



F1000095810B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT 95810C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 03 1996

(51) Kv.1k.6 - Int.c1.6

C 12N 15/52, 15/31, 1/21, 9/00
// C 12P 37/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus - Patentansökning	861653
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	18.04.86
(24) Alkuperäisyys - Löpdag	18.04.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	23.10.86
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.12.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
22.04.85 US 725870 P	18.11.85 US 799384 P

(71) Hakija - Sökande

1. Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ingolia, Thomas Dominick, 1107 Kokomo Lane, Indianapolis, IN 46241, USA, (US)
2. Queener, Stephen Wyatt, 4270 Melbourne East Drive, Indianapolis, IN 46208, USA, (US)
3. Sanson, Suellen Mary, 5812 San Clemente Drive, Indianapolis, IN 46226, USA, (US)
4. Skatrud, Paul Luther, 1045 Fiesta Drive, Greenwood, IN 46142, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Eristetty DNA-yhdiste, joka koodaa rekombinantti DNA isopenisilliini N-syntetaasia, sitä sisältävät vektorit ja menetelmä isopenisilliini N-syntetaasiaktiivisuuden tuottamiseksi näiden avulla

Isolerad DNA-förening, som kodar för rekombinant DNA isopenicillin N-syntetas, vektorer innehållande denna och förfarande för framställning av isopenicillin N-syntetasaktivitet med hjälp av dessa

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: B-15959 NRRL
B-15960 NRRL

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 135291 (C 12N 15/00), EP A 215539 (C 12N 15/00),
Biochem. J. 222 (1984) 789-795 (Pang et al.), Science 224 (1984) 610-612 (Hollander et al.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö käsittää uusia DNA-yhdisteitä, jotka koodaavat isopenisilliini N syntetaasia, ja myös käsittää siihen liittyviä menetelmiä, transformantteja ja polypeptidejä. Uusi isopenisilliini N syntetaasia koodaava DNA, yhdessä siihen liittyneen transkriptionaalisen ja translaationaalisen sekvenssin kanssa eristettiin Cephalosporium acremoniumista ja kloonattiin E.colin kloonausvektoriin. Isopenisilliini N syntetaasia koodaavaa DNA:ta on käytetty konstruoimaan uusia E.colin ekspressiovektoreita, jotka vievät stabiilin, aktiivin ja uuden isopenisilliini N syntetaasin ilmenemisen E.coliin. Intaktia C.acremonium isopenisilliini N syntetaasia koodaavaa DNA:ta ja mukana olevaa transkriptionaalista ja translaationaalista sekvenssiä on myös käytetty konstruoitaessa C.acremonium ekspressiovektoreita, jotka siirtävät isopenisilliini N syntetaasin ilmenemisen C.acremoniumiin. C.acremonium transkriptionaalinen ja translaationaalinen aktivoiva sekvenssi on edelleen liitetty hygromysiini fosfotransferaasia koodaavaan DNA-segmenttiin ja sijoitettu C.acremonium ekspressiovektoreihin. Hyödyllisiä uusien yhdisteiden johdannaisia ja vektoreita kuvataan myös.

Föreliggande uppfinning avser nya DNA-föreningar, vilka kodar för isopenicillin-N-syntetas, och även till dessa anslutna förfaranden, trans-formanter och polypeptider. Det nya isopenicillin-N-syntetaskodande DNA:et, tillsammans med den till detsamma anslutna transkriptionella och translationella sekvensen, isolerades från *Cephalosporium acremonium* och klonades in i kloningsvektorn av *E.coli*. Det isopenicillin-N-syntetaskodande DNA:et har utnyttjats för konstruerande av nya expressionsvektorer av *E.coli*, vilka leder till exprimerandet av ett stabilt, aktivt och nytt isopenicillin-N-syntetas i *E.coli*. Ett isopenicillin-N-syntetaskodande DNA av intakt *C. acremonium* och en medföljande transkriptionell sekvens har även utnyttjats för konstruerande av expressionsvektorer av *C. acremonium*, vilka överför exprimerandet av isopenicillin-N-syntetas på *C. acremonium*. En transkriptionell och translationell aktiverande sekvens av *C. acremonium* har vidare fogats till ett hygromycin-fosfotransferaskodande DNA-segment och placerats i expressionsvektorer av *C. acremonium*. Nyttiga derivat och vektorer av de nya föreningarna beskrivs även.

Eristetty DNA-yhdiste, joka koodaa rekombinantti DNA isopenisilliini N -syntetaasia, sitä sisältävät vektorit ja menetelmä isopenisilliini N -syntetaasiaktiivisuuden tuottamiseksi näiden avulla

5

Tämä keksintö koskee eristettyä DNA-yhdistettä, joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasia. Isopenisilliini N -syntetaasi katalysoi reaktiota, jossa isopenisilliini N muodostuu yhdisteestä δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiini. Tämä reaktio on kriittinen vaihe tärkeiden antibioottien biosynteesissä, kuten penisilliinit *Penicillium chrysogenumista*, *Cephalosporium acremoniumista* ja *Streptomyces clavuligeruksesta*, kefalosporiinit *C. acremoniumista* ja 7 α -metoksikefalosporiinit *S. clavuligeruksesta*. Keksintö koskee myös uutta DNA-yhdistettä sisältäviä vektoreita sekä menetelmää isopenisilliini N -syntetaasiaktiivisuuden tuottamiseksi isäntäsolussa.

10
15

Uusi DNA-sekvenssi, joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden, eristettiin *Cephalosporium acremoniumista* ja sitä on käytetty konstruoimaan rekombinantti DNA -ekspressiovektoreita, jotka aikaansaavat aktiivisuuden ekspression. Kaksi lajia näiden ekspressiovektoreita ovat erityisen hyödyllisiä. Ensimmäinen vektorityyppi aikaansaa isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden korkean tason ekspression *E. colissa*, ja toinen tyyppi aikaansaa aktiivisuuden ekspression *Cephalosporium acremoniumissa*.

