korrekte HSA24-Sequenz, von denen eine später als pHSA(19-24) oder als pHSA V verwendet wurde.

Die Sequenz von HSAV wurde nach der Reklonierung in das mit Pst I-Eco RI geschnittene M 13mp 18- und mp 19-Vektorpaar als Pst I-Eco RI-Fragment, das aus pHSAV gewonnen wurde, bestätigt.



Verbindung der großen HSA-Fragmente

Obwohl geplant war, das Gen von HSA aus 5 großen Fragmenten (HSA I, II, III, IV und V) zusammenzubauen, wurde bisher nur die Synthese von HSA III und HSA V demonstriert. HSA I ist ein flexibler 5'-Terminalbereich von HSA und wurde chemisch als relativ kurzes Pst I-Sauve Al-Segment synthetisiert. (Siehe Schema 4.) HSA II und HSA IV wurden aus zwei Segmenten gewonnen, d. h., HSA II oder HSA (1–6) wurde aus HSA (1–3) und HSA (4–6) hergestellt, während HSA IV oder HSA (13–18) aus HSA (13–16) und HSA (17–18) gewonnen wurde. Während des Zusammenbaus der großen Fragmente HSA II und HSA IV wurden solche Reaktionsserien angewendet, wie die Restruktionsdegestion, die entweder bei der Mung-Bohnen-Nukleasebehandlung oder bei der Klenow-Polymerase- + dNTP-Behandlung Anwendung finden. Diese Reaktionsbedingungen werden für die Erzielung von pHSA II und pHSA IV vollständig beschrieben, und bei der Manipulation mit großen HSA-Fragmenten wird auf ähnliche Reaktionen nur verwiesen.

Die Mung-Bohnen-Nuklease- und die Klenow-Polymerase- + dNTP-Behandlung werden angewendet, um die 5'- oder 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Bereiche zu entfernen, die man nach dem Restriktionsenzym schneiden zur Herstellung von glatten Enden erhält. Durch die Mung-Bohnen-Nuklease werden 5'-überstehende Enden entfernt, während die Klenow-Polymerase- + dNTP-Behandlung die 3'-überstehenden Enden beseitigt. Die letztere Behandlung füllt gleichzeitig das 5'-überstehende Ende, um glatte Enden zu ergeben.

pHSA II

Das große HSA II-Fragment, kloniert in pUC 19 als pHSA II, wurde aus den Segmenten HSA (1–3) und HSA (4–6) gewonnen, so daß pHSA (1–3) als Vektor zum Klonieren von HSA (4–6) verwendet wurde.

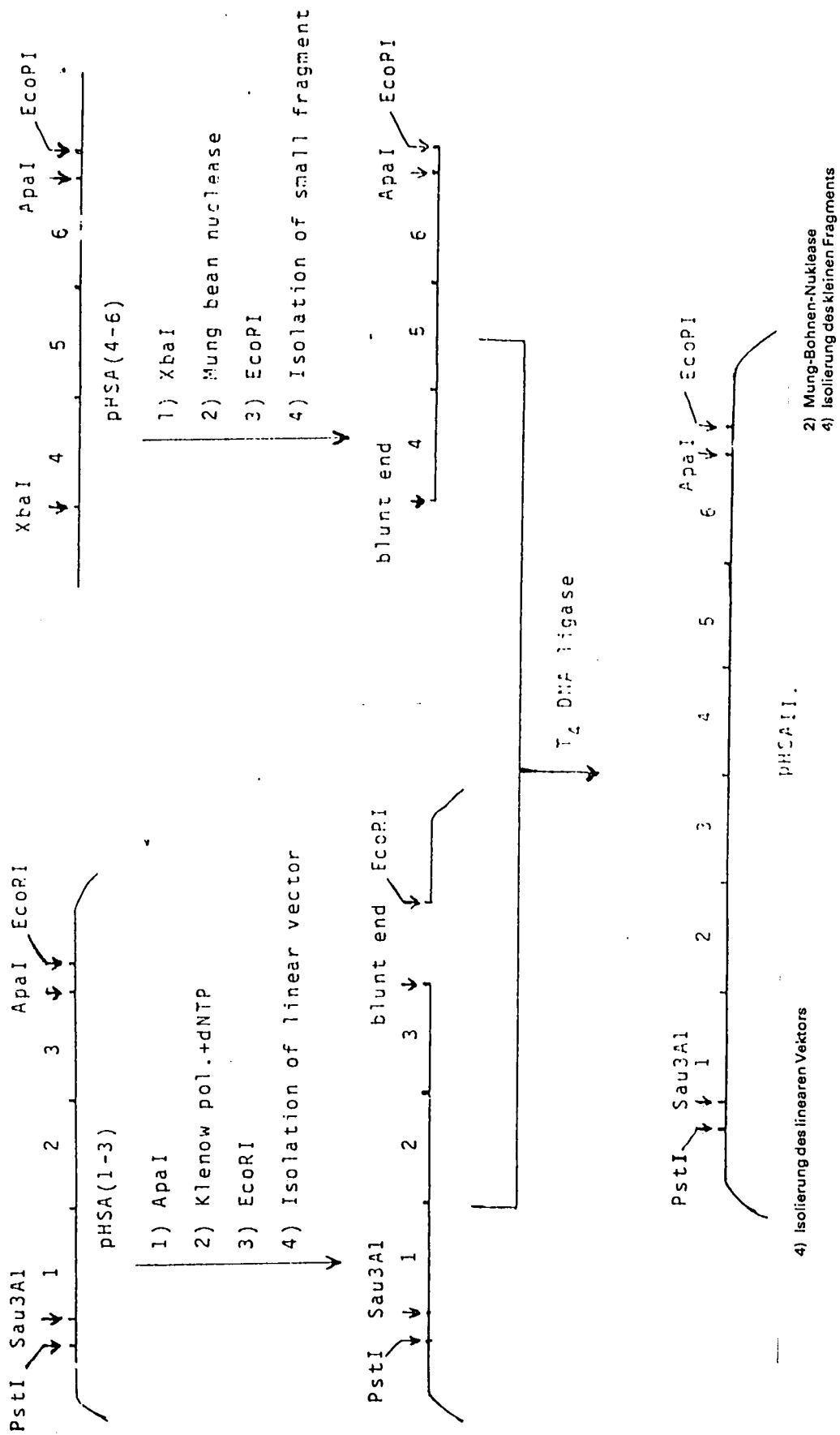
Es wurde 1 µg von pHSA (4–6) mit 10 Einheiten Xba I in 50 µg Reaktionsvolumen behandelt, das 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂ und 1 mM DTT (Puffer mit hohem Salzgehalt) enthielt. Temperatur 37°C, Dauer 1 Stunde. Die so gewonnene lineare Vektor-DNA wurde mit Ethanol ausgefällt, getrocknet und in 50 µl Mung-Bohnen-Nukleasepuffer (30 mM Natriumazetat, pH-Wert 5,0, 100 mM NaCl, 2 mM ZnCl₂, 10% Glycerol, 0,5 mg/ml denaturierte Kalb-Thymus-DNA) aufgelöst und mit 1 µl einer 10 Einheiten/µl-Mung-Bohnen-Nuklease bei 37°C für die Dauer von 30 min behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol extrahiert, dann wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt (siehe oben für die Xba I-Behandlung) aufgelöst, und dem Reaktionsgemisch wurden 20 Einheiten Eco RI zugesetzt, wobei die Temperatur eine Stunde lang bei 37°C gehalten wurde. Nach der Ethanolausfällung wurde das kleine HSA (4–6)-Fragment durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel (in TAE-Puffer) isoliert, gefolgt von der Elektroelution und Ethanolausfällung. Dieses Fragment hatte ein glattes Ende am 5'-Terminus und ein Eco RI-kohäsives Ende am 3'-Terminus (Schema 35).

Es wurde 1 µg von pHSA (1–3) in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt, der 6 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 6 mM MgCl₂ und 1 mM DTT enthielt, aufgelöst und mit 10 Einheiten Apa I bei 37°C eine Stunde lang behandelt. Nach der Ethanolausfällung wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 7 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 7 mM MgCl₂, 5 mM β-Merkaptoethanol, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM dNTP enthielt, und mit 0,5 µl von 5 Einheiten/µl Klenow-Polymerase bei Zimmertemperatur 10 min lang behandelt. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolausfällung wurde das Pellet in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 10 Einheiten von Eco RI zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden lang bei 37°C gehalten, dann wurde die DNA mit Ethanol ausgefällt. Das große Vektorfragment mit einem glatten Ende und einem Eco RI-Ende wurde durch Elektrophorese auf 0,5%igem Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution und der Ethanolausfällung, isoliert (Schema 35).

Der mit pHSA (1–3) geschnittene Vektor (0,1 µg) wurde mit dem HSA (4–6)-Fragment (etwa 0,03 µg) in 10 µl Reaktionsvolumen ligiert, das 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP (Ligasepuffer) enthielt, und es wurden bei 15°C für 12 Stunden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in gefrorene kompetente Zellen transformiert, und sie wurden dann auf LB-Ampizillinplatten plattiert. Von 110 replika-plattierten Kolonien wiesen 55 Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA4-Oligonukleotidsonde auf. Aus 10 positiven Klonen wurde Plasmid-DNA herbestellt und unter Verwendung des Starters sequenziert. Von diesen wiesen 2 die erwartete Folge an der Verbindungsstelle der Oligonukleotide HSA3 und HSA4 auf, und diese wurden später als pHSA (1–6) oder pHSA II verwendet (Schema 35).

(Die Folge von HSA II wurde nach der Subklonierung in den mit Pst I-Eco RI geschnittenen M13mp18- und mp19-Phagvektor bestätigt, und die Sequenzierungsreaktionen wurden an einzelsträngiger DNA-Matrize ausgeführt.)

Schema 35



pHSAIV

Das große Fragment HSAIV wurde aus den vorher klonierten DNA-Segmenten HSA(13-16) und HSA(17-18) gewonnen, wobei der Vektor pHSA(17-18) zum Klonieren von HSA(13-16) verwendet wurde (Schema 36).

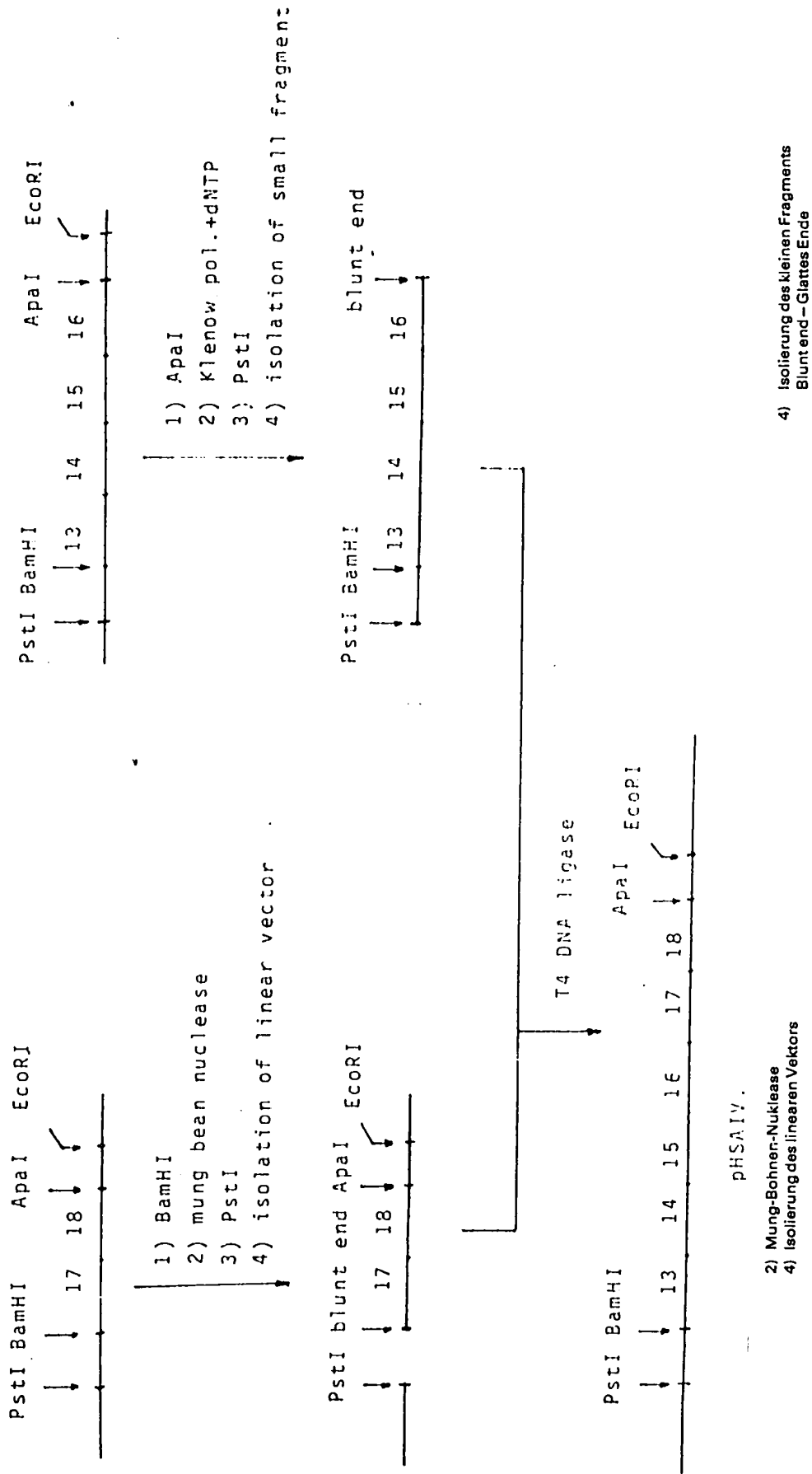
Es wurde 1 µg von pHSA(13-16) mit 20 Einheiten von *Apal* I in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt für die Dauer von einer Stunde bei 37°C behandelt. Die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt und in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP enthielt, und bei Zimmertemperatur 10 min lang mit 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt, und das Pellet wurde in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, der 20 Einheiten *Pst* I enthielt, Dauer eine Stunde, Temperatur 37°C. Nach der Ethanolausfällung wurde das kleine Fragment durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel, gefolgt von der Elektroelution, isoliert. Dieses Verfahren ergab das DNA-Segment HSA(13-16) mit einem glatten Ende und einem *Pst* I-kohäsiven Ende (Schema 36).

Es wurde 1 µg von pHSA(17-18) mit 10 Einheiten *Bam* HI in 50 µl eines Reaktionsvolumens geschnitten, das einen Puffer mit hohem Salzgehalt enthielt, Dauer eine Stunde, Temperatur 37°C. Die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt und in 50 µg Mung-Bohnen-Nuklease aufgelöst, anschließend wurden über 30 min bei 37°C 10 Einheiten Mung-Bohnen-Nuklease zugesetzt. Nach der Phenolextraktion und der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, und über eine Stunde wurde bei 37°C eine Menge von 20 Einheiten *Pst* I zugesetzt. Das Große, lineare Vektorfragment wurde mit Ethanol ausgefällt, durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel (TAE-Puffer) gereinigt, gefolgt von der Elektroelution. Diese Reaktionsserie führte zu einem geschnittenen pHSA(17-18)-Vektor mit einem glatten Ende und einem *Pst* I-kohäsiven Ende (Schema 36).

Der geschnittene pHSA(17-18)-Vektor (0,1 µg) wurde mit HSA(13-16) (etwa 0,05 µg) in 10 µl Ligasepuffer ligiert, der 80 Einheiten T4-DNA-Ligase enthielt, Dauer 12 Stunden, Temperatur 15°C. Das Gemisch wurde dann in gefrorene kompetente JM 101-Zellen transformiert und auf LB-Ampizillinplatten plattiert. Durch Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA 16-Sonde wurden 230 Kolonien getestet, von denen 86 als positiv ermittelt wurden. Aus 10 Klonen wurde Plasmid-DNA hergestellt und unter Verwendung des pKO-Starter sequenziert. Fünf Plasmid-DNA wiesen die korrekte Verbindung zwischen den HSA 16- und HSA 17-Oligonukleotidbereichen auf, und sie wurden später als pHSA(13-18) oder pHSAIV verwendet (Schema 36).

(Die Folge von HSAIV wurde nach der Subklonierung in den Phagvektor M 13mp 18 und mp 19 bestätigt. Die Sequenzierung wurde auf einer einzelsträngigen DNA-Matrize durchgeführt.)

Schema 36



pHSA(II-III)

In diesem Fall wurde pHSAIII als Vektor benutzt, um das HSAIII-Fragment zu klonieren (Schema 37).

Vorbereitung des HSAIII-Fragments

Es wurden 5 µg pHSAIII mit 40 Einheiten KpnI in 100 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C 3 Stunden lang behandelt. Der geschnittene Vektor wurde mit Ethanol ausgefällt, und das Pellet wurde in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthielt, und das Gemisch wurde 10 min bei Zimmertemperatur gehalten. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolausfällung wurde das Pellet in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, es wurden 40 Einheiten EcoRI zugesetzt, und das Gemisch wurde 2 Stunden bei 37°C gehalten. Die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt, und das HSAIII-Fragment wurde durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, isoliert. Das so gewonnene, HSAIII-enthaltende große Fragment hatte ein glattes Ende und ein EcoRI-kohäsives Ende (Schema 37).

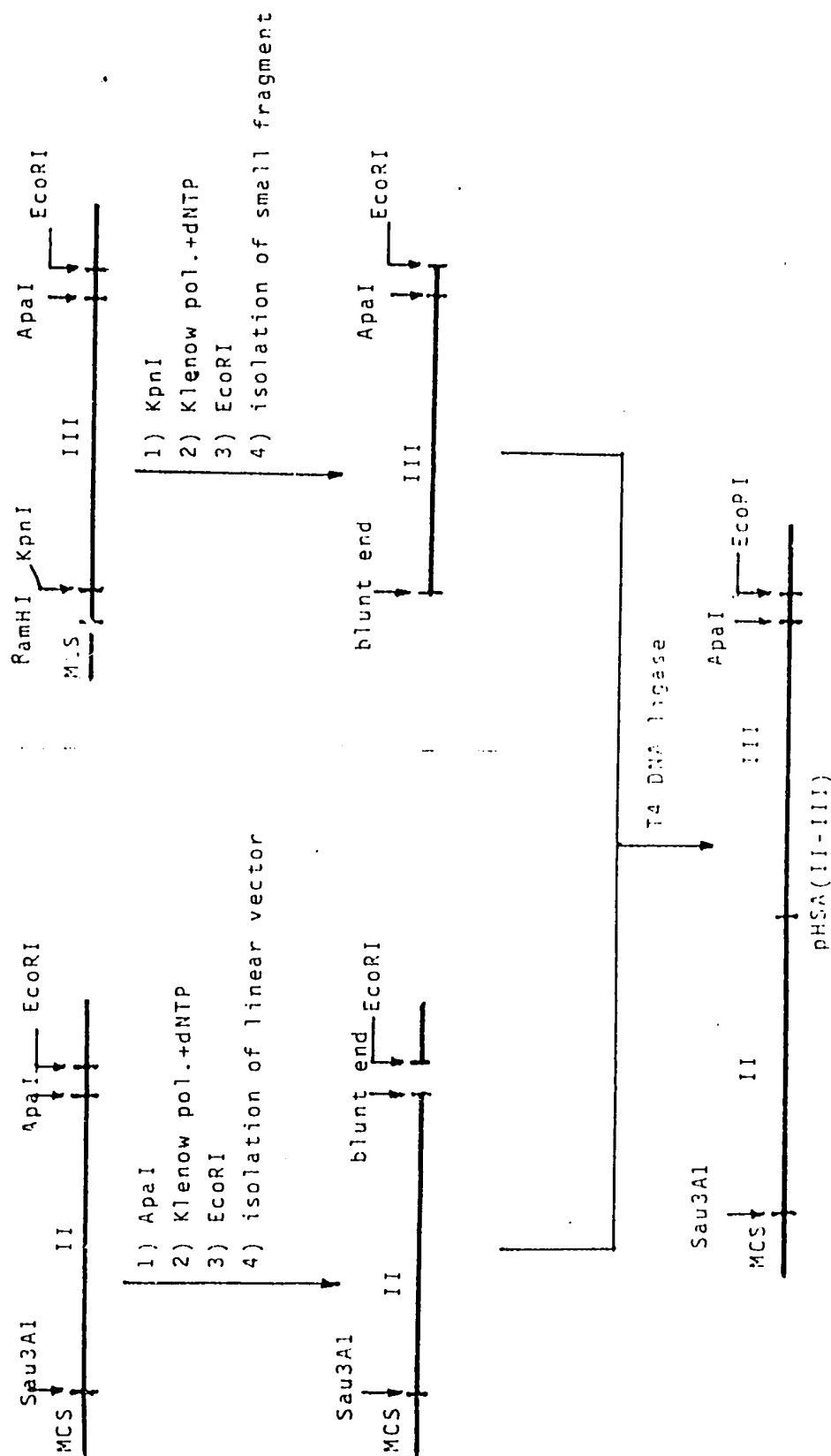
Schneiden des pHSAII-Vektors

Es wurde 1 µg von pHSAII in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt aufgelöst und mit 10 Einheiten ApaI bei 37°C für die Dauer von 2 Stunden behandelt. Nach der Ethanolausfällung wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP enthielt, und mit 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase bei Zimmertemperatur 10 min behandelt. Das Gemisch wurde mit Phenol extrahiert, die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt, und das Pellet wurde in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, dann wurden 20 Einheiten EcoRI zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 37°C gehalten, und die DNA wurde mit Ethanol ausgefällt. Das große Vektorfragment wurde durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, isoliert. Der so gewonnene lineare Vektor hatte ein glattes Ende und ein EcoRI-kohäsives Ende (Schema 37).

Ligation

Es wurden 0,2 µg des geschnittenen pHSAII-Vektors mit 0,1 µg des Fragmentes HSAIII in 100 µl Ligase-Puffer gemischt, und es wurden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 14 Stunden lang bei 15°C gehalten, anschließend wurde es in JM101-E. coli-Zellen transformiert. Etwa 50% der ampizillinresistenten Kolonien wiesen Hybridisierung mit der 5'-³²P-HSA11-Oligonukleotidsonde auf. Die aus 8 positiven Klonen hergestellten Plasmid-DNA wurden unter Verwendung eines synthetischen Starters, der komplementär mit einem Teil des Oligonukleotids von HSA (zwischen den Nukleotidpositionen 508 und 527 des reifen HSA-Gens) ist, sequenziert, und alle acht wiesen die richtige Sequenz am Verbindungspunkt der großen Fragmente HSAII und HSAIII auf.

Schema 37



MCS: Mehrfachklonierungsstelle, von pUC19 abgeleitet, enthält die Stellen, die sich flussaufwärts der PstI-Stelle, einschließlich der PstI-Stelle, befinden.

4) Isolierung des linearen Vektors
Blunt End - Glatte Ende

4) Isolierung des kleinen Fragments

pHSA (IV-V)

In diesem Fall diente pHSA V als Vektor zum Klonieren des Fragments HSA IV (Schema 18).

Vorbereitung des HSA IV-Fragmentes

Es wurden 2 µg von pHSA IV mit 10 Einheiten von *Apal* in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C für die Dauer von zwei Stunden behandelt. Der lineare Vektor wurde mit Ethanol ausgefällt, und das Pellet wurde in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP enthält, und bei Zimmertemperatur wurden über 10 min 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase zugesetzt. Nach der Phenolextraktion und der Ethanolausfällung wurde das Pellet in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, es wurden 40 Einheiten *Pst*I zugesetzt, und das Gemisch wurde zwei Stunden bei 37°C gehalten. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das kleine Fragment, das die HSA IV-Sequenz enthält, durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, gereinigt. Das kleine Fragment hat ein *Pst*I-kohäsives Ende und ein glattes Ende (Schema 38).

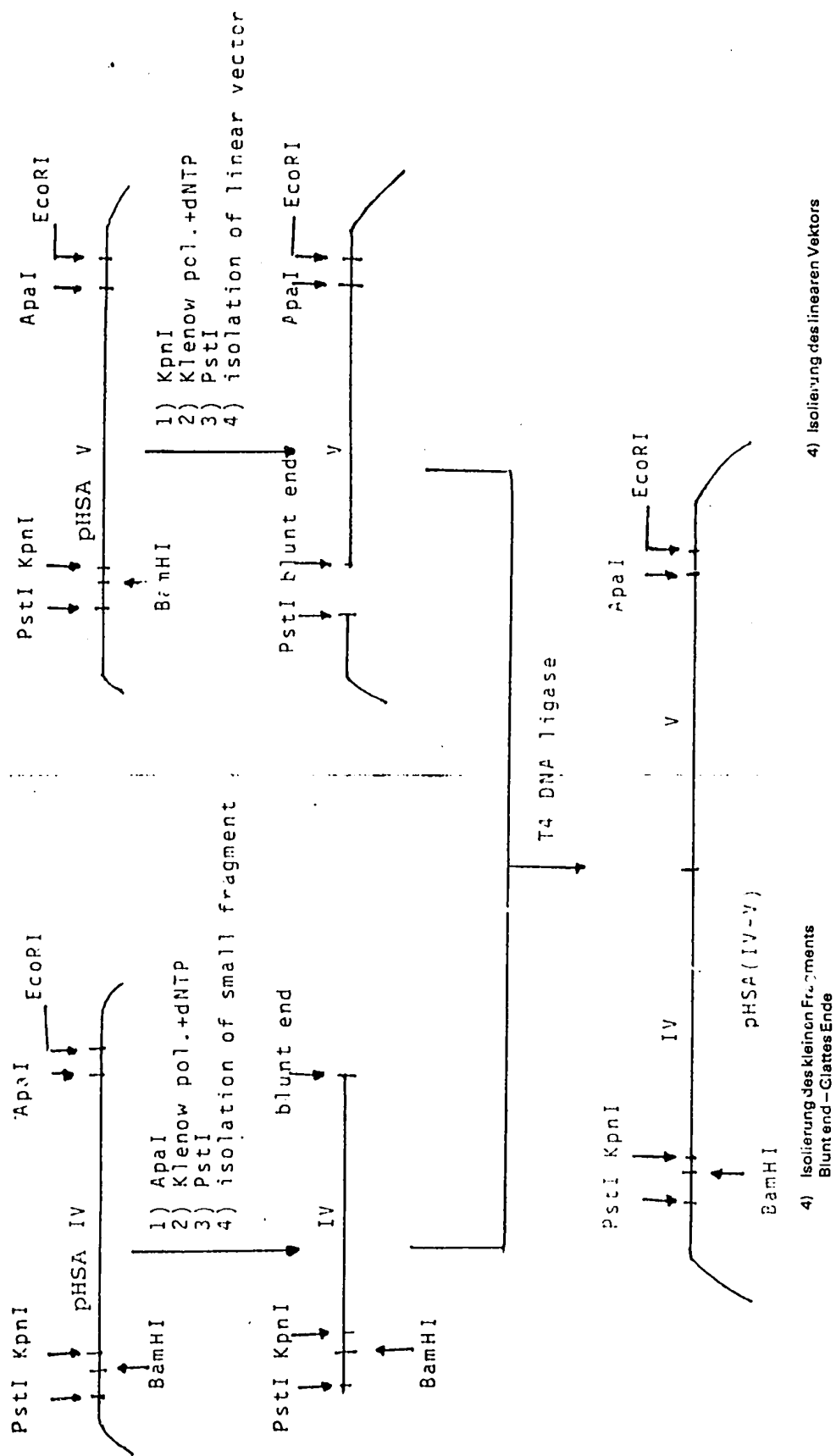
Schneiden des pHSA V-Vektors

Es wurden 2 µg von pHSA V mit 10 Einheiten von *Kpn*I in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C vier Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthält, und wurde 10 min lang bei Zimmertemperatur gehalten. Nach der Extraktion mit Phenol und der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Puffer mit hohem Salzgehalt auflöst, und es wurden 40 Einheiten *Pst*I zugesetzt. Das Gemisch wurde vier Stunden lang bei 37°C gehalten. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde der lineare Vektor durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, gereinigt. Der so gewonnene geschnittene pHSA V-Vektor hat ein *Pst*I-kohäsives Ende und ein glattes Ende (Schema 38).

Ligation

Etwa 0,1 µg linearisierter pHSA V-Vektor und 0,05 µg eines HSA IV-enthaltenden Fragments wurden mit 80 Einheiten T4-DNA-Ligase in 10 µl Puffer bei 15°C für die Dauer von vier Stunden behandelt. Nach der Transformation in JM 101-E. coli-Zellen wurden die ampizillinresistente Kolonien mit einer 5'-³²P-HSA 16-Oligonukleotidsonde getestet, und etwa 40% erweisen sich als positiv. Acht Kolonien wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, sie wurden mit einem synthetischen Starter sequenziert, der mit einem Teil des HSA 19-Oligonukleotids (Nukleotidpositionen 1374–1393 im reifen HSA-Gen) komplementär ist, davon wiesen sieben die korrekte Sequenz am Verbindungspunkt zwischen den HSA IV- und HSA V-Bereichen auf.

Schema 38. Verbindung von HSA IV und HSA V



pHSA (IV–V) mit Apa I-Sac I-Eco RI-Adapter (pHSA (IV–V)-ASE)

pHSA (IV–V), das in der vorstehend beschriebenen Weise gewonnen wurde, enthält Adapter 1 flußabwärts des HSA-Kodierungsbereiches. Das Klonieren des HSA-Gens in den E. coli-Teil (pPT2HK₁) des E. coli-Hefe-Schüttelvektors verlangt eine flußabwärts gelegene Sac I-Stelle, deshalb muß diese Stelle irgendwie eingeführt werden. Es erscheint vorteilhaft, sie an dieser Stelle des Gen-Zusammenbaus einzufügen.

Die offensichtlichste Möglichkeit, zu einer Sac I-Stelle zu kommen, scheint der Ersatz des Apa I-Eco RI-Adapters 1 durch einen ähnlichen Adapter mit einer internen Sac I-Stelle zu sein (Adapter 3, siehe Schema 3).

Der HSA (IV–V)-Bereich wurde aus pHSA (IV–V) als ein Pst I-Apa I-Fragment isoliert und zusammen mit Adapter 3 (Apa I-Sac I-Eco RI-Adapter) in das mit Pst I-Eco RI geschnittene pUC 19 kloniert.

Isolierung des Fragmentes HSA (IV–V)

Es wurden 2 µg pHSA (IV–V) mit 20 Einheiten Apa I in 50 µl eines Puffers mit niedrigem Salzgehalt bei 37 °C drei Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl eines Puffers mit hohem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 20 Einheiten Pst I zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde vier Stunden bei 37 °C gehalten. Das Fragment HSA (IV–V) wurde durch Gel-Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, gereinigt.

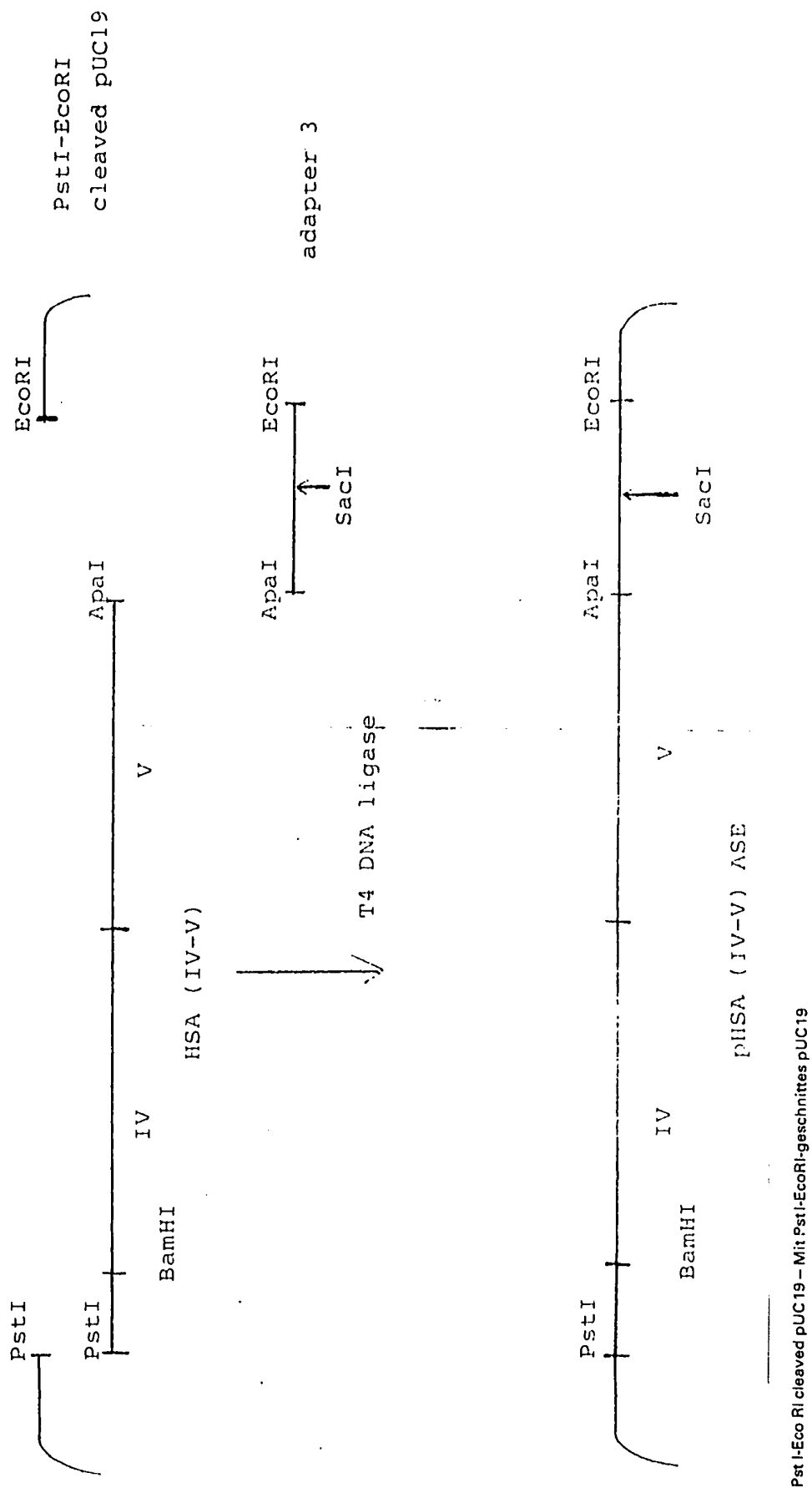
Ligation (Schema 39)

Es wurden 0,1 µg von Pst I-Eco RI-geschnittenem pUC 19 mit 0,05 µg Apa I-Eco RI-HSA (IV–V)-Fragment und mit 5–5 pMol von 5'-phosphorylierten Adapter-3-Oligonukleotiden in 20 µl Ligasepuffer gemischt. Es wurden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt und das Gemisch 14 Stunden lang bei 15 °C gehalten. Nach der Transformation wurden ampizillinresistente Kolonien einem Screening auf zwei verschiedenen Replika-Platten mit der 5'-³²P-HSA 16-Oligonukleotids-sonde oder mit einer 5'-³²P-Adapter 3-Niedrigstrangoligonukleotids-sonde unterzogen.

Etwa 50% der Kolonien wies eine Hybridisierung mit beiden Sonden auf. Positive Kolonien wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, und die Sequenzierung erfolgte sowohl mit dem reversen Starter als auch mit dem pKO-Starter I. Alle zehn Sequenzierung überprüften Klone erwiesen sich als korrekt.

Nachfolgend wird dieses pHSA (IV–V), das durch Einführung von Adapter 3 eine flußabwärts gelegene Sac I-Stelle aufweist, für die weiteren Schritte beim Zusammenbau des HSA-Gens verwendet.

Schema 39



pHSA (IV–V)

In diesem Fall diente pHSA (II–III) als Vektor zum Klonieren des Fragmentes HSA (IV–V) (Schema 40).