20

25

E. coli tuottaman isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden on osoitettu in vitro -kokeissa muodostavan isopenisilliini N:ää yhdisteestä δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiini. Tämän keksinnön mukaisilla *E. coli* vektoreilla transformoidun *E. coli* raaka solu-uute osoitti isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta ilman mitään esi-aktivointikäsitelyä. Tämän keksinnön mukaiset *E. coli* vektorit ovat tehokas keino saada suuria määriä

30

35

aktiivista isopenisilliini N -syntetaasia. Isopenisilliini N -syntetaasi on hyödyllinen, ei ainoastaan isopenisilliini N:n tuottamiseksi, vaan myös tripeptidien kondensaatiossa, muiden kuin δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiinin, uusien antibioottien tuottamiseksi.

5 Tämän keksinnön mukaiset Cephalosporium vektorit ovat hyödyllisiä kannan parannustarkoituksissa. Cephalosporium on taloudellisesti tärkeä organismi, joka on hyödyllinen penisilliini- ja kefalosporiinantibioottien tuottamisessa. Cephalosporiumin transformaatio tietyillä 10 tämän keksinnön mukaisilla rekombinantti DNA ekspressiovektoreilla johtaa suurempiin isopenisilliini N -syntetaasin in vivo -tasoihin transformanteissa, joilla näin ollen on lisääntynyt fermentointien tehokkuus ja saanto.

15 DNA-yhdisteet, jotka koodaavat isopenisilliini N -syntetaasia, modifioidaan helposti ekspressiovektoreiden konstruomiseksi, jotka lisäävät muiden organismien, kuten Penicillium chrysogenum ja Streptomyces clavuligerus, fermentointien tehokkuutta ja saantoa. Vaikkakin tämän keksinnön mukainen isopenisilliini N -syntetaasia koodaava DNA eristettiin Cephalosporium acremoniumista, voidaan näitä DNA-yhdisteitä käyttää konstruoimaan vektoreita, jotka aikaansaavat isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspressiota suuressa määrässä isäntäsoluja, kuten 20 tämän keksinnön mukaiset E. coli-vektorit havainnollistavat. Kaikki organismit, jotka tuottavat penisilliinejä ja kefalosporiineja, käyttävät tavallisia prekursoreita δ -(L-, α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiini ja isopenisilliini N. Sen tähden voidaan tämän keksinnön mukaisia 25 isopenisilliini N -syntetaasia koodaavia DNA-yhdisteitä käyttää vektoreiden tuottamiseen, jotka ovat hyödyllisiä kaikkiin sukuihin kuuluvien penisilliini- ja kefalosporiini-antibiootteja tuottavien organismien fermentointien tehokkuuden ja saannon parantamiseksi. 30

Tämän keksinnön mukaiset DNA-yhdisteet ovat peräisin Cephalosporium acremoniumin genomien DNA:sta ja ne ovat nukleotidisekvenssiltään merkittävästi homologisia DNA-yhdisteisiin nähden, jotka koodaavat isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta Streptomyces clavuligeruksessa, Penicillium ja chrysogenumissa ja muissa isopenisilliini N -syntetaasia tuottavissa organismeissa. Tämän homologian johdosta voidaan tämän keksinnön mukaisia isopenisilliini N -syntetaasia koodaavia DNA-yhdisteitä merkitä ja käyttää sellaista organismien geenipankkien seulontaan, jotka tuottavat isopenisilliini N:ää tai samankaltaisia yhdisteitä isopenisilliini N -syntetaasityyppisten entsyymien läsnäollessa. Monet organismit sisältävät DNA:ta, joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasiaktiivisuutta, joka olleellisesti vastaa tämän keksinnön mukaisten DNA-yhdisteiden koodaamaa aktiivisuutta, ja tämä keksintö pitää sisällään nuo ekvivalentit DNA-yhdisteet.

Tämän keksinnön mukaiset isopenisilliini N -syntetaasia koodaavat DNA-yhdisteet saatiin Cephalosporium acremoniumin genomien DNA:sta ja eristettiin yhdessä transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin kanssa, joka säätelee C. acremoniumin isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan genomisen DNA:n ekspressiota. Tämä keksintö käsittää myös tämän uuden aktivoivan sekvenssin, jota on käytetty, kuten tässä on kuvattu, heterologisten geenien ekspression aikaansaamiseksi C. acremoniumissa.

Tämä keksintö käsittää myös IPS-geenin säätelevät signaalit, jotka sijaitsevat IPS-geenin koodaavan alueen koodaavan säikeen 3' päässä. Nämä 3' säätelevät sekvenssit koodaavat IPS-geenin transkription päätymisen ja mRNA:n polyadenylaation ja prosessoivat signaalit. Näiden signaalien läsnäolo oikeassa paikassa, joka on ekspressoitavan geenin koodaavan alueen koodaavan säikeen 3' päässä, ekspressiovektorissa tehostaa halutun tuotteen ekspressiota, jota tuotetta koodaa vektori Cephalosporium acremoniumissa.

Seuraavassa annetaan yksityiskohtaisempi kuvaus keksinnöstä. Selvyyden vuoksi ja keksinnön ymmärtämisen helpottamiseksi, määritellään seuraavat kohdat seuraavassa.

5 Antibiootti - mikro-organismien tuottama aine, joka joko luonnollisesti tai rajoitetusti kemiallisesti muunnettuna, inhiboi toisen mikro-organismien tai eukaryoottisolun kasvua tai tappaa tämän.