Schneiden des Vektors pHSA (II–III)

Es werden 2 µg von pHSA (II–III) mit 40 Einheiten von *Apal* I in 50 µl einer Pufferlösung mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C fünf Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP enthielt, und es wurden 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase zugesetzt. Das Gemisch wurde 10 min lang bei Zimmertemperatur gehalten, dann wurde es mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer mit hohem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 20 Einheiten von *Eco* RI zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 37°C 5 Stunden lang gehalten, dann wurde der lineare Vektor durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von dem Elektroelutieren, isoliert.

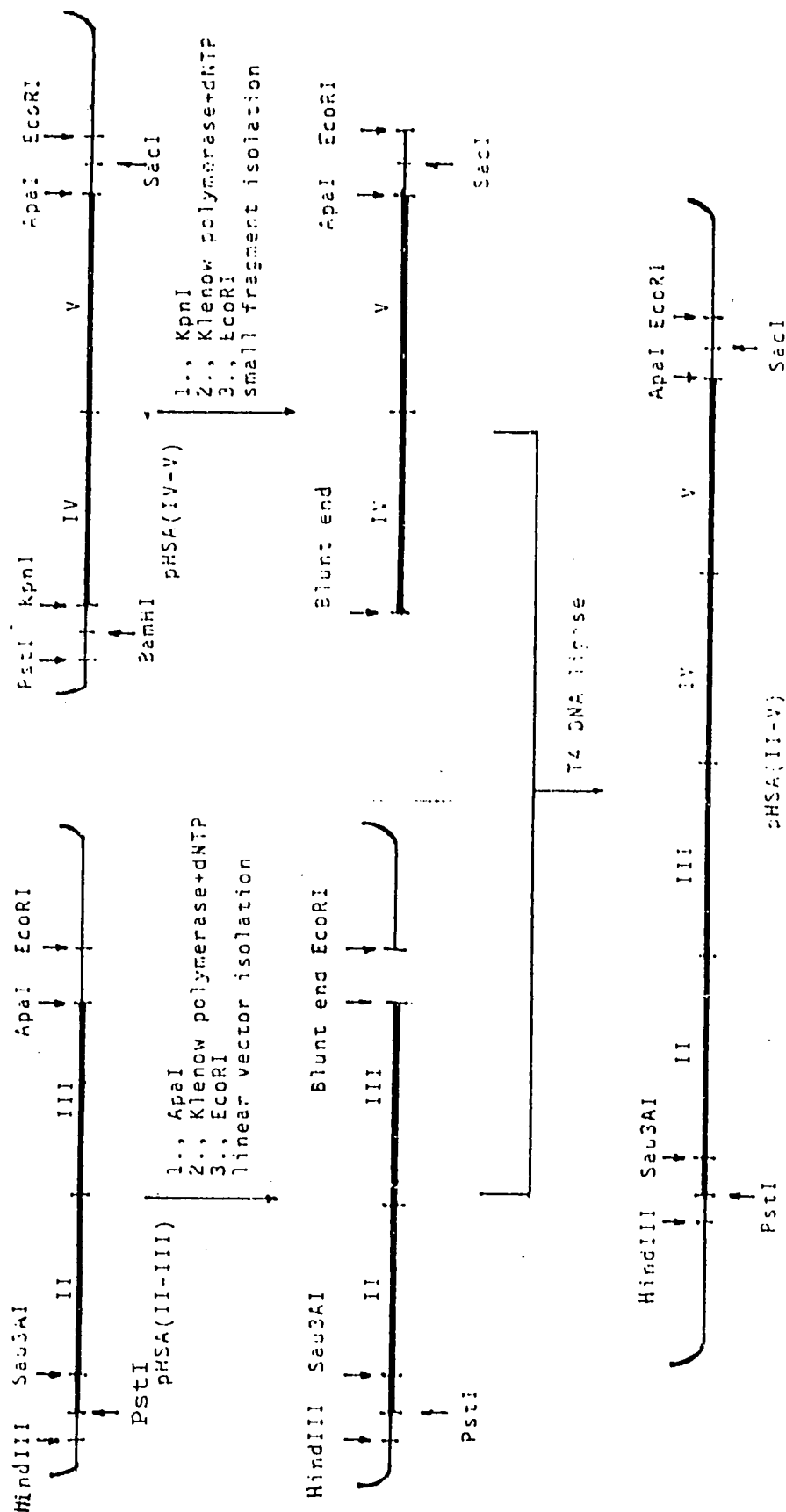
Isolierung des Fragments HSA (IV–V)

Es wurden 2 µg von pHSA (IV–V) in 50 µl Puffer mit niedrigem Salzgehalt aufgelöst und bei 37°C 5 Stunden lang mit 20 Einheiten *Kpn* I behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthielt. Das Gemisch wurde 10 min lang bei Zimmertemperatur gehalten, dann wurde die DNA ausgefällt und in 50 µl Puffer mit hohem Salzgehalt aufgelöst und 20 Einheiten von *Eco* RI zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde fünf Stunden bei 37°C gehalten, dann wurde ein kleines Fragment, das den HSA (IV–V)-Bereich enthielt, durch Elektrophorese auf einem 2%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt vom Elektroelutieren, isoliert.

Ligation

Etwa 0,1 µg linearisierter pHSA (II–III)-Vektor und 0,05 µg des HSA (IV–V)-enthaltenden Fragments wurden in 10 µl Ligasepuffer gemischt, der 80 Einheiten T4-DNA-Ligase enthielt, und das Gemisch wurde 7 Stunden bei 15°C gehalten. Nach der Transformation in JM 101-E.-coli-Zellen wurden ampicillinresistente Kolonien durch Hybridisierung mit einer 5'-³²P-HSA 21 Oligonukleotidsonde getestet, und etwa 40% der Kolonien erwiesen sich als positiv. Acht Kolonien wurden zur Herstellung von Plasmid-DNA verwendet, sie wurde unter Verwendung von 5'-³²P-HSA 11-Oligonukleotid als Sequenzierungsstarter sequenziert. Alle acht hatten den richtigen Verbindungspunkt zwischen den HSA III- und HSA IV-Bereichen. Der gesamte HSA (II–V)-enthaltende Bereich von pHSA (II–V) wurde durch Sequenzierung auf Plasmidmatrize (pKO-Starter I und HSA 1 – 8-Starter wurden verwendet) überprüft, und es wurde kein Fehler festgestellt.

Schema 40



linear vector isolation - Isolierung des linearen Vektors
 Small fragment isolation - Isolierung des kleinen Fragments
 Blunt end - glattes Ende

pHSA-Vektoren (Nr. 1, Nr. 2)

Das Fragment HSA (II-V) wurde mit dem Fragment HSA I durch Klonieren dieser beiden Fragmente in den pUC19-Vektor ergänzt (Schema 14).

HSA (II-V) könnte direkt als Fragment Sau 3AI-Eco RI isoliert werden, das sich im Gen eine einzigartige Stelle Sau 3AI befindet. Der pUC19-Vektorteil aber enthält zahlreiche Sau 3AI-Stellen, was die Restriktionsverdauung und die Fragmenttrennung erschwert. Zuerst wurde daher HSA (II-V) in einem Fragment Hind III-Eco RI isoliert, was die weitere Sau 3AI-Behandlung verkürzte.

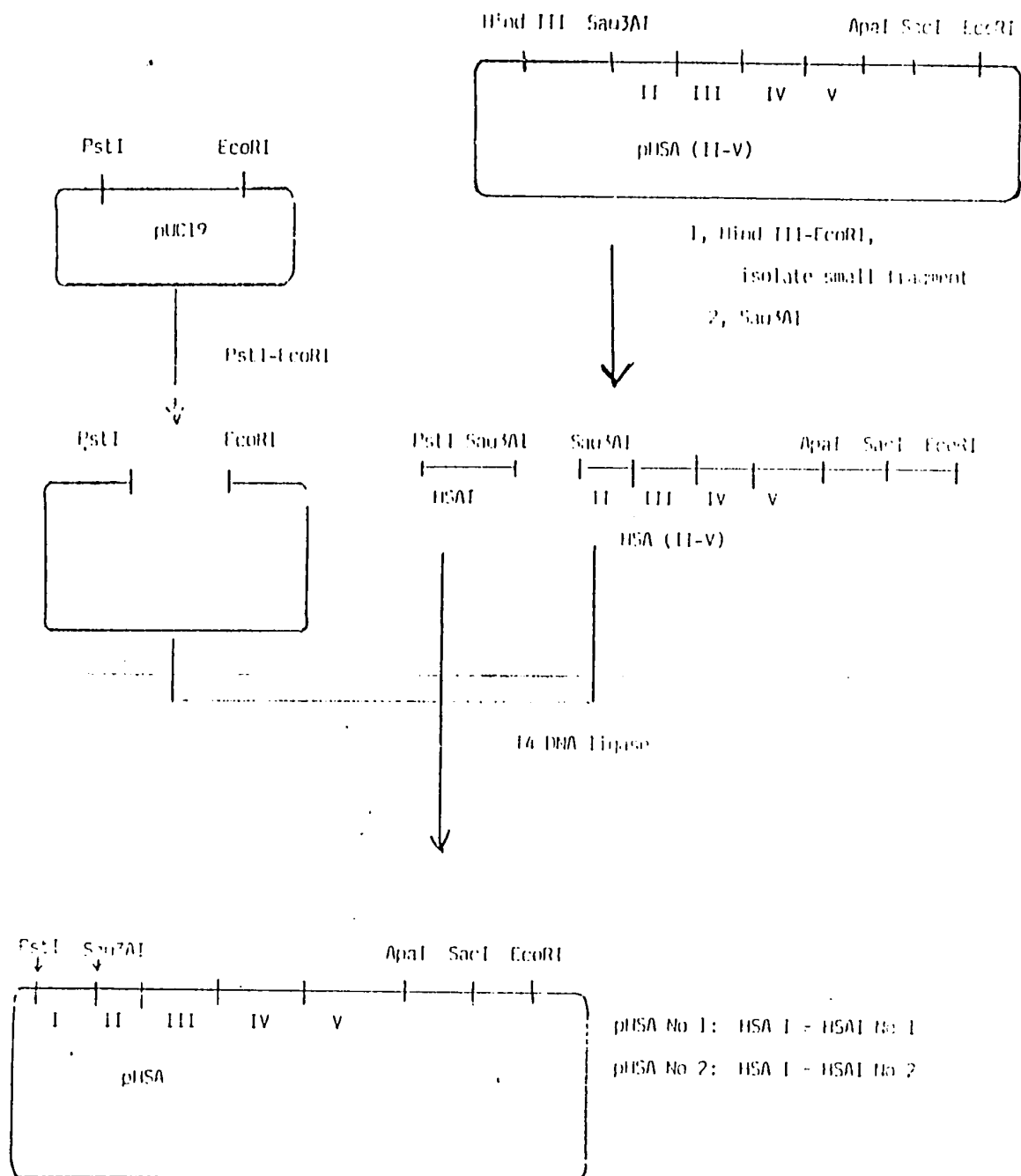
Es wurden 5 µg HSA (II-V) in 100 µl Puffer mit hohem Salzgehalt mit 40 Einheiten Hind III und 40 Einheiten Eco RI bei 37°C drei Stunden lang behandelt. Das Gemisch wurde auf ein 0,5%iges Agarose-Gele (TAE-Puffer) aufgebracht, und nach der Elektrophorese erhielt man zwei Fragmente. Das kleinere Fragment wurde elektroeluiert und mit Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer mit hohem Salzgehalt aufgelöst und mit 7,5 Einheiten Sau 3AI bei 37°C 14 Stunden lang behandelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol extrahiert (2×), mit Ethanol ausgefällt, so daß in diesem Fall das große Sau 3AI-Eco RI-Fragment nicht durch Gel-Elektrophorese gereinigt wurde.

Es wurden zwei getrennte Ligationen aufgestellt, die jeweils den mit Pst I-Eco RI-geschnittenen pUC19-Klonierungsvektor und das Sau 3AI-Eco RI-HSA (II-V)-Fragment enthielten, sowie eines der beiden HSA I-Fragmente (als ein Gemisch von zwei Oligonukleotiden, die einen Pst I-Sau 3AI-Adapter bilden).

Es wurden 0,2 µg des mit Pst I-Eco RI-geschnittenen pUC19 und 0,1 µg des Fragmentes Sau 3AI-Eco RI HSA (II-V) mit 5–5 pMol von 5'-phosphoryliertem HSA I Nr. 1 oder HSA I Nr. 2 (Schema 4) in zwei getrennten Reaktionsgemischen, die 10 µl Ligasepuffer enthielten, gemischt. Beiden Reaktionsgemischen wurden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt, sie wurden 6 Stunden lang bei 15°C gehalten, dann in JM101-E. coli-Zellen transformiert. Die transformierten Gemische wurden auf LB-Ampizillin-Platten plattiert. Kolonien wurden auf Nitrozellulosefilter doppelt repliziert (2) und mit der 5'-³²P-HSA 5-Oligonukleotidsonde (erster Filter) und mit der entsprechenden 5'-³²P-HSA I-Oligonukleotidsonde (zweiter Filter) hybridisiert. Etwa 80% der Kolonien wiesen Hybridisierung mit beiden Sonden in beiden Fällen auf. Plasmid-DNA wurde aus 4–4 Klonen der beiden Konstruktionen hergestellt, und sie wurde unter Anwendung des reversen Starters sequenziert, um die richtige Einfügung der HSA I-Versionen in die pHSA-Vektoren zu überprüfen. Alle sequenzierten Konstruktionen waren korrekt.

Die gesamten HSA-Kodierungsbereiche von pHSA Nr. 1 und Nr. 2 wurden als Pst I-Eco RI-Fragmente in die Phagvektoren M13mp18 und mp19 subkloniert, und die gesamte Sequenz wurde in mp19 unter Anwendung des 17mer Starters und des HSA 1–9-Starters geprüft. Die mp18-Konstruktionen wurden nur mit dem 17mer Starter geprüft.

Schema 41



Isolate small fragment

- Kleines Fragment isolieren

Die Konstruktion des E. coli-Plasmids mit der Hefepromoter- und den Terminatorsequenzen

1. Der Klonierungsausgangsvektor (pGB1, Abb. 1) wurde durch Modifikation des Plasmids pBR327 gewonnen (Soberón, X., Covarrubias, L. und Bilivar, F. [1980]: Gene 9, 287–305), aus dem die Stellen Pst I und Hind II aus dem Ap^r-Bereich durch EMS- und HA-Mutagenese und wiederholte Restriktionsenzymverdauung ausgeschaltet wurden. Die Bedingungen für die Mutagenese wären die gleichen wie sie bei Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics (Experimente in der Molekulargenetik), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., beschrieben wurden.

Die Xho I-Stelle wurde als ein CCTCGAGG-Linker eingeführt, der an der einzigartigen (aufgefüllten) Ava I-Stelle eingefügt wurde.

2. Das Plasmid pGB2 (HIS3):

Das 1327 bp-Fragment Bam HI-Xho I, welches das gesamte klonierte His3-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* enthält (Storms, R. K., McNeil, J. B., Khandekar, P. S., An, G., Parker, J. und Friesen, J. D. [1979], J. Bacteriol. 140, 73–82; und Struhl, K. [1985], Nucleic Acids Res. 13, 8587–8601); wurde aus pYF92 ausgeschnitten (Storms u. a., ebenda) (erhalten von Gyorgy B. Kiss, Institut für Genetik, Biologisches Forschungszentrum der ungarischen Akademie der Wissenschaften, Szeged, Ungarn) und als den eindeutigen Bam HI- und Xho I-Stellen von pGB1 eingefügt, was zu pGB2 (HIS3) führt (Abb. 2).

3. Das Plasmid pGB3-229T, das den Transkriptionsterminatorbereich des Hefe-HIS3-Gens enthält.

Das Fragment Eco RI-Kpn I von pGB2 (HIS3) wurde durch die 1327 bp-Tc^r-Patrone (Eco RI-Kpn I) von Plasmid pJDR158 ersetzt (Davison, J., Heustersprute, M., Merchez, M. und Brunel, E. [1984], Gene 28, 311–318) (erhalten von John Davison, Unit of Molecular Biology, International Institute of Cellular and Molecular Pathology, 75, Avenue Hippocrate, B-1200 Brüssel, Belgien).

Das Plasmid pGB3-229T enthält – neben der Ap^r-ori-Patrone – das gesamte Tc^r-Gen (mit einer zusätzlichen Sac I-Stelle am 3'-Ende) und den Transkriptionsterminatorbereich des HIS3-Gens (Abb. 3a). Das pGB-229T wurde weiter modifiziert durch 1) Deletion der Kpn I-Stelle in pGB-229T, um pGB3-229TK⁺ (Abb. 3b) zu erhalten, und 2) Insertion von Promoterfragment Hind III-Sal I aus pUC18*/622PH (von Abb. 5), was zu pPT2HK, führt (Abb. 3c).

4. Klonierung des Promoterbereichs von PHO5-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*.

Das Gen PHO5 kodiert ein repressierbares Säurephosphataseexoenzym (orthophosphorische Monoesterphosphatasehydrolase [Säureoptimum], EC 3.1.3.2). Es ist Teil eines 8kb-Eco RI-genomischen DNA-Fragments (Kramer, R. A., Andersen, N. [1980], Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6541–6545, und Rogers, D. T., Lemire, J. M. und Bostian, K. A. [1982], Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2157–2161).

Um das Plasmid zu erhalten, das das PHO5-Gen aufweist (Davison u. a., ebenda), wurde eine Hefe-Gen-Bank (eine Cosmid-Bibliothek, die aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae* konstruiert wurde, das von Z. Feher, Debrecen Medical University, Debrecen, Ungarn, bezogen wurde) folgendermaßen gesichtet: ein Gemisch der rekombinanten Cosmid-DNA wurde mit Eco RI verdaut. Aus Agarose-Gels wurden Eco RI-Fragmente zu 8kb isoliert und an der Eco RI-Stelle des Plasmids pGB2 (HIS3) rekloniert. Das das PHO5-Gen enthaltende Plasmid (pGB2 (HIS3, PHO5, PHO3) (Abb. 4) wurde dann auf der Basis der Komplementation der pho5-Mutation in den Hefesträngen DB-4 ausgewählt (Rogers u. a., ebenda) und AH220 (a, trp1, leu2–3, 2–112, his3–11, 3–15, pho5, pho3), bereitgestellt von A. Hinnen, CIBA-GEIGY, Basel; siehe Tait-Kamradt, A. G. Turner, K. J., Kramer, R. A., Elliott, Q. D., Bostian, S. J., Thill, G. P., Rogers, D. T. und Bostian K. [1986], Molec. and Cell Biol. 6, 1855–1865).

5. Subklonierung des PHO5-Gen-Promoterbereiches.

Der Promoter des repressierbaren sauren Phosphatasegens (PHO5) kann aus dem Plasmid pGB2 (HIS3, PHO5, PHO3) durch Restriktionsenzymverdauung mit Bam HI + Sal I als ein 623-bp-Fragment herausgeschnitten werden (Meyhack, B., Bajwa, W., Rudolph, H. und Hinnen, A. [1982], EMBO J. 1, 675–680). Dieses wurde an den Bam HI-Sal I-Stellen in pUC18 rekloniert, wodurch sich das Plasmid pUC18/623P (Abb. 5a) ergibt, in welchem die Sequenz der Einfügung durch Sequenzierung bestätigt und mit der aus der bekannten Literatur verglichen wurde (Meyhack, u. a., ebenda, und Arima, K., Oshima, T., Kubota, I., Nakamura, N., Mizunaga, T. und Toh-e, A. [1983], Nucleic Acids Res. 11, 1657–1672).

Das Bam HI-Sal I-Fragment (623 bp) im pUC18/623P-Plasmid enthält die flussaufwärts gelegenen Aktivierungssequenzen von PHO5 und einen Teil der Kodierungssequenz (welche das N-Terminal-17-Aminosäuresekretionssignalpeptid und 10 weitere Aminosäuren vom N-Ende des reifen Genproduktes enthält).

Die Primärstruktur des Sekretionssignalkodierungsbereiches des PHO5-Gens lautet:

Met Phe Lys Ser Val Val Tyr Ser Ile Leu
 ↑ PROMOTER – ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA
 ↑ Bam HI DraI

Ala Ala Ser Leu Ala Asn Ala Gly Thr
 GCC GCT TCT TTG GCC AAT GCA GGT ACC
 BamI ↑ KpnI

Signalende

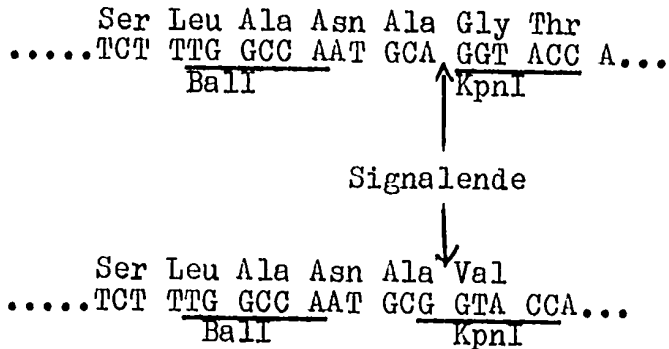
In dieser Struktur könnte die Kpn I-Stelle, die flussabwärts des „Signalend“-Kodons Ala liegt, als Klonierungsstelle (durch Kpn I, gefolgt vom Trimmen der 3'-überstehenden Sequenz, zu einem glatten Ende gemacht) für das HSA-Kodierungsgen verwendet werden, wenn sie um eine Base in die 5'-Richtung verschoben würde.

In pUC18/623P könnte die oben genannte Kpn I-Stelle nicht manipuliert werden, wenn nicht die flussaufwärts gelegene Kpn I-Stelle (x, Abb. 5a) aus dem Plasmid deletiert worden wäre. Das Plasmid wurde daher mit Sac I und Gam HI geschnitten, gefolgt von der Schaffung glatter Enden durch Entfernung der überstehenden 3'-Terminalnukleotide vom Sac I-Ende und Füllen des Bam HI-Endes mit DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment und Nukleotidtriphosphaten (Schritt 1 in Abb. 5). Nach der Re-Ligation und der Transformation, die zum Plasmid pUC18*/623P (Abb. 5b) führte, wurde die Bam HI-Stelle wiederhergestellt, und die Kpn I-Stelle flussabwärts vom „Signalend“-Kodon wurde eindeutig und damit für die weitere Manipulation und die In-vitro-Mutagenese (siehe unten) geeignet.

6. In vitro-Mutagenese der „Signalend“-Stelle:

Eine Ein-Basen-Verschiebung der Kpn I-Stelle zur Schaffung einer Spleißstelle, die mit dem „Signalend“-Kodon (Ala) „in Phase“ ist.

Um das 5'-glatte Ende des HSA-Gens mit der PHO5-Signalkodierungssequenz in der korrekten Phase ligieren zu können, muß die Kpn I-Stelle um eine Base in der 5'-Richtung verschoben werden. Es wurde festgestellt, daß die Deletierung des Adenosinrestes (A) flußaufwärts der Kpn I-Stelle keinerlei Veränderungen in der Natur der kodierten Aminosäuren innerhalb der Signalsequenz herbeiführte:



Das Schneiden der modifizierten Sequenz mit Kpn I und das anschließende Entfernen der überstehenden GTAC-3'-Nukleotide mit dem DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment-+dNTP erzeugt ein glattes Ende, an welchem die Kpn I-Stelle in exakter Übereinstimmung mit der Position des „Signalend“-Kodons (GCG) ist.

Um die oben genannte strukturelle Änderung zu erreichen, wurde

das CCAAOTGCAGGTAC-Fragment von pUC18*/623P
GGTTACGTC das sich zwischen den

Bal I- und Kpn I-Stellen befindet, ersetzt durch einen synthetischen Linker

CCAATGCGGTAC was zum Plasmid pUC18*/622P
GGTTACGTC führt. Der Austausch

wurde durch Sequenzierung bestätigt (Schritt 2 in Abb. 5).

Für weitere Klonierungszwecke wurde auch die Eco RI-Stelle (flußaufwärts von PHO5-Promoter) durch eine neue Hind III-Stelle ersetzt durch Einfügen eines Hind III-Linkers (CAAGCTTG) an der aufgefüllten Eco RI-Stelle (Schritt 3 in Abb. 5). Diese neue Konstruktion wurde als pUC18*/622 PH bezeichnet (Abb. 5c).

7. Konstruktion von Plasmid pPT2HK1, das die Hefeexpressionskassette enthält:

Das Plasmid pGB-229T (Abb. 3) enthält eine Sac I- (Sst I-) und eine Kpn I-Stelle flußaufwärts von Gen Tc^R. Durch Einfügen von dem PHO5-Promoterbereich (an den eindeutigen Hind III- und Sal I-Stellen von pUC18*/622PH) wurde die Kpn I-Stelle von pGB-229T überflüssig, folglich wurde die Kpn I-Stelle aus pGB3-229T durch Kpn I-Verdauung und Entfernung des überstehenden 3'-Endes durch Klenow-Polymerase-+dNTP, Religation der glatten Enden und Transformation deletiert. Das neue Plasmid (pGB3-229TK^R) (Abb. 3), dem die Kpn I-Stelle fehlt, wurde mit Hind III und Sal I geschnitten, und das Hind III-Sal I-Fragment von pUC18*/622PH (welches die modifizierte PHO5-Promoter- und Signalsequenz enthält) wurde einkloniert, wodurch ein tetracyclin-sensitives Plasmid pPT2HK1 entstand (Abbildungen 3 und 6), das eine funktionelle Hefeexpressionskassette trägt, die aus dem in-vitro-mutagenisierten PHO5-Promoter- und Signalkodierungsbereich und dem Transkriptionsterminator des HIS3-Gens besteht.

8. Die Konstruktion des E. coli-Hefe-Schaukelvektorplasmids pBY200.

Berücksichtigt werden müssen folgende Hauptpunkte:

- Nutzung der nützlichen Eigenschaften des „klassischen“ E.coli-S. cerevisiae-Schaukelvektorplasmids pJDB207 (Beggs, J. D. [1981], Multiple-copy yeast plasmid vectors (Mehrfachkopie-Hefepiasmidvektoren). Von Wettstein, D., Friis, J., Kielland-Bradt, M. und Stenderup, A. [Hsg.], Molecular genetics in Yeast [Molekulargenetik in Hefe]. Alfred Benzon Symposium Bd. 16, 383–390), d. h., 1) relativ geringe Größe im Vergleich zu vielen anderen Hefeklonierungsvektoren; 2) Replikation des Plasmids in Hefewirtszellen in großer Kopienzahl; 3) stabile Selektion der plasmidhaltigen Hefezellen (des Phentyps leu 2) auf Grund des Vorhandenseins des LEU2-selektiven Markergens, wodurch 4) auch die Möglichkeit der direkten Selektion in leuB-E.coli-Wirten besteht;

- Enthaltung geeigneter Restriktionsenzymkennungsstellen, die es mit dem E. coli-Plasmid pPT2HK1 kompatibel machen, welches die Hefeexpressionskassette (siehe oben) trägt, und mit dessen rekombinanten Derivaten.

Das Plasmid pBY200 wurde durch zwei Klonierungsschritte hergestellt (Abb. 7):

1. Einfügung der Patrone „LEU2 + 2 µ ori“ (ein 3,4 kb-Eco RI-Fragment, das durch partielle Eco RI-Verdauung von pJDB 207 (Beggs u. a., ebenda) gewonnen wurde, in die Eco RI-Stelle von pBG1;
2. Auffüllen mit DNA-Polymerase-Klenow-Fragment (gefolgt von der Religation der glatten Enden) an der Xba I-Stelle im „2 µ ori“-Bereich. Diese Modifikation hat keine Wirkung auf die Fähigkeit des Plasmids, sich in S. cerevisiae zu replizieren.

Klonierung der HSA-Gene (Nr. 1, Nr. 2) in den pPT2HK1-E. coli-Vektor

Der pPT2HK1-E. coli-Vektor wird in den Abbildungen 3 und 6 gezeigt, ebenso dessen modifizierter Signalsequenzbereich.

Seine Hauptmerkmale vom Standpunkt der HSA-Genklonierung bestehen darin, daß es den Hefe-PHO5-Promoter und die PHO5-Signalsequenz sowie einen Hefetranskriptionsterminator (HIS3) enthält. Die Promoter-Signalsequenz- und Terminatorbereiche sind durch eindeutige Restriktionsstellen getrennt, so daß das HSA-Kodierungsgensegment (strukturelles HSA-Gen) zwischen diesen beiden Bereichen eingefügt werden kann.

Im pPT2HK1-Vektor sind die Restriktionsstellen, die zum Einfügen des HSA-Gens genutzt werden, die Kpn I- und die Sac I-Stelle.

Die Kpn I-Stelle am Ende der Signalsequenz (Führungspeptidkodierungsbereich) wurde vorher von den Autoren verlagert, so daß nach dem Kpn I-Schneiden, gefolgt vom Trimmen des resultierenden 3'-überstehenden Bereichs, ein glattes Ende gebildet wurde, und dieses glatte Ende fällt exakt mit dem Ende des Führungspeptidkodierungsbereiches zusammen (Schema 24). Die Sac I-Stelle befindet sich flussaufwärts des HIS3-Terminatorbereiches, und die Sac I-Schneidung wird nach dem Schneiden von Kpn I und der Bildung des glatten Endes durchgeführt.

Schneiden von pPT2HK₁

Es wurden 2 µg pPT2HK₁ mit 20 Einheiten Kpn I in 50 µl Puffer mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C 2 Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthielt, und das Reaktionsgemisch wurde 10 min lang bei Zimmertemperatur gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer mit niedrigem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 20 Einheiten Sac I zugesetzt, gefolgt von der Inkubation bei 37°C für die Dauer von fünf Stunden. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das große Vektorfragment durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, isoliert.

Schneiden von pHSA Nr. 1 zum Schaffen von Fragment HSA Nr. 1

Es wurden 2 µg pHSA Nr. 1 in 50 µl Puffer mit hohem Salzgehalt aufgelöst und mit 20 Einheiten Pst I bei 37°C 2 Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1 mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthielt, und das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei Zimmertemperatur gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer mit niedrigem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 20 Einheiten Sac I zugesetzt. Das Gemisch wurde fünf Stunden lang bei 37°C gehalten, anschließend auf ein 0,5%iges Agarose-Gel (TAE-Puffer) gebracht. Das kleinere Fragment wurde nach Elektrophorese, gefolgt von Elektroelution, isoliert.

Schneiden von pHSA Nr. 2 zur Schaffung des Fragments HSA Nr. 2

pHSA Nr. 2 wurde neu aus einem Stamm *dam*⁽⁻⁾ E. coli isoliert, um mit dem Bcl I-Enzym arbeiten zu können, das sensitiv für die Adeninmethylierung ist.

Es wurden 2 µg pHSA Nr. 2 in 50 µl Puffer aufgelöst, der 75 mM KCl, 6 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl₂ und 1 mM DTT enthielt, und mit 20 Einheiten Bcl I bei 50°C fünf Stunden lang behandelt. Nach der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl von Mung-Bohnen-Nukleasepuffer aufgelöst und 10 Einheiten Mung-Bohnen-Nuklease bei 37°C über die Dauer von 30 min zugesetzt. Nach der Extraktion mit Phenol und der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50 µl Puffer mit niedrigem Salzgehalt aufgelöst, und es wurden 20 Einheiten Sac I zugesetzt.

Das Gemisch wurde fünf Stunden lang bei 37°C gehalten. Das kleinere Fragment, welches HSA Nr. 2 enthielt, wurde auf die gleiche Weise isoliert, wie das für HSA Nr. 1 beschrieben wurde.

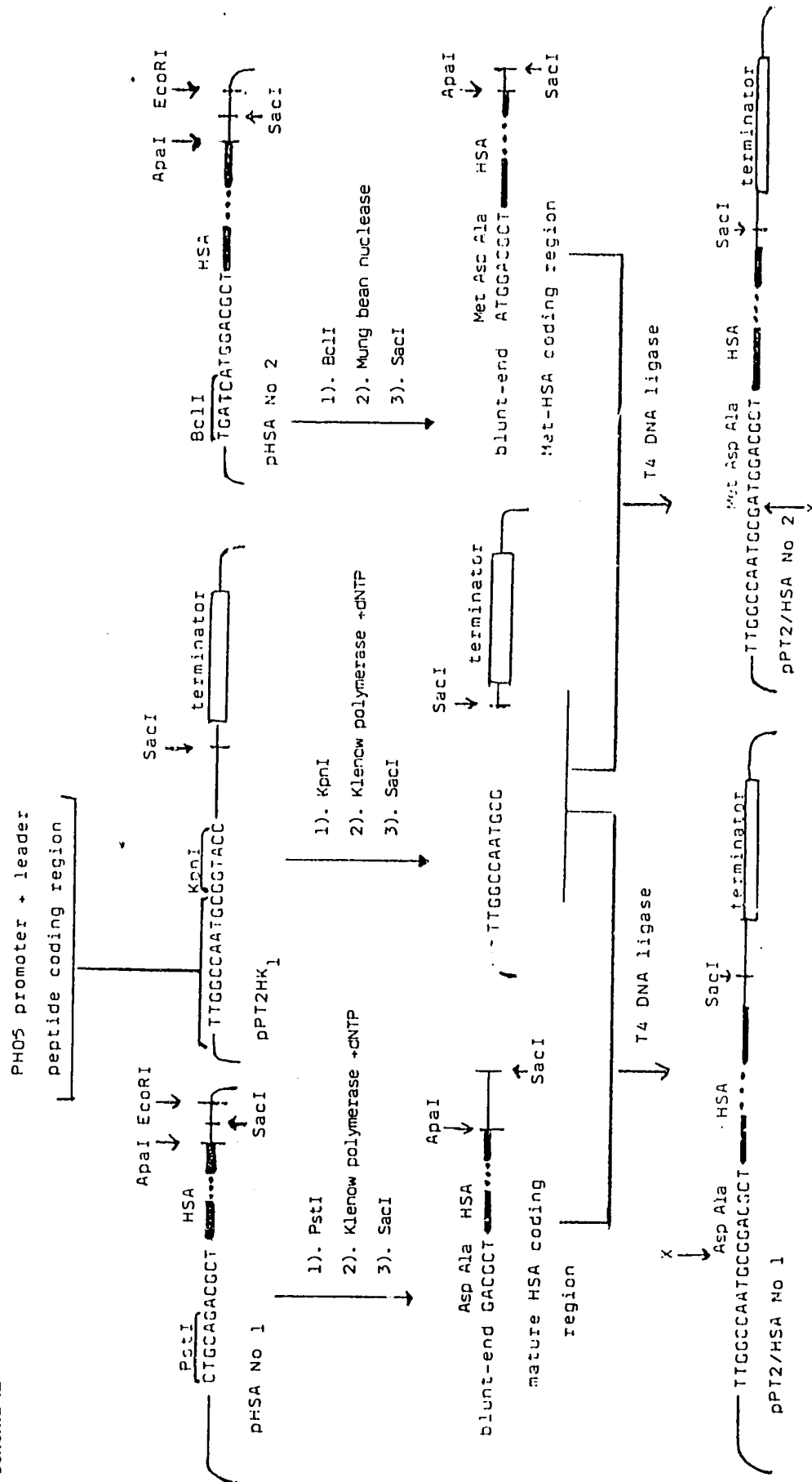
Ligationen

Es wurden 0,1 µg von geschnittenem pPT2HK₁ und 0,2 µg des Fragmentes HSA Nr. 1 oder HSA Nr. 2 in 10 µl Ligasepuffer gemischt, und es wurden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Reaktionsgemische wurden 15 Stunden lang bei 15°C gehalten, dann wurden sie in JM101-E. coli-Zellen transformiert, gefolgt von der Plattierung auf LB-Ampizillinplatten. Kolonien wurden durch Hybridisierung mit einer 5'-³²P-HSA 5-Cligonukleotidsonde getestet, und etwa 10% erwiesen sich als positiv. Von

5-5-Rekombinanten wurde Plasmid-DNA hergestellt, und sie wurde unter Anwendung von HSA-Starter 9 sequenziert. Die richtige Verbindung der PHO5-Führungssequenz und der HSA-Kodierungssequenz wurde in 2 Fällen für HSA Nr. 1 und in 3 Fällen für HSA Nr. 2 erzielt. Diese Plasmide werden als pPT2/HSA Nr. 1 bzw. pPT2/HSA Nr. 2 bezeichnet.