10 Antibioottinen biosynteettinen geeni - DNA-segmentti, joka koodaa entsyymaattisen aktiivisuuden, joka on välttämätön entsyymaattiselle reaktiolle prosessissa, jossa primaarimetaboliitit muutetaan antibiooteiksi.

15 Antibioottia tuottava organismi - mikä tahansa organismi, joihin lukeutuu, näihin rajoittumatta, Streptomyces, Bacillus, Monospora, Cephalosporium, Podospora, Penicillium ja Nocardia, jotka joko tuottavat antibioottia tai sisältävät genejä, jotka, jos ilmenevät, tuottaisivat antibioottia.

20 Antibioottiresistenssin antava geeni - DNA-segmentti, joka koodaa aktiivisuuden, joka antaa resistenssin antibioottia vastaan.

ApR - geeni, joka antaa ampicilliiniresistenssin.

25 Bifunktionaalinen kloonaussukkula -vektori - rekombinantti-DNA-kloonausvektori, joka voi replikoitua ja/tai integroitua kahden eri luokan organismeihin.

Ceph DNA - Cephalosporium acremoniumin DNA.

Ceph ori - Cephalosporium acremoniumin mitokondriaalinen DNA, joka huolehtii rekombinantti-DNA-vektorin ekstrakromosomaalisesta ylläpidosta.

30 Kloonaus - prosessi, jolla viedään DNA-segmentti rekombinantti-DNA-kloonausvektoriin.

cos - faagi λ :aan kohesiiviset loppusekvenssit.

35 Kosmidi - rekombinantti-DNA-kloonausvektori, joka voi replikoitua isäntäsolussa samaan tapaan kuin plasmidi mutta joka voi myös pakkautua faagin päihin.

Funktionaalinen polypeptidi - talteenotettavissa oleva bioaktiivinen heterologinen tai homologinen polypeptidi tai prekursori, talteenotettavissa oleva bioaktiivinen polypeptidi, joka käsittää heterologisen polypeptidin ja osan tai kokonaan homologisesta polypeptidistä, tai talteenotettavissa oleva bioinaktiivinen fuusiopolypeptidi joka käsittää heterologisen polypeptidin ja bioinaktivoivan homologisen polypeptidin, joka voidaan spesifisesti katkaista.

10 Geenikirjasto - joukko rekombinantti-DNA-kloonausvektoreita, joihin on kloonattu DNA-segmenttejä, jotka pääosin edustavat tietyn organismin koko genomia.

HmR - hygromysiiniresistenssin antava geeni.

15 Hybridisaatio - prosessi, jossa liitetään toisiinsa kaksi homologista yksisäikeistä DNA-molekyyliä, jolloin muodostuu kaksisäikeinen DNA-molekyyli, joka saattaa olla tai ei ole täydellisesti emäspariutunut.

IPS - isopenisilliini N -syntetaasia koodaava DNA.

20 IPS_p - Cephalosporium acremoniumin isopenisilliini N -syntetaasi (IPS) geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi.

IPSt - IPS-geenin transkription lopetus- ja mRNA:n polyadenylaatio ja prosessisignaalit. Isopenisilliini N -syntetaasi - entsyymi, joka myös tunnetaan nimellä syk-
25 laasi, joka katalysoi isopenisilliini N:n muodostusta δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiinista.

KmR - kanamysiiniresistenssin antava geeni.

mel - tyrosinaasigeeni.

mRNA - lähetti RNA.

30 PGK - Saccharomyces cerevisiae-niivan fosfoglyse-
raattikinaasigeenin transkriptiota ja translaatiota akti-
voiva sekvenssi.

35 Rekombinantti-DNA-kloonausvektori - mikä tahansa autonomisesti replikoituva tai integroitunut molekyyli, sisältäen, näihin rajoittumatta, plasmidit, jotka käsittä-

vät DNA-molekyylin, johon yksi tai useampi lisä-DNA-molekyyli voidaan lisätä tai on lisätty.

5 Rekombinantti-DNA-ekspressiovektori - mikä tahansa autonomisesti replikoituva tai integroitunut molekyyli, sisältäen, näihin rajoittumatta, plasmidit, jotka käsittävät transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin, joka on valmiudessa aikaansaamaan DNA-segmentin ekspression, joka DNA-segmentti koodaa polypeptidia tai RNA:ta, joilla on tutkimus- tai kaupallista kiinnostusta.

10 Rekombinantti DNA-vektori - mikä tahansa rekombinantti DNA-kloonaus- tai -ekspressiovektori.

Restriktiofragmentti - mikä tahansa lineaarinen DNA-molekyyli, joka on muodostunut yhden tai useamman entsyymin vaikutuksesta.

15 rRNA - ribosomaalinen RNA.

Sensitiivinen (herkkä) isäntäsolu - isäntäsolu, joka ei voi kasvaa tietyn antibiootin läsnäollessa ilman DNA-segmenttiä, joka antaa sille resistenssin.

TcR-tetrasykliiniresistenssin antava geeni.

20 Transkriptiota aktivoiva sekvenssi - DNA-sekvenssi, joka edistää DNA:n transkriptiota.

Transfektantti - resipientti (vastaanottava)-isäntäsolu, joka on transformoitu faagi-DNA:lla.

25 Transformantti - resipientti (vastaanottava) - isäntäsolu, joka on transformoitu.

Transformaatio - DNA:n vieminen resipientti-isäntäsoluun, mikä muuttaa genotyyppiä ja aiheuttaa muutoksen resipienttisolussa.

30 Translaatiota aktivoiva sekvenssi - DNA-sekvenssi, joka translaatioituneena mRNA:ksi edistää mRNA:n translaatiota proteiiniksi.

trp - E. colin tryptofaanioperonin transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi.

35 Kuvioissa 1-7 esitetyt restriktiopaikka- ja toimintakartat ovat tässä kohteena olevien rekombinantti-DNA-

vektoreiden summittaisia kuvauksia. Kartalla olevien restriktiopaikkojen etäisyydet ovat suhteessa vektorilla olevien restriktiopaikkojen todellisiin välimatkoihin, mutta havaitut restriktiopaikkojen etäisyydet voivat poiketa jonkin verran lasketuista karttaetäisyyksistä. Restriktiopaikkainformaatio ei ole tyhjentävä; sentähden vektorilla saattaa olla enemmän tietyn tyyppisiä restriktiopaikkoja, kuin itse asiassa on kartalla esitetty.

5
10 Kuvio 1. Plasmidin pIT335 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 2. Plasmidin pCZ106 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 3. Plasmidin pIT337 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

15 Kuvio 4. Plasmidin pIT221 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 5. Plasmidin pPS20 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

20 Kuvio 6. Plasmidin pPS19 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 7. Plasmidin pPS21 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 8. Plasmidin pPS21A restriktiopaikka- ja toimintakartta.

25 Kuvio 9. Plasmidin pPS25 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 10. Plasmidin pPS28 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

30 Kuvio 11. Plasmidin pPS29 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 12. Plasmidin pPS26 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 13. Plasmidin pPS34 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 14. Plasmidin pIT336 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 15. Plasmidin pPS35 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

5 Kuvio 16. Plasmidin pPS27 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

Kuvio 17. Plasmidin pPS37 restriktiopaikka- ja toimintakartta.

10 Tämä keksintö koskee eristettyä DNA-yhdistettä ja rekombinantti-DNA-kloonaus- ja -ekspressiovektoreita, jotka koodaavat isopensilliini N -syntetaasin aktiivisuutta.

Keksinnön mukaiselle eristetylle DNA-yhdisteelle on tunnusomaista, että se on

15 a) kuviossa 1 esitetyn plasmidin pIT335 noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmentti, joka voidaan saada E. coli -bakteerin kannasta K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960), tai

20 b) DNA-sekvenssi, joka hybridisoituu edellä määritellyn DNA-yhdisteen kanssa rajoittavissa olosuhteissa ja joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasia.

Erityinen DNA-sekvenssi, joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta on esitettyä alla. Siinä esitetään ainoastaan kaksisäikeisen DNA-molekyylin "sense" - eli koodaava säie ja DNA kuvataan vasemmalta oikealle
25 5'→ 3'- suuntaan. Nukleotidisekvenssi on numeroitu; numerot ilmenevät DNA-sekvenssin yläpuolella. Välittömästi kunkin DNA-sekvenssirivin alapuolella on merkittynä isopenisilliini N -syntetaasin aminohappotähdesekvenssi vasemmalta oikealle suunnassa aminopää → karboksipää. Kukin aminohappotähde esitetään sen DNA:n alla, joka koodaa sitä.
30 Aminohappotähdesekvenssi on numeroitu; numerot ilmenevät aminohappotähdesekvenssin alla.

DNA-sekvenssi, joka koodaa isopenisilliini N -syn-
tetaasin aktiivisuuden ja vastaava aminohapposek-
venssi

5' -ATG GGT TCC GTT CCA GTT CCA GTG GCC AAC GTC CCC CGA ATC GAT GTC
 MET GLY SER VAL PRO VAL PRO VAL ALA ASN VAL PRO ARG ILE ASP VAL
 5 5 10 15

50 60 70 80 90
 TCG CCC CTA TTC GGC GAT GAC AAG GAG AAG AAG CTC GAG GTA GCT CGC
 SER PRO LEU PHE GLY ASP ASP LYS GLU LYS LYS LEU GLU VAL ALA ARG
 20 25 30

10 100 110 120 130 140
 GCC ATC GAC GCC GCA TCG CGC GAC ACA GGC TTC TTT TAC GCG GTG AAC
 ALA ILE ASP ALA ALA SER ARG ASP THR GLY PHE PHE TYR ALA VAL ASN
 35 40 45

15 150 160 170 180 190
 CAC GGT GTC GAC CTG CCG TGG CTC TCG CGC GAG ACG AAC AAA TTC CAC
 HIS GLY VAL ASP LEU PRO TRP LEU SER ARG GLU THR ASN LYS PHE HIS
 50 55 60

20 200 210 220 230 240
 ATG AGC ATC ACG GAC GAG GAG AAG TGG CAG CTC GCC ATC CGG GCC TAC
 MET SER ILE THR ASP GLU GLU LYS TRP GLN LEU ALA ILE ARG ALA TYR
 65 70 75 80

25 250 260 270 280
 AAC AAG GAG CAC GAG TCC CAG ATC CGG GCG GGC TAC TAC CTG CCG ATC
 ASN LYS GLU HIS GLU SER GLN ILE ARG ALA GLY TYR TYR LEU PRO ILE
 85 90 95

30 290 300 310 320 330
 CCG GGC AAG AAG GCG GTC GAA TCG TTC TGC TAC CTG AAC CCC TCC TTC
 PRO GLY LYS LYS ALA VAL GLU SER PHE CYS TYR LEU ASN PRO SER PHE
 100 105 110

35 340 350 360 370 380
 AGC CCA GAC CAC CCG CGA ATC AAG GAG CCC ACC CCT ATG CAC GAG GTC
 SER PRO ASP HIS PRO ARG ILE LYS GLU PRO THR PRO MET HIS GLU VAL
 115 120 125

390 400 410 420 430
 AAC GTC TGG CCG GAC GAG GCG AAG CAC CCG GGG TTC CGG GCC TTC GCC
 ASN VAL TRP PRO ASP GLU ALA LYS HIS PRO GLY PHE ARG ALA PHE ALA
 130 135 140