Bei diesen Konstruktionen wird das HSA-Gen in ein E. coli-Plasmid zwischen eine Hefepromotor- und Signalsequenz und einen Hefetranskriptionsterminator kloniert. Beim nächsten Schritt sollte diese „HSA-Expressionspatrone“ in einen E. coli-Hefe-Schaukelvektor übertragen werden.

Schema 42



X shows the putative peptide processing site

Wortliste zu Schema 12:

PHO5 promoter + leader peptide coding region	– PHO5-Promoter- und Führungspeptidkodierungsbereich
Mung bean nuclease	– Mung-Bohnen-Nuklease
Blunt end	– Glatte Ende
Mature HSA coding region	– Reifer HSA-Kodierungsbereich

x zeigt die putative Peptidverarbeitungsstelle.

Klonierung der HSA-Expressionspatrone in pBY200 und pJDB207

Der Hefe-E. coli-Schaukelvektor pBY200 enthält sowohl den Hefe- als auch den E. coli-Replikationsursprung, einen Ap^R-Bereich und einen Leu2-Marker. Dieses Plasmid kann mit den Enzymen Hind III und Xho I geschnitten werden, so daß das resultierende große Fragment alle oben genannten Bereiche behält, und es kann als Vektor zum Klonieren der HSA-Expressionspatrone dienen, die aus dem Schneiden von pPT2/HSA mit Hind III und Xho I gewonnen wurden (Abb. 8).

Schneiden von pBY 200

Es wurden 5 µg pBY 200 in 100 µl Puffer aufgelöst, der 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 mM MgCl₂ und 2 mM DTT (Puffer mit mittlerem Salzgehalt) enthielt, und mit 40 Einheiten Hind III und 60 Einheiten Xho I bei 37 °C 6 Stunden lang behandelt. Das große Fragment wurde durch Gel-Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer, gefolgt von der Elektroelution, isoliert.

Schneiden von pJDB 207

Ebenso wurde das Hefe-E. coli-Schaukelvektorplasmid mit den Restriktionsenzymen Hind III und Sal I unter den gleichen Bedingungen geschnitten, wie sie oben für pBY 200 beschrieben wurden, wobei aber 45 Einheiten Sal I anstelle von Xho I verwendet wurden. Das große Vektorfragment (Abb. 8) wurde durch Elektrophorese isoliert und durch Elektroelution vom Agarosegel gereinigt.

Schneiden von pPT2/HSA

Es wurden 5 µg pPT2/HSA Nr. 1 oder pPT2/HSA Nr. 2 wie oben in 100 µl Puffer mit mittlerem Salzgehalt aufgelöst und mit den Enzymen Hind III und Xho I behandelt. Das größere Fragment wurde in beiden Fällen durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel, gefolgt von der Elektroelution, isoliert.

Ligation

Es wurden 0,2 µg mit Xho I-Hind III-geschnittenes pBY 200 getrennt entweder mit 0,2 µg des Xho I-Hind III-Fragments von pPT2/HSA Nr. 1 oder mit 0,2 µg des Xho I-Hind III-Fragments von pPT2/HSA Nr. 2 in 10 µl Ligasepuffer gemischt, und beiden Gemischen, die 15 Stunden lang bei 15 °C gehalten wurden, wurden 80 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Reaktionsgemische wurden in gefrorene kompetente E. coli-Zellen (JF 1754) transformiert, gefolgt von der Plattierung auf LB-Ampizillinplatten. Ähnliche Bedingungen wurden für die Ligation des Xho I-Hind III-Fragmentes von pPT2/HSA Nr. 1 in das mit Hind III- und Sal I-geschnittene pJDB 207 angewandt.

Selektion und Analyse von pBY2/HSA Nr. 1- und pBY2/HSA Nr. 2-Rekombinanten

Die auf LB-Ampizillinplatten gezogenen Kolonien wurden auf 1) eine Minimalplatte M9, die 20 µg/ml Methionin und 20 µg je Milliliter Histidin (aber kein Leuzin) enthielt, 2) eine LB-Tetracyclin-Platte und 3) einen Nitrozellulosefilter auf eine Ampizillin-LB-Platte gebracht. Die auf dem Nitrozellulosefilter gezogenen Kolonien wurden lysiert und mit der ³²P-markierten HSA 6-Oligonukleotidsonde hybridisiert. Es wurden positive Kolonien, die auf Platte 2 tetracyclin-sensitiv waren und eine leu-Komplementation auf Platte 1 aufwiesen (d. h., nicht auf Platte 2, wohl aber auf Platte 1 wuchsen), ausgewählt und aus diesen Plasmid-DNA hergestellt (etwa 20 % der gesamten, auf der LB-Ampizillinplatte gewonnenen Kolonien wiesen den erwarteten Phenotyp auf den Platten 1–3 auf). Rekombinant-Plasmid-DNA wurden mit den Gemischen von Xho I und Hind III geschnitten, und das Schneiden wurde durch Elektrophorese auf einem 0,5%igen Agarose-Gel in TBE-Puffer überprüft. Nach dieser Doppelschneidung ergaben sowohl pBY2/HSA Nr. 1 als auch pBY2/HSA Nr. 2 zwei Fragmente, deren Größen der Größe der Ausgangsfragmente pBY 200, pPT2/HSA Nr. 1 bzw. pPT2/HSA Nr. 2 entsprachen. Gleichzeitig führte das Schneiden mit Kpn I in beiden Fällen zu einem linearisierten Vektor. Um die Struktur von pYHSA 221 zu steuern, wurde das Rekombinantplasmid mit Xba I geschnitten, was zwei Fragmente mit Größen ergab, wie sie aus der physikalischen Karte zu erwarten war. Alle Plasmidkonstruktionen und Klonierungsschritte, die zu den Hefeexpressionsvektoren führen, welche das HSA-Gen enthalten, wurden in der Abb. 9 zusammengefaßt.

Expression des synthetischen HSA-Gens in rekombinanten Hefezellen

Transformation von Hefezellen und Kulturbedingungen für die Induktion des PHO5-Promotors

Das synthetische HSA-Gen wurde in einer Reihe von Manipulationen, die oben detailliert beschrieben wurden, unter die Kontrolle des Hefepromotors PHO5 gestellt, wobei diese Manipulationen zur Konstruktion des Hefe-E. coli-Schaukelplasmids pBY2/HSA Nr. 1 und pBY2/HSA Nr. 2 und von pYHSA 221 (Abb. 8) führten. Hefezellen (LL 20; Leu 2–⁺ 112, His 3–11, 15; Storm u. a., ebenda) wurden entweder durch die Sphäroplast-PEG-Methode von Beggs, J. D. (Nature 275, 104 [1978]) oder durch die Methode von Ito, H. u. a. (J. Bacteriol. 153, 163 [1983]) transformiert. Die rekombinanten Hefezellen wurden auf der Grundlage ihres His[–], Leu[–]-Phänotyps ausgewählt und auf das Vorhandensein der transformierenden Plasmide durch erneutes Isolieren dieser Plasmide aus 10-ml-Kulturen nach der Methode von Holm u. a. (Gene 12, 169 [1986]) und Analysieren ihrer Struktur durch Schneiden mit Restriktionsenzymen und Elektrophorese auf Agarose-Gel (1 %) getestet. Die rekombinanten Hefezellen enthielten in jedem Fall transformierende Expressionsvektorplasmide in der entsprechenden Größe und Struktur. Diese Zellen wurden in einem YNB-Medium (Difco) gezogen, das 2 % Glukose und 0,15 % KH₂PO₄ enthielt bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 2,0, geerntet und in ein YNB-Medium mit niedrigem Phosphatgehalt (das 30 mg

KH_2PO_4 je Liter zur Aktivierung des PHO5-Promoters enthält) verdünnt, dann wurden sie erneut über 60 Stunden gezogen, bevor sie geerntet wurden (OD_{600} -Wert $\sim 2,0$). Die Zellen wurden dann mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer gewaschen, in einem hundertstel Volumen des gleichen Puffers, der 1 % Triton X-100, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) enthielt, wieder zur Suspension gebracht und durch Wirbeln mit Glaskugeln (Sigma, Typ IV, 250–300 μm) gebrochen. Als Alternative dazu wurden die Zellen gewaschen und in 1 M Sorbitol wieder zur Suspension gebracht und mit β -Glukuronidase (Boehringer, 1%iger Lösung) in 100 mM β -Merkaptoethanol bei 30 °C inkubiert, um Protoplasten herzustellen, die dann mit 1 % Triton X-100 lysiert wurden. Zellextrakte wurden durch Zentrifugieren bei 10000 Umdrehungen/min für die Dauer von 15 min geklärt, was die sogenannte „periplasmische Fraktion“ ergab, in welcher HSA durch folgende immunologische und elektrophoretische Methoden analysiert und geprüft wurde

ELISA-Mikrotest

Die ELISA-Platten wurden mit Anti-HSA-Ab (aus Pferdeserum gereinigt, ein Erzeugnis von HUMAN, Ungarn, auf Protein A-Sepharose 4B-Kolonnen) überzogen und mit 0,5 % Gelatine (Sigma) gesättigt. In geeigneten Verdünnungen wurden 100 μl des geklärten Hefezellenextraktes auf die überzogenen Vertiefungen aufgebracht und eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die HSA-Anti-HSA-Ab-Bindung wurde durch eine herkömmliche Farbreaktion unter Verwendung des biotinylierten Meerrettichperoxidase-Streptavidin-Komplexes, H_2O_2 als Substrat und Ortho-Phenylendiamin als Entwickler überwacht. Serienverdünnungen von 2 μg bis 15 μg an gereinigter HSA (Reanal, Ungarn) je Vertiefung wurden zur Eichung als Referenz verwendet. Eine tausendfache Verdünnung des menschlichen Serums wurde als positive Kontrolle verwendet, gelatineüberzogene Vertiefungen sowie Extrakte von nichtrekombinanten Hefezellen (LL 20, wie für die HSA-Analyse bearbeitet) dienten als negative Kontrollen bei den ELISA-Mikrotests. Die Farbreaktionen wurden in einem Mikroplattenlesegerät der Cambridge Life Sciences Ltd., Großbritannien, ausgewertet.

Immunoausfällung von ^{35}S -methioninmarkierten Proteinen

Die Ganzzellenproteine der rekombinanten Hefezellen wurden 16 Stunden lang bei 30 °C mit ^{35}S -Methionin markiert, wozu die Hefezellen in einem YNB-Medium mit „niedrigem Methionin-, niedrigem Phosphatgehalt“, das 40 μCi an ^{35}S -Methionin je Milliliter enthielt, kultiviert wurden.

Zu 10^8 -Zelläquivalenten von geklärten Zellysaten (0,5 ml) wurden 20 μl Pferde-Anti-HSA-Serum über die Dauer von 90 Minuten bei 4 °C in 0,1 M Phosphatpuffer, pH-Wert 8,0, gegeben. Die Immunoausfällungen wurden auf 1 ml Protein A-Sepharose (Pharmacia) über 90 Minuten bei 4 °C adsorbiert und gewaschen. Immunoausgefällte Proteine wurden aus Protein A-Sepharose-Kugeln (Conner, G. E. u. a., J. Exp. Med. 156, 1475, 1982) eluiert und auf einem 15%igen SDS-Polyakrylamid-Gel aufgelöst und fluorographiert. Geklärte Extrakte von ^{35}S -methioninmarkierten, nichtrekombinanten LL 20-Zellen und die eines rekombinanten Hefestammes, der das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) exprimiert, wurden als Kontrollen verwendet.

Ergebnisse

Die Hefezellen, die mit den Plasmiden pBY2/HSA Nr. 1 und pYHSA 221 transformiert wurden, wiesen eine aktive Produktion des HSA-Proteins auf, die leicht durch den ELISA-Test festgestellt werden und mit einem spezifischen, gegen HSA gerichteten Antiserum ausgefällt werden konnte.

Nach dem ELISA-Mikrotest lag der Anteil von HSA zwischen 3 und 8 % des gesamten Zellproteins.

Abb. 10 zeigt das Fluorograph der ^{35}S -methioninmarkierten Proteine, die aus der periplasmischen Fraktion gewonnen und mit Ziegen-Anti-HSA-Serum immunoausgefällt und in SDS-Polyakrylamid-Gel aufgelöst wurden.

Spur M – ^{14}C -Proteinmolekulargewichtsmarkermix (BRL);

Spur A – rekombinantes ^{35}S -HBsAg, ausgefällt mit Anti-HBsAg-Antikörpern;

Spur B – markiertes HSA, produziert in der Rekombinanthe, ausgefällt mit Anti-HSA-Serum;

Spuren C und D zeigen das Fehlen von Querimmunoreaktionen des Anti-HSA-Serums mit dem HBsAg-haltigen Hefelysat bzw. des Anti-HBsAg-Serums mit dem HSA-Lysat.

Die elektrophoretische Mobilität des immunoausgefällten HSA war etwa die gleiche wie die des 67-kD-markierten Proteinmarkers. Dieses Ergebnis weist daraufhin, daß die Mehrheit des HSA-Proteins, das durch die

Expressionsvektorkonstruktion mit dem vollständigen Signalpeptid des PHO5-Gens in den periplasmischen Raum sekretiert wird, korrekt verarbeitet wird, was zu einem Proteinprodukt mit der Größe des reifen (natürlichen) HSA führt.

Zwei unabhängige Immunübertragungsexperimente (Western-Transfers) zeigten ein Protein von derselben Molekularmasse.

Reinigung des exprimierten HSA von Hefekulturen im Labormaßstab

Eine 500-ml-Kultur von Hefezellen, die mit pBY2/HSA oder pYHSA 221 transformiert worden waren, wurde bei 30 °C auf einen OD_{600} -Wert von 2,0 (in der Regel 24 bis 28 Stunden) in einem 0,67%igen YNB-Medium (Difco) gezogen, das 0,15 % (Gew./Vol.) KH_2PO_4 , 20 mg/l L-Histidin und 2 % (Gew./Vol.) Glukose enthielt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei $2000 \times g$ für die Dauer von 5 min aufgefangen und erneut in 10 l 0,67%igen (Gew./Vol.) YNB-Medium zur Suspension gebracht, das 30 mg/l KH_2PO_4 , 0,1 % (Gew./Vol.) KCl, 20 mg/l L-Histidin und 2 % (Gew.-Vol.) Glukose enthielt. Nach 60 Stunden Kulturwachstum (auf $\text{OD}_{600} = 1,8\text{--}2,0$) wurden die Zellen durch Zentrifugieren ($4000 \times g$, 5 min) geerntet, zweimal mit eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen und erneut in 200 Milliliter 0,1 % Triton X-100, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH-Wert 7,5, 100 mM β -Merkaptoethanol und 1 mM PMSF zur Suspension gebracht. Die Zellen wurden 60 s lang in einem vorgekühlten Glaskugel-Zellhomogenisator (Modell: Braun MSK) homogenisiert. Der Zellextrakt wurde durch schnelles Zentrifugieren (mit $20000 \times g$, 4 °C, bei einer Dauer von 30 min) geklärt. Der pH-Wert des geklärten Lysats wurde (durch den tropfenweisen Zusatz von 1 M HCl) auf 4,8–5,0 abgestimmt, dann wurde eine gesättigte Lösung von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Endkonzentration von 60 % Sättigung zugesetzt. Das Gemisch wurde 2 Stunden lang in einem Eiswasserbad gerührt, dann 30 Minuten bei 18000 U/min (2 °C) in einer Sorvall-Zentrifuge RC-5C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml von 50 mM Bis-Tris-Puffer, pH-Wert 6,5, aufgelöst, gefolgt von einer über Nacht durchgeführten Dialyse anhand von 20 Volumen des gleichen Puffers. Das dialysierte Lysat wurde 30 min lang zentrifugiert (18000 U/min, 2 °C), und die klare, obenaufschwimmende Schicht wurde auf eine Kolonne Superose MONO Q HR 5/5 (Pharmacia) gebracht, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert worden war.

Die Anionenaustauschchromatographie sowie alle anschließenden chromatographischen Reinigungsschritte wurden auf einem FPLC-System von Pharmacia ausgeführt.

Nach einem kurzen linearen Gradienten von NaCl (0,0–0,1 M) wurden Proteine, eluierend mit 0,1 M NaCl (isokratisches Eluieren!), aufgefangen und anhand von 0,05 M Na-Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, dialysiert. Diese Fraktion wurde der hydrophoben Wechselwirkungschromatographie auf einer Alkyl-Superose HR 5/5-Kolonne unterzogen.

Der obigen dialysierten Fraktion wurde festes Natriumsulfat zugesetzt, wobei die Endkonzentration auf 2,0 M abgestimmt wurde, und die Probe wurde auf die Alkyl-Superose HR 5/5-Kolonne gegeben, die mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Na-Phosphatpuffer äquilibriert wurde. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit abnehmender Konzentration eluiert. Die HSA-haltige Fraktion wurde bei etwa 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert, was durch SDS-PAGE der eluierten Fraktionen überwacht wurde.

Gel-Filtrierung

Die „HSA“-Fraktion aus dem vorausgegangenen Schritt wurde durch Ultrafiltrierung in einer Amicon-gerührten Zelle (Filter: PM-30) konzentriert, dann auf eine Superose-Kolonne 12 HR 10/30 gebracht, die mit 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH-Wert 7,5, welche 0,15 M NaCl enthielt, äquilibriert worden war. Die erste große Spitze nach der Gel-Filtrierung enthielt stark gereinigtes monomeres HSA, wie durch SDS-PAGE nach Laemmli, U. K., Nature 227, 680 (1970), getestet wurde. Zusätzliche Analysen schlossen PAGE-Untersuchungen unter „natürlichen“ Bedingungen, IEF und begrenztes Schneiden mit CNBr (Barsh, G. S. und Byers, P. H., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5142–5146) ein.

Molekulareigenschaften von HSA, das aus Rekombinanthefe gereinigt wurde

Es wurde gezeigt, daß das aus Hefezellen gereinigte HSA als einzelnes 68 Kilodalton-Proteinband in SDS-Polyakrylamid-Gelen läuft, was darauf hinweist, daß es die gleiche Molekularmasse wie reifes, natürliches HSA hat.