440 450 460 470 480
 GAG AAG TAC TAC TGG GAC GTC TTC GGC CTC TCC TCC GCG GTG CTG CGC
 GLU LYS TYR TYR TRP ASP VAL PHE GLY LEU SER SER ALA VAL LEU ARG
 145 150 155 160

490 500 510 520
 GGC TAC GCT CTC GCC CTA GGT CGC GAC GAG GAC TTC TTC ACC CGC CAC
 GLY TYR ALA LEU ALA LEU GLY ARG ASP GLU ASP PHE PHE THR ARG HIS
 165 170 175

530 540 550 560 570
 TCC CGC CGT GAC ACG ACG CTC TCG TCG GTC GTG CTC ATC CGT TAC CCG
 SER ARG ARG ASP THR THR LEU SER SER VAL VAL LEU ILE ARG TYR PRO
 180 185 190

580 590 600 610 620
 TAC CTC GAC CCG TAC CCG GAG CCG GCC ATC AAG ACG GCC GAC GAC GGC
 TYR LEU ASP PRO TYR PRO GLU PRO ALA ILE LYS THR ALA ASP ASP GLY
 195 200 205

630 640 650 660 670
 ACC AAG CTC AGC TTC GAG TGG CAC GAG GAC GTG TCC CTC ATC ACG GTG
 THR LYS LEU SER PHE GLU TRP HIS GLU ASP VAL SER LEU ILE THR VAL
 210 215 220

680 690 700 710 720
 TTG TAC CAG TCC GAC GTG CAG AAT CTG CAG GTC AAG ACC CCG CAG GGC
 LEU TYR GLN SER ASP VAL GLN ASN LEU GLN VAL LYS THR PRO GLN GLY
 225 230 235 240

730 740 750 760
 TGG CAG GAC ATC CAG GCT GAC GAC ACG GGC TTC CTC ATC AAC TGC GGC
 TRP GLN ASP ILE GLN ALA ASP ASP THR GLY PHE LEU ILE ASN CYS GLY
 245 250 255

770 780 790 800 810
 AGC TAC ATG GCC CAT ATC ACC GAC GAC TAC TAC CCG GCC CCG ATC CAC
 SER TYR MET ALA HIS ILE THR ASP ASP TYR TYR PRO ALA PRO ILE HIS
 260 265 270

820 830 840 850 860
 CGC GTC AAA TGG GTC AAC GAG GAG CGC CAG TCA CTG CCC TTC TTC GTC
 ARG VAL LYS TRP VAL ASN GLU GLU ARG GLN SER LEU PRO PHE PHE VAL
 275 280 285

870 880 890 900 910
 AAC CTG GGC TGG GAG GAC ACC ATC CAG CCG TGG GAC CCC GCG ACC GCC
 ASN LEU GLY TRP GLU ASP THR ILE GLN PRO TRP ASP PRO ALA THR ALA
 290 295 300

920 930 940 950 960
 AAG GAT GGG GCC AAG GAT GCC GCC AAG GAC AAG CCG GCC ATC TCC TAC
 LYS ASP GLY ALA LYS ASP ALA ALA LYS ASP LYS PRO ALA ILE SER TYR
 305 310 315 320

970 980 990 1000
 GGA GAG TAT CTG CAG GGG GGA CTG CGG GGC TTG ATC AAC AAG AAT GGT
 GLY GLU TYR LEU GLN GLY GLY LEU ARG GLY LEU ILE ASN LYS ASN GLY
 325 330 335

1010
 CAG ACC TAA-3'
 GLN THR

jossa sekvenssissä A on deoksiadenyyli, G on deoksiguanyyli, C on deoksisytidyli, T on tymidyli, ALA on alaniinitähde, ARG on arginiinitähde, ASN on asparagiinitähde, ASP on asparagiinihappotähde, CYS on kysteiinitähde, GLN on glutamiinitähde, GLU on glutamiinihappotähde, GLY on glysiinitähde, HIS on histidiinitähde, ILE on isoleusiinitähde, LEU on leusiinitähde, LYS on lysiinitähde, MET on metioniinitähde, PHE on fenyylialaniinitähde, PRO on proliinitähde, SER on seriinitähde, THR on treoniinitähde, TRP on tryptofaanitähde, TYR on tyrosiinitähde, ja VAL on valiinitähde.

Edellä esitetyn DNA-sekvenssin G ja C- pitoisuus on noin 63 % ja se koodaa polypeptidiä, isopenisilliini N - syntetaasia, jolla on laskettu molekyylipaino 38 476 daltonia ja havaittu molekyylipaino noin 40 000 daltonia.

Alan ammattimiehet ymmärtävät, että edellä esitetty DNA-sekvenssi on tärkeä osa tätä keksintöä. Esitetty sekvenssi voidaan tavanomaisesti syntetisoida modifioidulla fosfotriesterimenetelmällä käyttäen täysin suojattuja deoksiribonukleotidi rakenneosia. Sellaiset synteettiset menetelmät ovat hyvin tunnettuja alalla ja ne voidaan suorittaa oleellisesti käyttäen menetelmää Itakura et al. Science 198 (1977) 1056 ja Crea et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 5765. Lisäksi erityisen edullinen menetelmä on esitetty julkaisussa Hsiung et al. Nucleic Acid Research 11 (1983) 3227 ja Narang et al. Methods in Enzymology 68 (1980) 90. Yllä mainittujen manuaalisten menetelmien lisäksi voidaan DNA-sekvenssi syntetisoida käyttäen automaattisia DNA-syntetisaattoria, kuten Systec 1450A - tai ABS 380A - DNA:n syntetisaattoria.

Geneettisen koodin degeneroituneen luonteen takia, mikä johtuu siitä, että on olemassa enemmän kuin yksi koodoni useimpia aminohappotähteitä ja loppusignaalia kohden, voi edellä esitettyä isopenisilliini N -syntetaasin aminohappotähdesekvenssiä koodata joukko erilaisia DNA-sekvens-

sejä. Koska nämä vaihtoehtoiset DNA-sekvenssit koodaisivat tämän keksinnön mukaisen aminohappotähdesekvenssin, käsittää tämä keksintö lisäksi nämä vaihtoehtoiset sekvenssit.

Lisäksi voisi olla olemassa tämän keksinnön mukaisen isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n geneettisiä variantteja. Näillä geneettisillä varianteilla olisi yhteisenä piirteenä huomattava DNA- ja aminohappotähdesekvenssin homologia tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden kanssa, ja niillä olisi samanlainen, ellei identtinen, 5
10 aktiivisuus, mutta ne eroaisivat jonkin verran tämän keksinnön mukaisista varsinaisista yhdisteistä. Nämä geneettiset variantit ovat myös tämän keksinnön mukaisten yhdisteiden suhteen ekvivalentteja.

Tämän keksinnön mukaiset isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavat DNA-yhdisteet eristettiin 15 Cephalosporium acremonium -kannasta, joka yleisesti tunnetaan nimellä Brotzu-kanta ja joka on saatavissa American Type Culture Collection'ista Rockville, Maryland, talletusnumerolla ATCC 11550. C. acremonium -kannan kokonaisgenomin DNA:n geenikirjasto konstruointiin ja geenikirjastoa 20 tutkittiin sekvenssien läsnäolon suhteen, jotka olisivat homologisia 64 erilaisesta deoksiribo-oligonukleotidista koostuneen joukon suhteen. Tämä 64 erilaisen deoksiribooligonukleotidin joukko konstruointiin sen informaation mukaisesti, joka oli saatu C. acremoniumin isopenisilliini 25 N -syntetaasin aminoterminalisesta aminohapposekvenssistä ja geneettisen koodin mukaisesti. Valikoima geenikirjaston vektoreita identifioitiin, jotka olivat homologisia yhdelle tai useammalle 64:lle erilaiselle deoksiribo-oligonukleotidille. DNA:n sekvensointi paljasti, mitkä vektorit 30 koodasivat C. acremoniumin isopenisilliini N -syntetaasia.

Sen jälkeen kun isopenisilliini N -syntetaasia koodaavat vektorit oli identifioitu, modifioitiin yhtä erityistä isopenisilliini N -syntetaasia koodaavaa vektoria 35 suurimman osan Cephalosporium acremoniumin vektorissa läs-

näolevan DNA:n poistamiseksi, joka ei koodannut isopenisilliini N -syntetaasia. Muodostunut vektori, joka nimettiin plasmidiksi pIT335, on transformoitu E. coli K12 JA221 -isäntäsoluihin ja E. coli K12 JA221/pIT335 -transformantit on talletettu ja saatettu osaksi kantaviljelmä-

5 kokoelmaa talletuslaitoksessa Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, talletusnumerolla NRRL B-15960. Plasmidin pIT335 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 1.

10 Plasmidi pIT335 voidaan eristää E. colista K12 JA221 menetelmällä, joka on kuvattu esimerkissä 1. Plasmidia pIT335 käytettiin lähtömateriaalina konstruoitaessa plasmidia, joka nimettiin pIT337 ja joka toteuttaa korkeatasoisen isopenisilliini N -syntetaasin ekspression E. colissa.

15 Plasmidi pIT337 konstruointiin liittämällä plasmidin pIT335 noin 1,5 kb NcoI-BamHI-restriktiofragmentti plasmidin pCZ106 noin 8,7 kb NcoI-NcoI ja noin 1,6 kb NcoIBamHI-restriktiofragmenttiin.

20 Plasmidi pCZ106 käsittää "runaway"-replikonin, trp:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin ja operaattorin, ja DNA-sekvenssin, joka koodaa naudan kasvuhormonin johdannaisen. Plasmidilla pCZ106 olevan "runaway"-replikonityypin käyttöä kuvataan US-patenteissa 4 487 835, 4 499 189 ja 4 495 287. Pääasiallisesti, alhaisissa noin 25°C lämpötiloissa, on plasmidilla, joka sisältää "runaway"-replikonin, kopiomäärä noin 10-15 kopiota E. coli-isäntäsolua kohti, mutta kun lämpötilaa nostetaan noin 37°C:seen, kopiomäärä nousee noin 1000:teen kopiota per E. coli-isäntäsolua kohti. E. coli K12 RV308/ pCZ106-

30 isäntäsolut, joista plasmidi pCZ106 voidaan eristää, on talletettu ja saatettu osaksi kantaviljelmäkokelmaa talletuslaitoksessa Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, talletusnumerolla NRRL B-15959. Plasmidin pCZ106 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty

35 kuviossa 2.

Plasmidi pIT337 sisältää plasmidin pCZ106 "runaway"-replikonin ja trp:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin ja isopenisilliini N -syntetaasi-geenin proteiinia koodaavan sekvenssin plasmidista pIT335:stä. Plasmidin pIT335 noin 1,5 kb NcoI-BamHI restriktiofragmentti sisältää isopenisilliini N -syntetaasin koko proteiinia koodaavan sekvenssin, ja NcoI-restriktioentsyymin tunnistussekvenssi, joka on:

5'-CCATGG-3'
 3' GGTACC-5'

sisältää:

5-ATG-3'
 3-TAC-5'

joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasin aminoterminaalita metionyyliä. Plasmidi pIT337 konstruoitiin siten, että trp:n transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi sijaitsisi niin, että se voisi aikaansaada isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n ilmenemisen. Plasmidin pIT337 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 3. Esimerkki 2 kuvaa plasmidin pIT337 rakennetta yksityiskohtaisemmin.