Elektrophorese unter natürlichen Bedingungen (ausgeführt auf 10–15%igen PHAST-Gels von PHARMACIA nach den Anweisungen des Herstellers) zeigte, daß das Verhalten der durch Hefe produzierten HSA ähnlich dem des natürlichen, reifen HSA war und daß es auch eine ähnliche Tendenz zur Bildung von Doppel-, Dreifach- und Multimerkomplexen hat, wahrscheinlich durch die zufällige Bildung von intermolekularen S-S-Brücken.

Das Fehlen von Glykosylation bei in Hefe produziertem HSA

wurde durch Con A-Sephrose-Chromatographie bewiesen:

Man ließ 500 µg eines partiell gereinigten Proteinextraktes, der aus HSA-produzierenden Hefezellen gewonnen worden war, sich an 750 µl gequollene Con A-Sephrose (Pharmacia) in 1,5 ml Puffer binden, der 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,4, und 0,5 M NaCl enthielt. Die Suspension wurde bei 4°C langsam über Nacht geschüttelt, und die Con A-Sephrose wurde vom Puffer (der ungebundene Proteine enthielt) getrennt, dazu wurde 10 min lang bei 12000 × g zentrifugiert. Dann wurde das Con A-Sephrose-Gel mit 100 ml des gleichen Puffers durch Filtern durch einen 25-mm-Kreis eines Whatman-GF/A-Filters gewaschen.

Die gebundenen Proteine wurden durch einen Puffer eluiert, der 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 6,8, 0,25 M D-Methylmannosid (Serva) und 0,25 M NaCl enthielt.

Die ungebundenen und die gebundenen (an Con A-Sephrose) Proteinfractionen wurden anhand von 10 mM Tris-HCl (pH-Wert 6,8) dialysiert und 1) einer SDS-PAGE-Untersuchung nach Laemmli, U. K. (Nature 227, 680 [1970]) und 2) einem ELISA-Test unterzogen, um das Vorhandensein von HSA zu kontrollieren. Ein ähnliches Verfahren wurde bei einer Fraktion gereinigtem HSA angewendet.

In beiden Fällen zeigten die SDS-PAGE- und ELISA-Tests in der Fraktion von Con A-bindenden Proteinen das Fehlen jedes 68 kD-Proteins sowie von allen Proteinen mit immunologischen Reaktionen mit Anti-HSA-Antikörper. Das HSA wurde quantitativ aus der Proteinfraction gewonnen, die sich bei Einsatz der Probe nicht an Con A-Sephrose gebunden hat.

Aus den Ergebnissen läßt sich stark auf das Fehlen von Glykosylation in den HSA-Molekülen, die in Hefe produziert wurden, schließen.

Vor der Peptidkartierung durch begrenzte Proteolyse wurden die Proben bei Vorhandensein von 0,5% (Gew./Vol.) SDS ohne den Zusatz eines Reduzierungsmittels wärmedenaturiert und für die Dauer von 10 bis 20 Minuten enzymatischen Verdauungen unterzogen. Gearbeitet wurde mit Subtilisin, Thermolysin, Trypsin und Papain. Das Schneiden mit CNBr wurde so ausgeführt wie das von Barsh u. a. (ebenda) beschrieben wurde.

Abb. 12 zeigt das Schneidemuster mit CNBr von natürlichem HSA (A und C) (in der oben beschriebenen Weise aus kommerziellen Quellen gereinigt) und von hefeproduziertem HSA (B und D), wie es durch die SDS-PAGE-Trennung von geschnittenen Polypeptiden demonstriert wird. Nach der Verdauung wurden SDS und β-Merkaptoethanol auf Konzentrationen (Gew./Vol.) von 2,5% bzw. 10% zugesetzt. Die Proben wurden auf ein PHAST-Gel (Pharmacia) mit einem Gradienten von 8–25% gebracht, und die Elektrophorese wurde nach den Anweisungen des Herstellers in einem PHARMACIA-PHAST-System durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse zeigen, daß das aus Rekombinanthefe gereinigte HSA-Schneidemuster durch proteolytische Enzyme und Zyanogenbromid aufweist, die denen von natürlichem HSA ähnlich sind (wobei die Anmerkung zu machen ist, daß hefeproduziertes HSA unter den angewendeten Bedingungen weniger zugänglich für die Papainverdauung als natürliches HSA ist).

Eine Probe des aus Hefe gereinigten HSA wurde der N-Terminalsequenzierung auf einem Gasphasensequenziergerät von Applied Biosystems, Modell 470A, unterzogen. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte keine anderen Aminosäurereste als die erwarteten.

Konstruktion von Plasmidvektoren, welche die Sekretion von HSA in das Kulturmedium fördern

Die experimentelle Strategie für die Konstruktion neuer Expressionssekretionsvektoren basierte auf der Feststellung, daß Prä-pro-HSA in vitro durch Hefeendopeptidase KEX2 korrekt verarbeitet wird und reifes Asp-Ala-HSA ergibt (Bathurst, I. C. u. 1., 1987, Science, 235, 348–350). Das natürliche N-Terminal-HSA-Präpro-Führungspeptid wurde als eine Folge bestimmt, welches die Sekretion von HSA aus der Rekombinanthefe fördern kann.

Die Folge der 103-meren synthetischen DNA-Fragmentkodierung für das HSA-Präpro-Führungspeptid wurde folgendermaßen aufgebaut:

GATCAAAAACACTAAAATATAATCAAA												
					M	K	W	V	T	F		
					Met	Lys	Trr	Val	Thr	Phe		
					ATG	AAG	TGG	GTT	ACT	TTC		
I	S	L	L	F	L	F	S	S	A	Y	S	R
Ile	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Arg
ACC	TCT	TTG	TTG	TTC	TTG	TTC	TCT	TCT	GCT	TAC	TCT	AGA
G	V	F	K	R								
Gly	Val	Phe	Lys	Arg								
GGT	GTT	TTC	AAG	AGG	CCT	G						
				Stu 1								

Die Sequenz (27 Nukleotide) flüßaufwärts des ATG-Kodons wurde so aufgebaut, daß sie dem flüßabwärts gelegenen Ende eines starken, konstitutiven Hefepromotors eng homolog ist, d. h., dem der Genkodierung für Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH; Holland, J. P. und Holland, M. J., 1979, J. Biol. Chem. 254, 9839-9845). Zu den weiteren charakteristischen Merkmalen der oben genannten DNA-Sequenz gehören die Nutzung der häufigsten Hefekodone sowie einer „idealen“ KEX2-Schneidestelle (K-R; Kurjan, J., Hershkowitz, I., 1982, Cell 30, 933-943), die durch die AAG AGG-Kodone kodiert wird, welche – nach dieser Konstruktion – mit einer Stu I-Restriktionsendonukleaseverdauungsstelle zusammenfallen.

1. Konstruktion des Plasmids pHSA-T mit dem Gen für HSA Nr. 1 und dem Hefe-His3-Transkriptionsterninator

Das 1,8kb-Hind III-Sac I-Fragment von pHSA Nr. 1 (d. h., das für HSA kodierende Gen) wurde mit dem 3-229TK^o (Abb. 3b) an den Stellen Hind III und Sac I kloniert. Vor diesem Klonierungsschritt wurde die Pst I-Stelle (die sich im His3-Terminatorbereich befindet) deletiert, da sie nach der Einfügung des HSA-Gens doppelt würde. Es wurden 0,5µg pGB23-229TK^o mit 10 Einheiten Pst I in 20 Mikroliter eines Puffers mit mittlerem Salzgehalt bei 37°C zwei Stunden lang behandelt. Nach der Extraktion mit Phenol und der Ausfällung mit Ethanol wurde das Pellet in 50µl Klenow-Puffer aufgelöst, der 0,1mM dNTP und 2,5 Einheiten Klenow-Polymerase enthielt, und das Reaktionsgemisch wurde 40min bei Zimmertemperatur gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt. Das DNA-Pellet wurde in 100µl Ligasepuffer aufgelöst, und es wurden 50 Einheiten T4-DNA-Ligase zugesetzt. Die Ligasereaktion wurde 15 Stunden lang bei 15°C durchgeführt, anschließend erfolgte die Transformation von E. coli JM 109. Plasmide (von etwa 30% aller Transformanten) ohne Pst I-Stelle (die als pGB3T bezeichnet wurden) wurden ausgewählt und folgendermaßen für die Einfügung des HSA-Gens verwendet:

- Es wurden 2µg mit 10 Einheiten Sac I in Puffer mit niedrigem Salzgehalt bei 37°C über die Dauer von 4 Stunden in einem Endvolumen von 20µl verdaut. Dann wurde der Puffer auf das Optimum für die Hind III-Verdauung abgestimmt, es wurden 10 Einheiten Hind III zugesetzt (Endvolumen 40µl), und die Behandlung wurde für weitere 4 Stunden bei 37°C fortgesetzt. Der 2,06kb-Vektor wurde in 0,8% Agarose-Gel abgetrennt.
- Wie oben beschrieben, wurden 5µg pHSA Nr. 1 durch Sac I und Hind III verdaut. Das 1,8kb-HSA-Fragment wurde aus 0,8% Agarose-Gel isoliert.
- Die Ligation des 2,06kb-pGB3T-Vektors und der 1,8kb-HSA-Einfügung wurde in 20µl Ligationsgemisch (das 80 Einheiten T4-DNA-Ligase enthielt) bei 15°C für die Dauer von 16 Stunden durchgeführt. E. coli JM109-Zellen (Yanisch-Perron, C. u. a., ebenda) wurden transformiert. Plasmide, die aus Tetracyclin-sensitiven Transformanten isoliert wurden, wurden auf ihr Restriktionsenzymverdauungsmuster geprüft, durch Doppelverdauung mit Sal I und Xho I. Das resultierende Plasmid wurde als pHSA-T bezeichnet (Abb. 11).

2. Einfügung eines starken, konstitutiven Promoters und der künstlichen Präpro-Führungssequenz in pHSA-T; Konstruktion des Plasmids pGprepro*HSA-T (Abb. 11)

a) Klonierung der künstlichen Präpro*-Führungskodierungssequenz flüßabwärts des GAPDH-Promoters. Es wurden 0,5µg M13/GPD-3-(RF)-DNA (Bitter, G. A. und Egan, K. M. [1984], Gene 32, 263-274) mit 5 Einheiten von Eco RI in Puffer mit mittlerem Salzgehalt bei 37°C für die Dauer von 2 Stunden behandelt, gefolgt von der Verdauung durch 5 Einheiten an Bam HI für weitere zwei Stunden bei 37°C in einem Puffer mit hohem Salzgehalt. Die Verdauungen wurden durch Phenolextraktion und Ethanolausfällung beendet. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 5µl H₂O zur Ligasereaktion mit dem künstlichen HSA-Präpro-Führungselement aufgelöst. Das Ligationsgemisch enthielt die mit Eco RI-Bam HI-behandelte M13/GPD-3-DNA, 1 pMol des synthetischen doppelsträngigen 103-meren DNA-Fragments (mit der Kodierung für das Präpro*-Führungselement) und 80 Einheiten T4-DNA-Ligase in 15µl Ligasepuffer. Die Ligasereaktion wurde bei 15°C über 16 Stunden ausgeführt, anschließend wurden E. coli JM 109 transformiert.

Die Phagtransformanten wurden auf die Inserten des 103-meren Bam HI^o-Eco RI-Präpro*-Führungskodierungsfragmentes nach der Dideoxynukleotidsequenzierungsmethode gesichtet.

Die Transformanten, welche die HSA-Präpro*-Führungskodierungssequenz hinter dem GAPDH-Promoter enthielten, wurden als M13/Gprepro*KR bezeichnet (Abb. 11). („KR“ bezeichnet Lys-ARG und G steht für den GAPDH-Promoter).

Klonierung des HSA-Gens hinter der GAPDH-Promoter-Präpro*-Sequenzfusion: Konstruktion des pGprepro*HSA-T

- pHSA-T wurde mit Pst I 0,5µg DNA, 5 Einheiten Pst I, 4 Stunden bei 37°C verdaut, und das geschnittene, 3'-überstehende Ende wurde durch Behandlung mit Klenow-Polymerase glatt gemacht. Das linearisierte Plasmid wurde dann weiter mit 5 Einheiten Hind III (4 Stunden bei 37°C) geschnitten, gefolgt von der Extraktion mit Phenol und der Ausfällung mit Ethanol.
- Die Sequenz GAPDH-Promoter + künstliche Präpro*-Führungskodierung wurde aus M13/Gprepro*KR durch gleichzeitige Verdauung von 5µg Plasmid-DNA mit 20 Einheiten Hind III und 20 Einheiten Stu I (5 Stunden bei 37°C in Puffer mit mittlerem Salzgehalt) isoliert. Das 0,75kb-Promoter + prepro*-Fragment wurde durch Elektrophorese in 1% Agarose-Gel isoliert, elektroeluiert, mit Phenol extrahiert und mit Ethanol ausgefällt.

c) Das gereinigte Promoter + prepro*-Fragment wurde in den mit Pst I (glatt) -Hind III-behandelten Vektor pHSA-T ligiert (in einem 20- μ l-Gemisch, bei 15°C für die Dauer von 16 Stunden), gefolgt von der Transformation von E. coli JM 101. Das resultierende Plasmid, pGprepro HSA-T (Abb. 11) wurde durch Kartierung der Restriktionsendonukleaseschneidestellen getestet.

Konstruktion des Hefe-E. coli-Schaukelvektors mit der prepro*-HSA-Expressionssektretionskassette

Die prepro*-HSA-Expressionskassette wurde aus pGprepro*-HSA-T isoliert (durch Hind III- + Xho I-Verdauung, 2 μ g DNA in 20 μ l Puffer mit hohem Salzgehalt, 10 Einheiten Hind III und Xho I, bei 37°C für die Dauer von 10 Stunden, gefolgt von der elektrophoretischen Trennung auf einem 0,8%igen Agarose-Gel, der Elektroelution, der Phenolextraktion und der Ethanolausfällung). Das Fragment Hind III-Xho I wurde dann in pJDB 207 (zwischen den Stellen Hind III und Sal I) ligiert, was zu YEprepro*HSA (Abb. 11) führte, das zur Transformation von Hefe LL20 verwendet wurde. Hefetransformanten wurden auf YNB-Agar-Platten (ohne Leuzin) ausgewählt.

Die Expression und Sekretion von HSA wurde in Schüttelflaschenkulturen getestet, wie das unten beschrieben wird.

Expression und Sekretion von HSA durch Rekombinanthefe, die mit pYEprepro*HSA transformiert wurde (YEprepro*-HSA)

Eine einzelne Kolonie von Hefe-YEprepro*HSA wurde in 10 ml YNB-Medium geimpft, das 2% Glukose und 200 μ g/ml Histidin enthielt, und die Zellen wurden über Nacht bei 30°C unter ständigem Schütteln gezogen. Ein Milliliter der Über-Nacht-Kultur wurde in 200 ml des oben genannten Mediums verdünnt und weiter auf einen OD⁶⁰⁰-Wert = 2,0 gezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (6000 U/min, 4°C, 15 min) ausgefällt, die obenaufschwimmende Schicht wurde abgenommen und unter Verwendung einer gerührten Amicon-Ultrafiltrationszelle mit einem PM-30-Filter zehnfach konzentriert. Das konzentrierte Zellmedium wurde dann über Nacht anhand von 20 mM Tris/Glyzin, pH 8,3, 1 mM EDTA, 5 mM β -Merkaptoethanol und 0,01% SDS dialysiert.

Das sekretierte HSA wurde durch quantitative E₁-HSA-Mikrountersuchung bestimmt, wie das oben beschrieben wurde.

Es wurde festgestellt, daß von dem Hefezellen-YEprepro HSA wenigstens 3000 μ g HSA je 100 ml Kulturmedium produziert wurde.

Das sekretierte HSA wurde der SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese unterzogen, gefolgt vom Immunotransfer und der Färbung nach herkömmlichen Methoden.

Es wurde gezeigt (Abb. 13), das reife HSA (68 kd) zwar das Hauptprodukt im Kulturmedium war, daß aber auch ein Fragment von HSA mit einer Molekularmasse von 46–48 kd festgestellt wurde, welches etwa 1/3 des gesamten produzierten HSA darstellt. Das reife HSA zu 68 kd konnte leicht durch eine Reihe chromatographischer Schritte und Gel-Filterung (auf Superose 12 HR¹⁰/30) gereinigt werden, wie das oben in Verbindung mit der Reinigung des exprimierten HSA von Hefekulturen im Labormaßstab beschrieben wurde.