Noin 37°C lämpötiloissa plasmidin pIT337 sisältävät E. coli K12 RV308 (NRRL B-15624)-solut ilmentävät (ekspressoivat) isopenisilliini N -syntetaasin suurina määrinä, lähestyen noin 9 % solun kokonaisproteiinista. Näiden E. coli K12 RV308/pIT337 -transformanttien raakasolu-uutteet kykenevät katalysoimaan muutoksen δ -(L- α -aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiinista isopenisilliini N:ksi, kun taas transformoimattomien E. coli K12 RV308 -solujen solu-uutteet eivät pysty katalysoimaan tätä muutosta. Konversioreaktion määrittäminen ja määrittystulokset esitetään esimerkissä 3.

Plasmidi pIT337 tarjoaa tehokkaan keinon tuottaa suuria määriä isopenisilliini N -syntetaasia E. colissa. Koska E. coli -transformantit, joissa on plasmidi pIT337,

ekspressoivat isopenisilliini N -syntetaasia tasoina, jotka lähestyvät 9 % kokonaissoluproteiinista ja koska E. colin viljely on vähemmän komplisoitua kuin niiden organismien viljely, jotka luonnostaan tuottavat isopenisilliini N -syntetaasia, voidaan E. coli/pIT337 -transformanteja käyttää tuottamaan rekombinantti-isopenisilliini N -syntetaasia tehokkaammin ja taloudellisemmin kuin ei-rekombinantti- tai "luonnollisia" isopenisilliini N -syntetaasituottajia. Isopenisilliini N -syntetaasia voidaan käyttää tuottamaan isopenisilliini N tuotteesta δ -(L-aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiini soluvapaassa systeemissä kuten on kuvattu esimerkissä 3. Isopenisilliini N ei ole ainoastaan hyödyllinen antibiootti, vaan se on myös lähtömateriaali sellaisten tärkeiden antibioottien tuottamisessa kuin penisilliini N, kefaleksiini ja muut kefalosporiinit (katso US-patentti 4 307 192). Ehkä kaikkein tärkein isopenisilliini N -syntetaasin käyttö on entsyymien käyttö tripeptidien kondensoimiseksi, muiden kuin δ -(L-aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiinin, uusiksi β -laktamijohdannaisiksi.

Penisilliiniä tuottavien organismien soluvapaita uutteita voidaan käyttää syntetisoitaessa ei-luonnollisia (ei-luonnossa tuotettuja) β -laktaameja. Tämän keksinnön mukaiset E. colin ekspressiovektorit tarjoavat halvan ja tehokkaan menetelmän isopenisilliini N -syntetaasin saamiseksi, jota voidaan käyttää in vitro kondensoimaan tripeptidejä, jotka eivät esiinny luonnossa, muodostamaan uusia antibiootteja tai antibioottien ydinrakenteita. Ei-luonnollisten tripeptidien etsintää, jotka toimivat isopenisilliini N -syntetaasin substraatteina, voidaan täydentää etsimällä mutantti-isopenisilliini N -syntetaaseja, jotka hyväksyvät ei-luonnolliset tripeptidit substraateiksi. Tämä keksintö antaa lähtömateriaalin sellaiselle isopenisilliini N syntetaasi-mutanttiin etsinnälle. E. coli on paras isäntä mutaatiokloonaukokeisiin ja tämän keksinnön

mukaiiset E. colin ekspressiovektorit voidaan helposti mu-
tatoita menetelmillä, jotka ovat hyvin alalla tunnettuja,
kuten esimerkiksi säteilykäsittely (röntgensäde tai UW)
tai kemialliset mutageenit (kuten etyyylimetaanisulfonaat-
5 ti, nitrosoguanidiini, tai metyyylimetaanisulfonaatti) tai
paikkaspesifinen mutageneesi, mutanttientsyymien saamisek-
si, jotka tunnistavat ei-luonnolliset tripeptidit subs-
traatteina ja katalysoivat nuo ei-luonnolliset tripeptidit
ei-luonnollisiksi β -laktaameiksi.

10 Tämä keksintö ei ole rajoittunut tässä esimerkkeinä
kuvattuihin erityisiin vektoreihin. Sen sijaan tämä kek-
sintö käsittää DNA-yhdisteitä, jotka koodaavat isopenisil-
liini N -syntetaasin aktiivisuuden. Tämän keksinnön mukai-
sia DNA-yhdisteitä voidaan käyttää konstruoimaan ekspres-
siovektoreita, jotka tuovat esiin isopenisilliini N -syn-
15 tetaasin ekspresion missä tahansa isäntäsolussa, jossa
ekspressiovektori replikoituu tai integroituu ja jossa
transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi, jota
käytetään isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden il-
20 menemiseen, toimii.

Sentähden, vaikkakin E. colin ekspressiovektorit,
joista tässä on ollut esimerkkejä, käyttävät hyväksi "ru-
naway"-replikonia, joka toimii E. colissa, sisältää tämä
keksintö minkä tahansa E. colin ekspressioplasmidin tai
vektorin, joka aikaansaa isopenisilliini N -syntetaasin
25 ekspresion E. colissa. Näin ollen tämä keksintö käsittää
ekspressiovektorit, jotka aikaansaavat isopenisilliini N -
syntetaasin ekspresion ja käyttävät hyväksi replikonia,
joka toimii E. colissa, kuten esimerkiksi replikoni sel-
laisista plasmideista kuin pBR322, pACYC184, F, ColV-K94,
30 R1, R6-5 tai R100. Tämä keksintö ei myöskään ole yksistään
rajoittunut plasmidivektoreihin, sillä tämä keksintö si-
sältää myös ekspressiovektorit, jotka ekspressoivat isope-
nisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ja käyttävät hyö-
35 dyksi integraatiota tai virusreplikaatiota replikaation ja