FIG.1

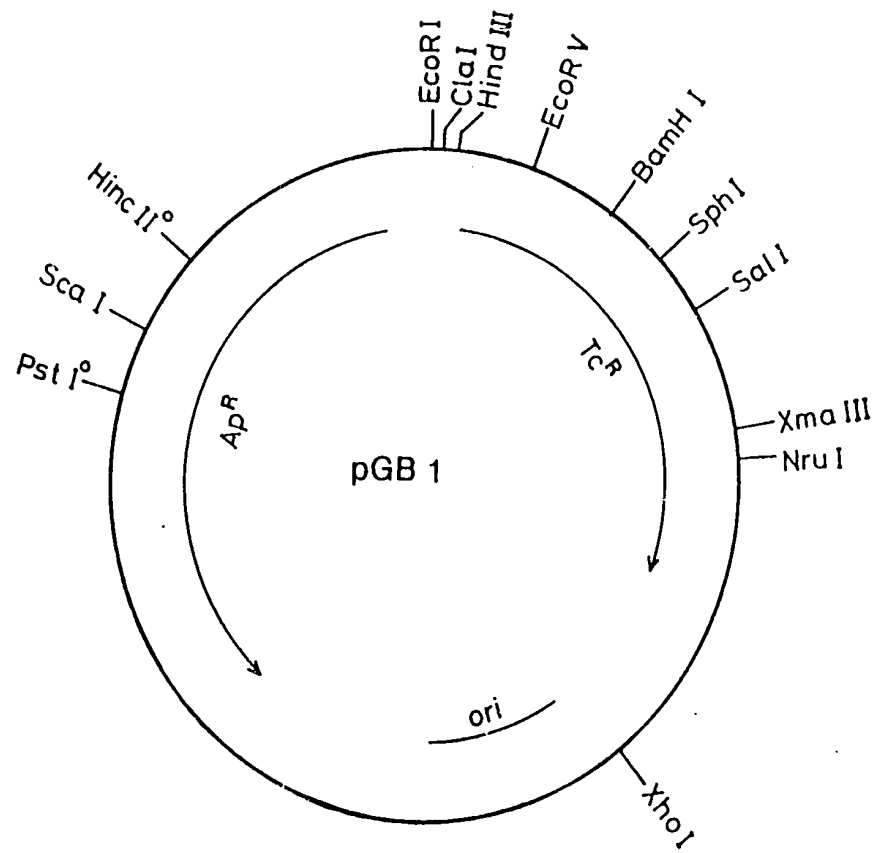


FIG. 2

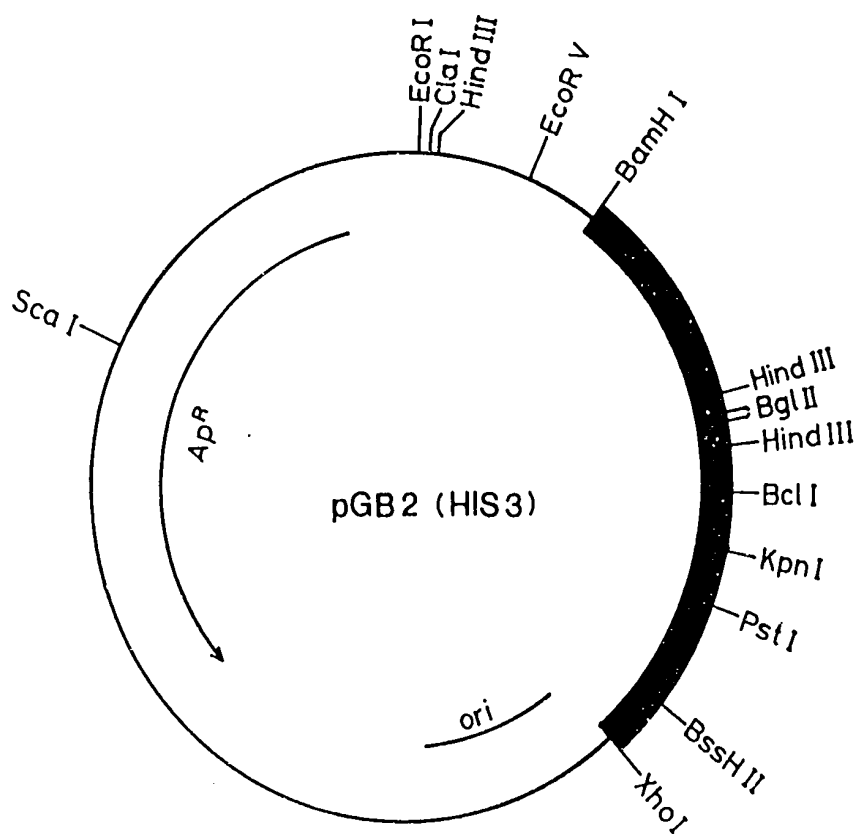


FIG. 3

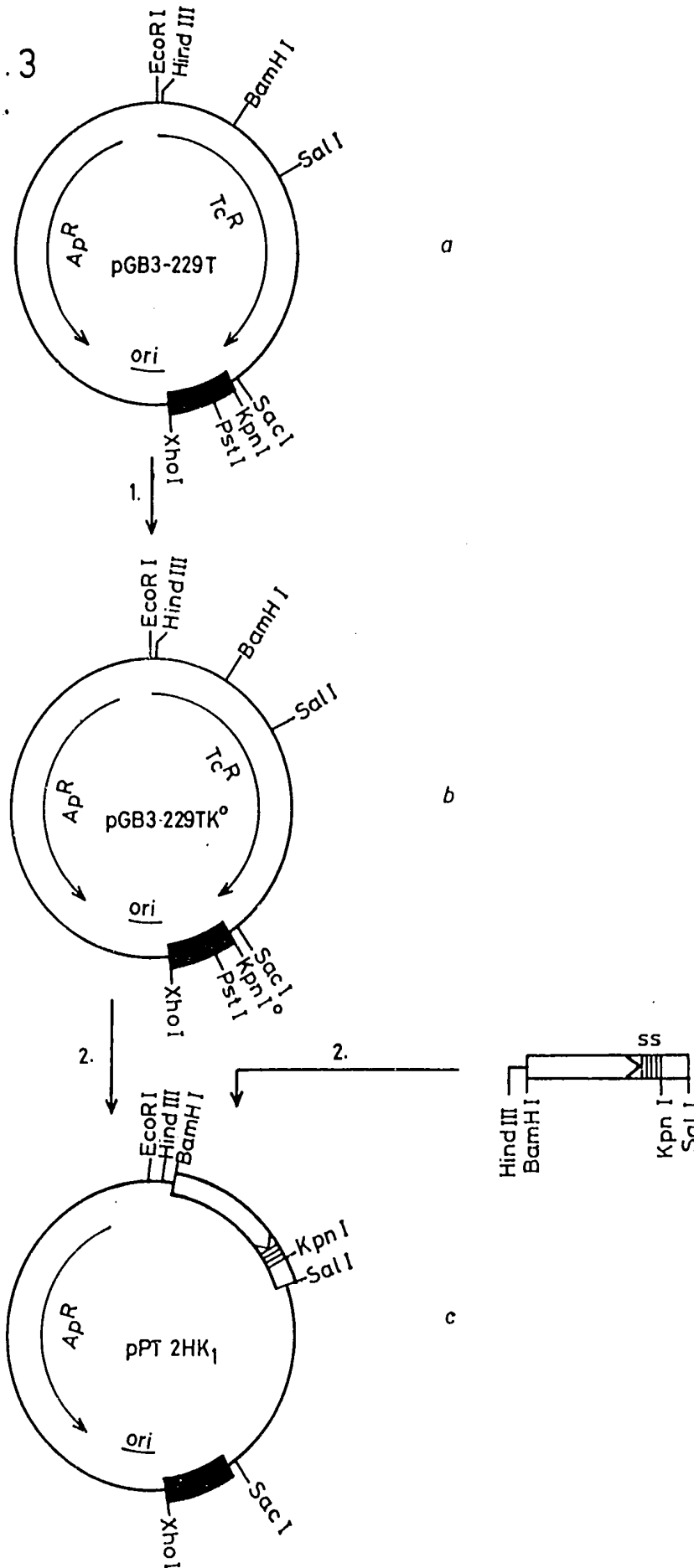


FIG.4

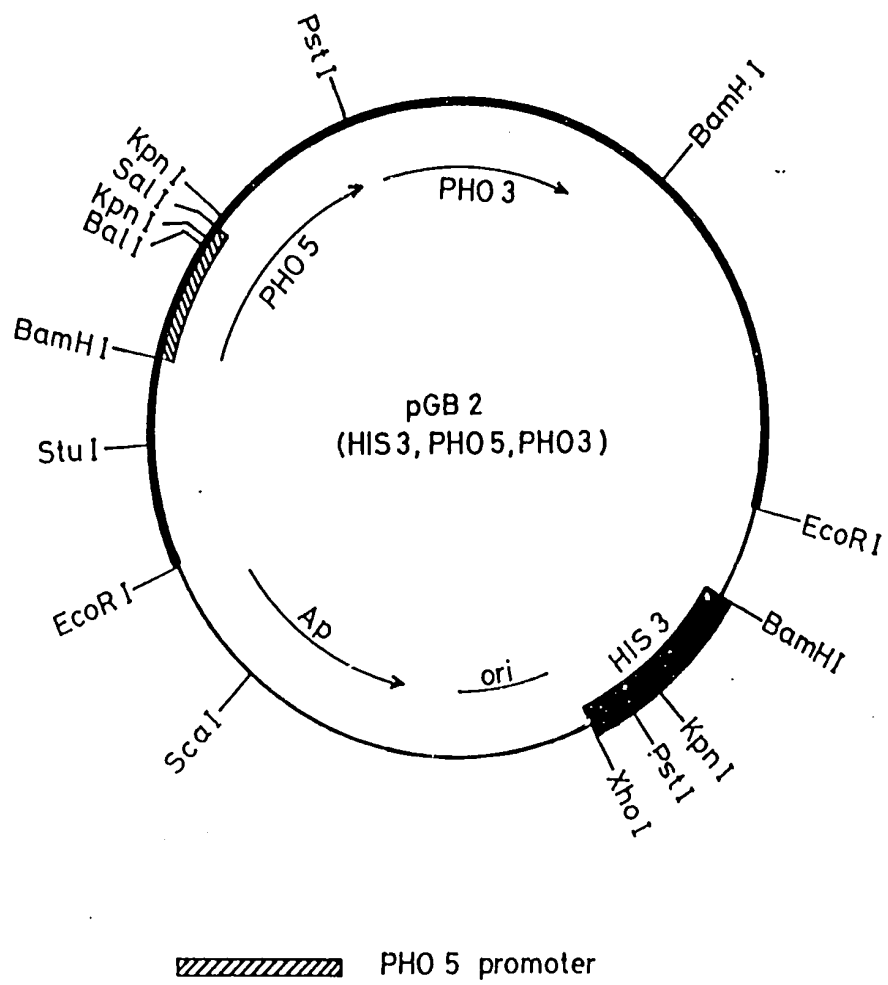


FIG.5

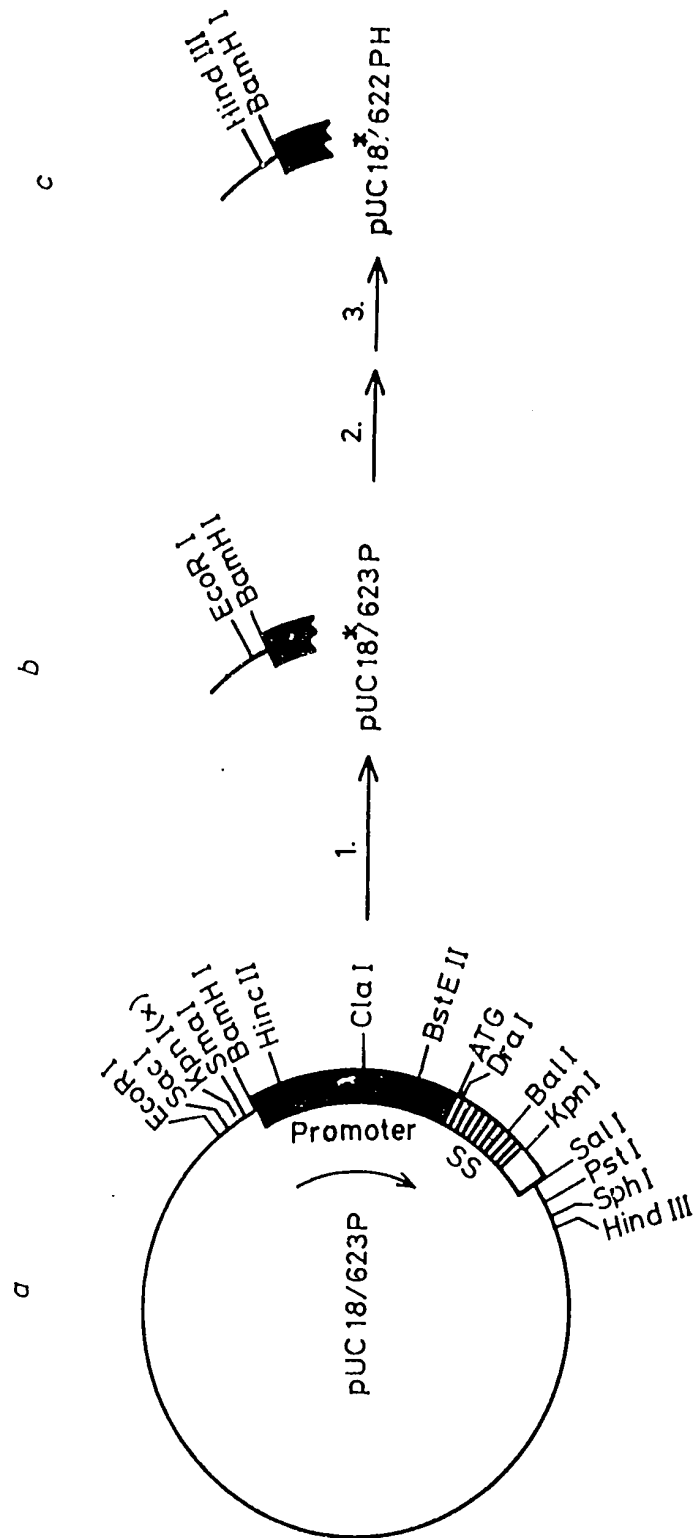


FIG. 6

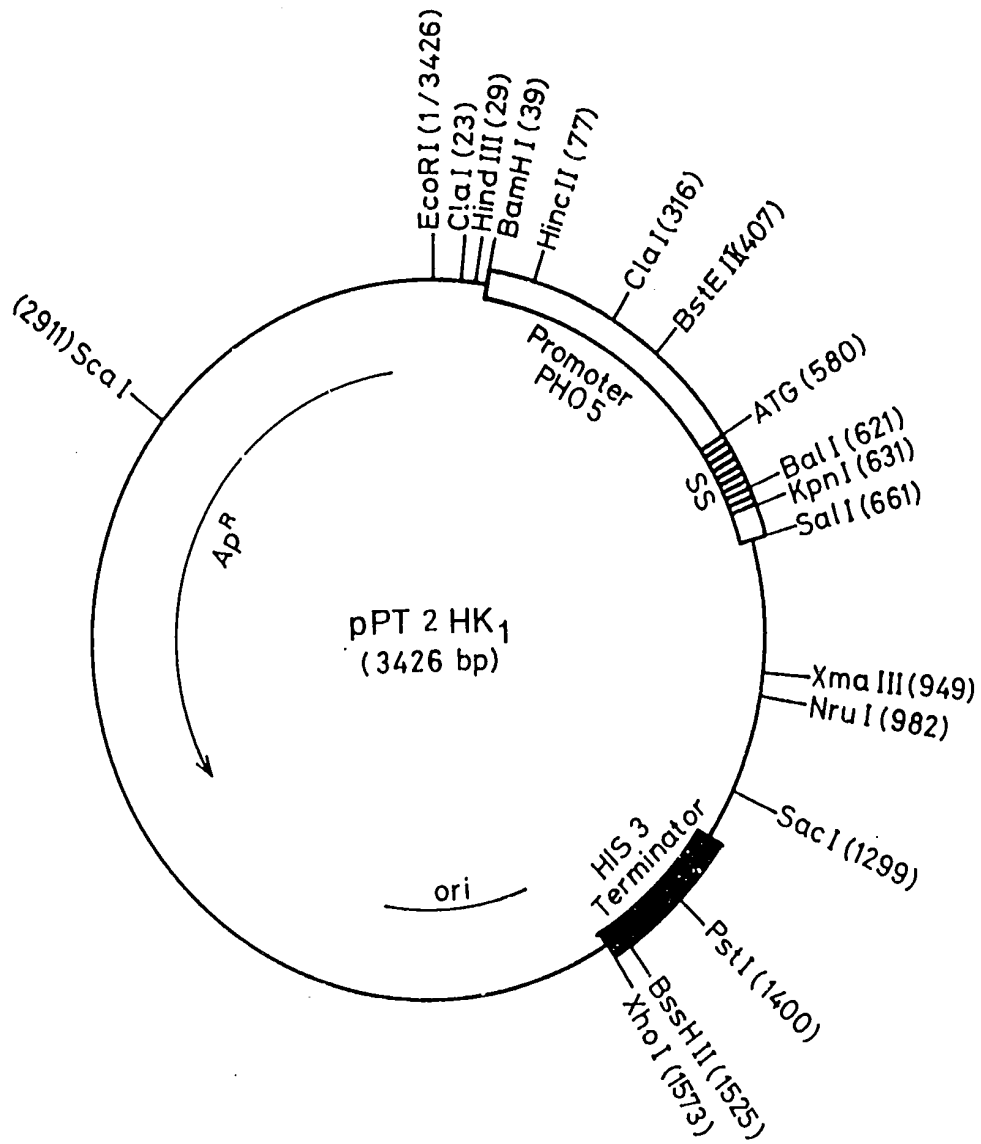
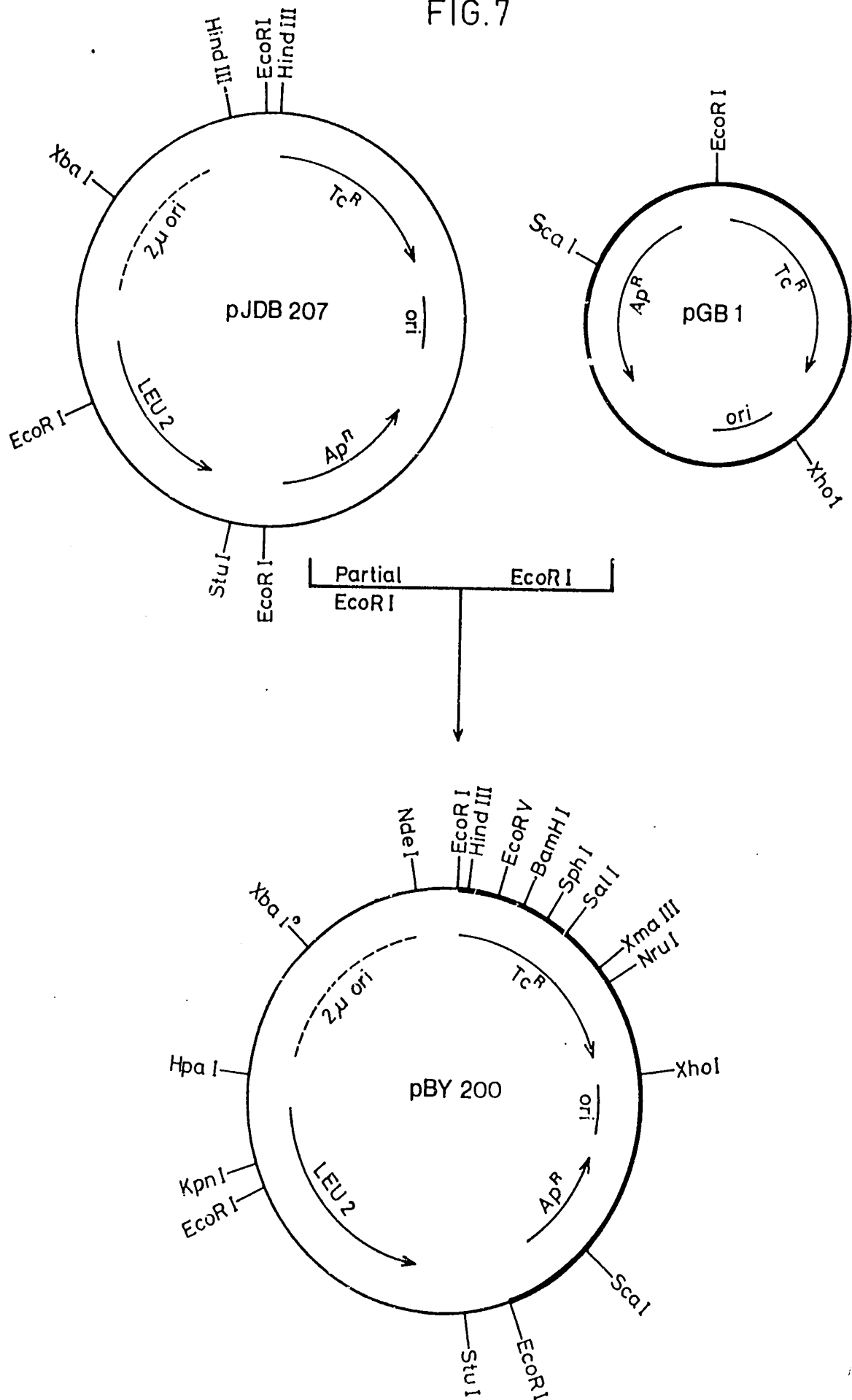


FIG. 7



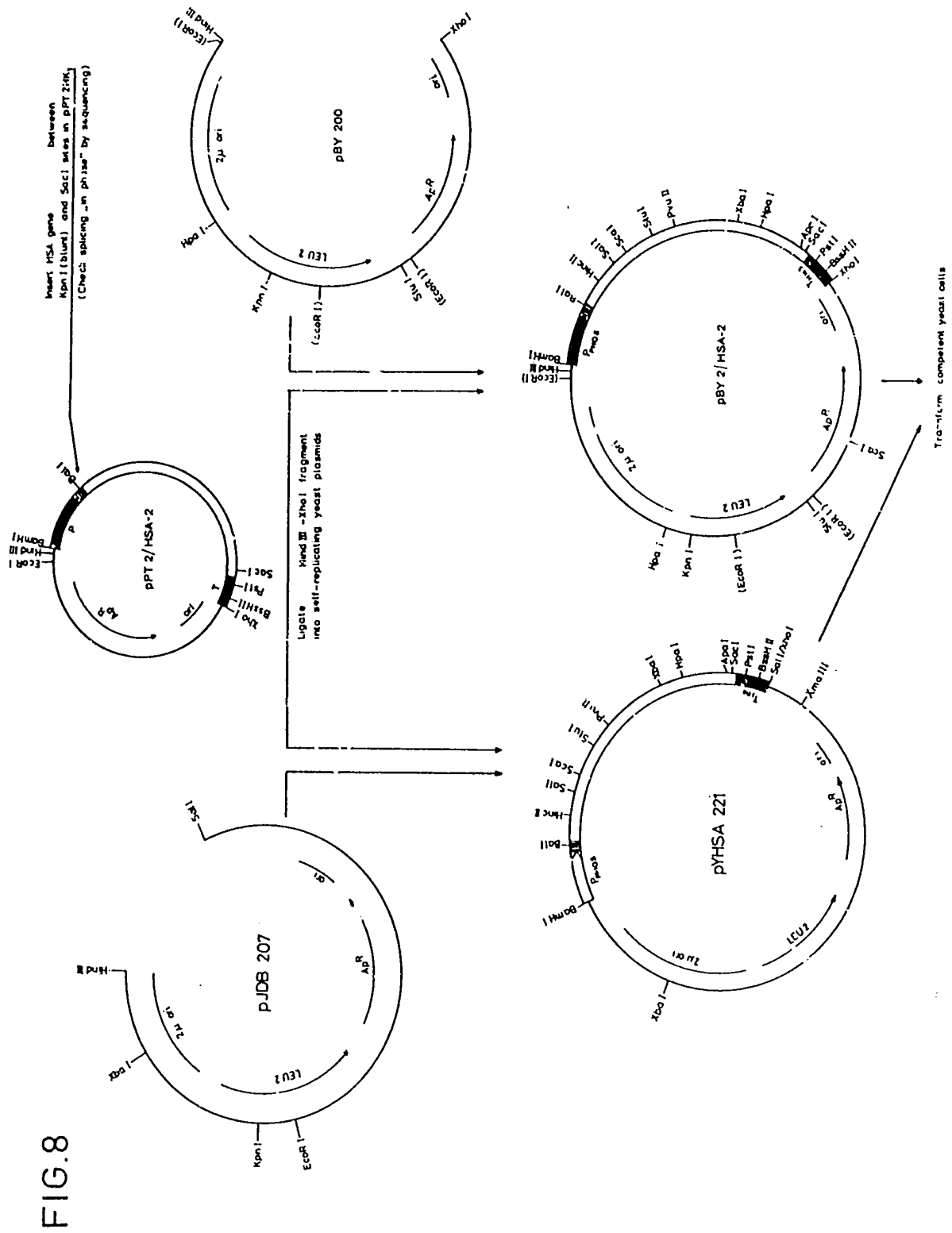


FIG.9

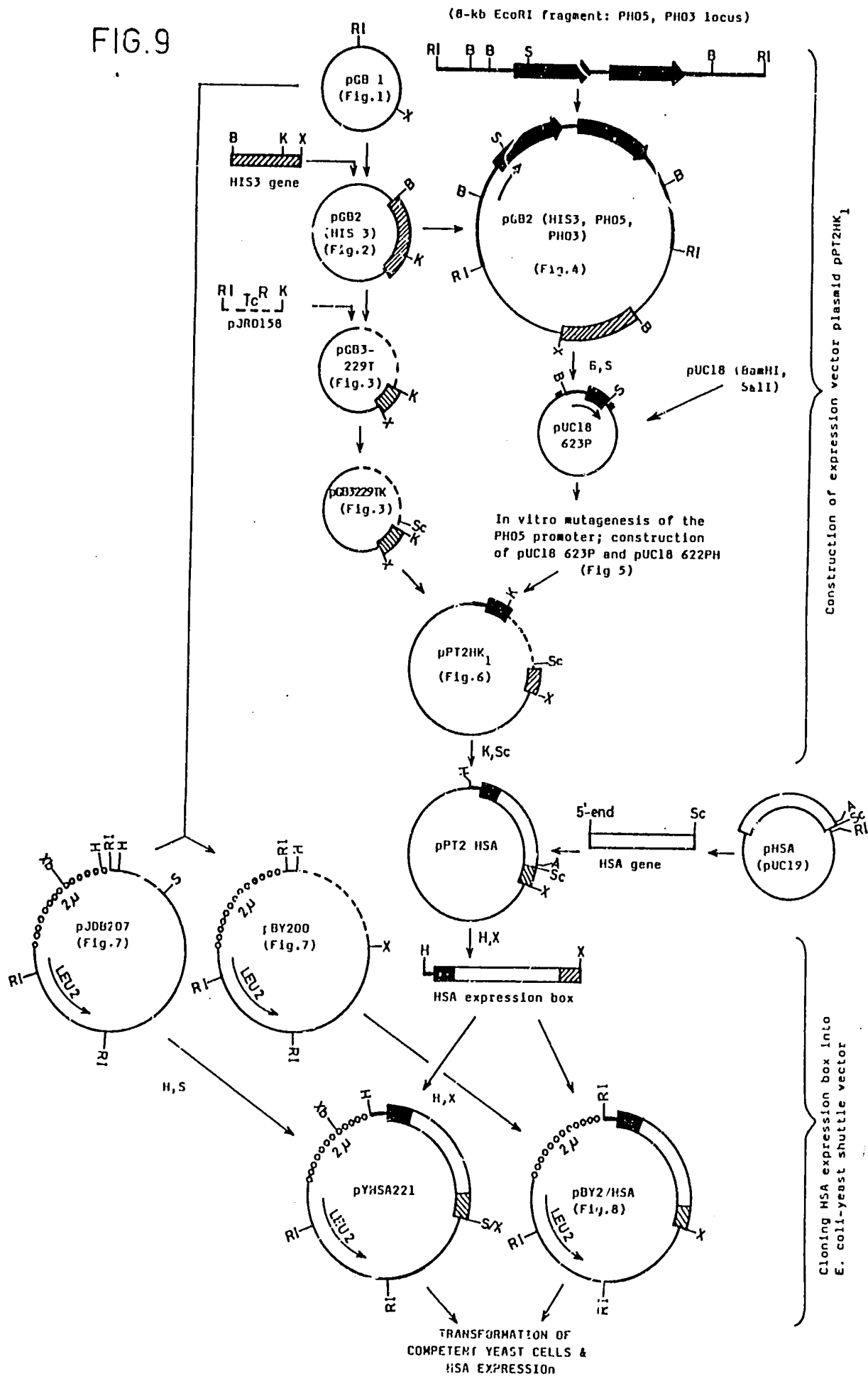


FIG.10

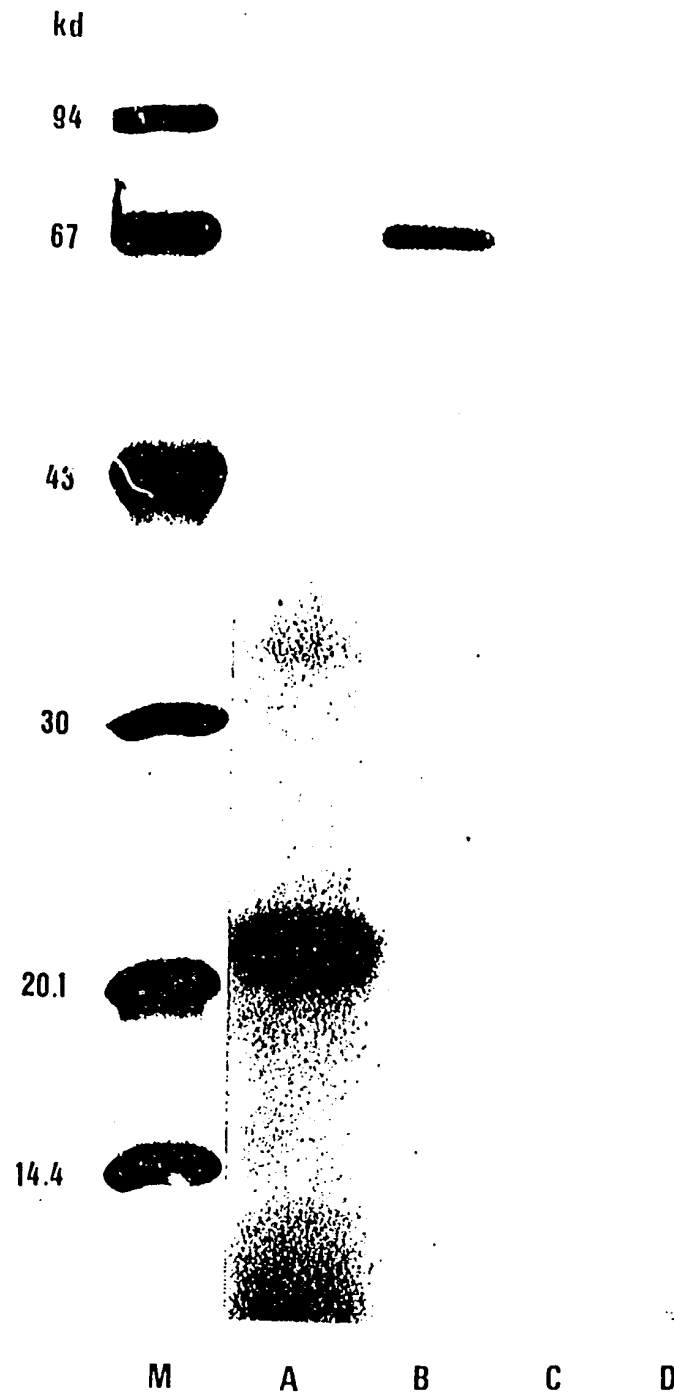


FIG. 11

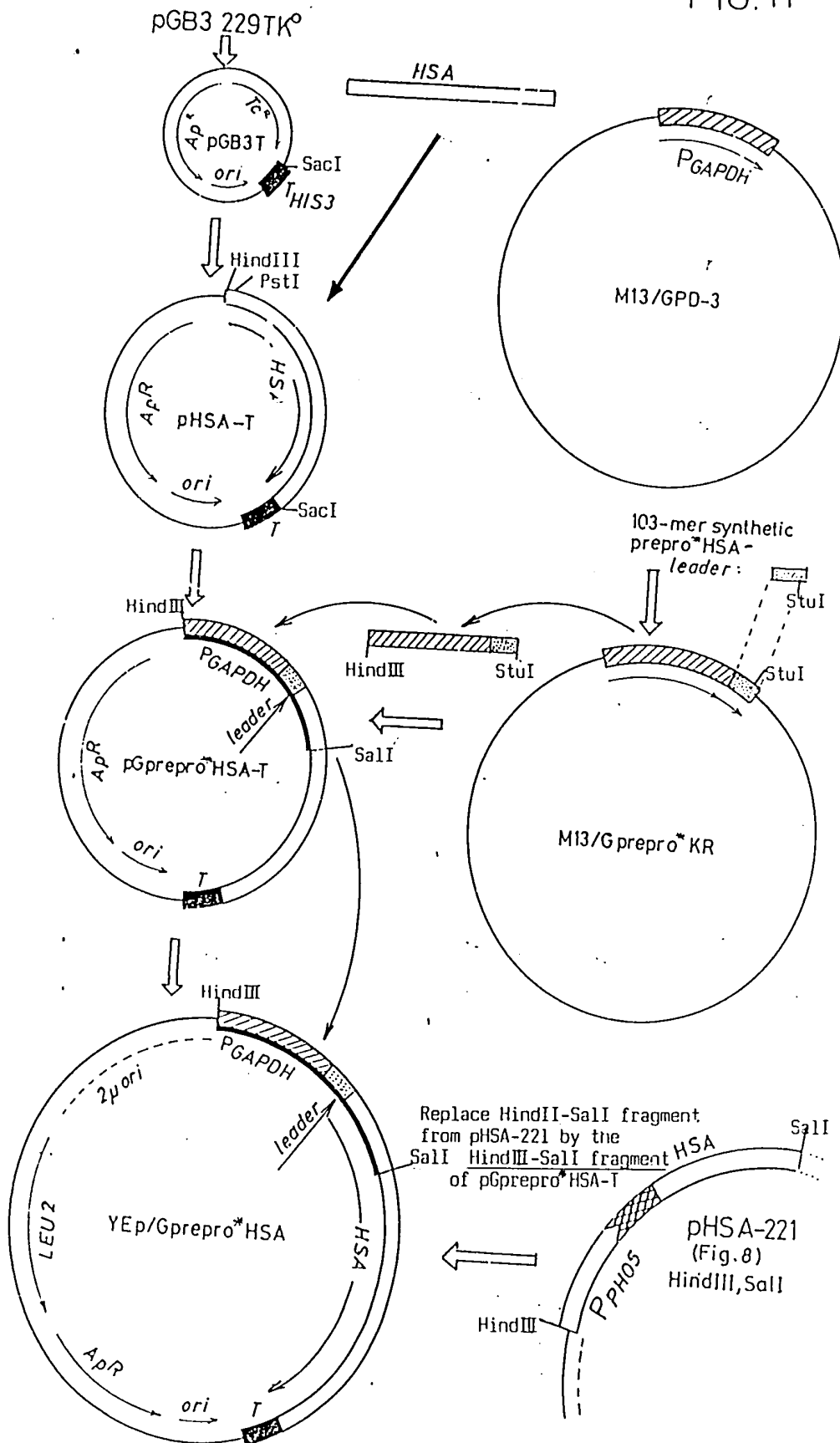


FIG.12

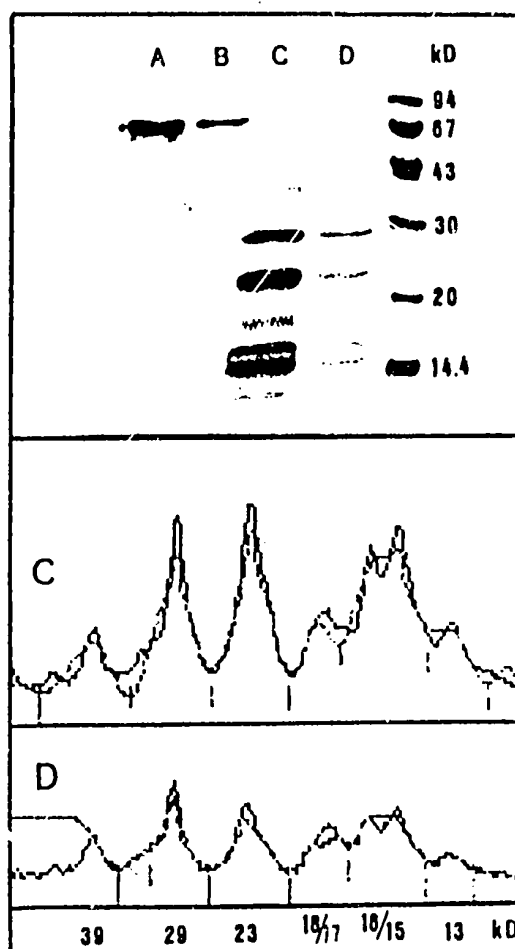


FIG.13