ylläpidon varmistamiseksi isäntäsolussa. Tämä keksintö ei ole rajoittunut tiettyyn transkriptiota ja translaatiota aktivoivaan sekvenssiin isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden koodaavan DNA:n ekspression aikaansaamiseksi. Tämä keksintö sisältää minkä tahansa transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin käytön, joka toimii E. colissa ja jota käytetään ilmentämään isopenisilliini N -syntetaasi E. colissa. Tunnetaan monia transkriptiota ja translaatiota aktivoivia sekvenssejä, jotka toimivat E. colissa ja ne ovat sopivia isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspression aikaansaamiseksi E. colissa. Sellaiset transkriptiota ja translaatiota aktivoivat sekvenssit sisältävät, näihin rajoittumatta, lpp-, lac-, trp, tac-, δP_L ja δP_R transkriptiota ja translaatiota aktivoivia sekvenssejä.

Yllä kuvattujen erilaisten E. colin transkriptiota ja translaatiota aktivoivien sekvenssien lisäksi voidaan transkriptiota ja translaatiota aktivoivia sekvenssejä muista organismeista liittää näihin isopenisilliini N -syntetaasia koodaaviin DNA-yhdisteisiin, jolloin muodostuu ekspressiovektoreita, jotka aikaansaavat isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspression isäntäsoluissa, joissa aktivoitu sekvenssi toimii. Vaikkakin E. coli on isäntä, joka parhaiten sopii isopenisilliini N -syntetaasin tuotantoon ja sen jälkeiseen puhdistukseen in vitro -käyttöä varten, ovat hyödyllisiä myös vektorit, jotka aikaansaavat isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspression muissa isäntäsoluissa kuin E. coli, erityisesti käyttötarkoituksissa, jotka lisäävät β -laktaamiantibiootin tuottokykyä ja -tehoa tietyillä organismeilla. Luokuisat eri organismit tuottavat β -laktaamiantibiootteja. Seuraavassa taulukossa esitetään ei-tyhjentyvä luettelo β -laktaamiantibiootteja tuottavista organismeista.

Taulukko I

B-laktaamiantibioottia tuottavat organismit:

<u>Organismi</u>	<u>Antibiootti</u>
Agrobacterium	erilaisia B-laktaameja,
Cephalosporium acremonium	penisilliniä ja kefalosporiinia
Chromobacterium	erilaisia B-laktaameja
Gluconobacter	erilaisia B-laktaameja
Nocardia lactamadurans uniformis	kefamysiini C nokardisiini
Penicillium chrysogenum	erilaisia penisilliiniä ja muita B-laktaameja
Serratia	erilaisia B-laktaameja
Streptomyces antibioticus argenteolus	klavulaanihappo, asparenomysiini A, MM 4550, ja MM 13902
cattleya chartreusis	tienamysiini SF 1623 ja kefamysiini A ja B
cinnamonensis clavuligerus	kefamysiini A ja B PA-32413-I, kefamysiini C, A16886A, penisilliinejä, kefalosporiineja, klavulaanihappo, ja muita klavaameja
fimbriatus	kefamysiini A ja B
flavovirens	MM 4550 ja MM 13902
flavus	MM 4550 ja MM 13902
fulvoviridis	MM 4550 ja MM 13902
griseus	kefamysiini A ja B ja karpetimysiini A ja B
halstedii	kefamysiini A ja B
heteromorphus	C2081X ja kefamysiini A ja B
hygroscopicus	deasetoksikefalosporiini C
lipmanii	kefamysiini, penisilliini N, 7-metoksikefalosporiini C, A16884, MM4550, MM13902
olivaceus	epitienamysiini F, MM 4550 ja MM 13902
pana-yensis	C2081X ja kefamysiini A ja B
pluracidomyceticus	plurasidomysiini A
rochei	kefamysiini A ja B
sioyaensis	MM 4550 ja MM 13902
sp OA-6129	OA-6129A
sp KC-6643	karpetimysiini A,
tokunomensis	asparenomysiini A
viridochromogenes	kefamysiini A ja B
wadayamensis	WS-3442-D

Monia edellä olevista β -laktaamiantibiootin tuotta-
jaorganismeista käytetään farmaseuttisessa teollisuudessa
antibioottien tuottamiseen. Näiden organismien antibioot-
tien tuottokykyä voidaan lisätä ja tehdä tehokkaammaksi
5 lisäämällä antibiootteja biosyntetisoivien entsyymien so-
lunsisäistä konsentraatiota fermentoinnin aikana. Tämän
keksinnön mukaisia isopenisilliini N -syntetaasin aktiivi-
suutta koodaavia DNA-yhdisteitä voidaan käyttää konstruoimaan
10 ekspressiovektoreita, jotka transformoituina sopivaan
isäntäsoluun lisäävät transformoidun isäntäsolun solunsi-
säistä isopenisilliini N -syntetaasin konsentraatiota ja
siten lisäävät tuon solun antibiootin tuottokykyä ja te-
hokkuutta, edellyttäen, että isäntäsolu tuottaa β -laktaa-
miantibioottia välireaktion kautta, johon liittyy isopeni-
15 silliini N -syntetaasin aktiivisuus.

Vektori, joka lisää isopenisilliini N -syntetaasin
aktiivisuuden solunsisäistä konsentraatiota tietyssä isän-
näissä, johon vektori transformoidaan, tarvitsee seuraavat
elementit:

- 20 (1) tämän keksinnön mukaisen isopenisilliini N -syntetaa-
sin aktiivisuutta koodaavan DNA-yhdisteen,
(2) transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi,
joka ei ainoastaan toimi isäntäsolussa, joka transformoi-
daan, vaan joka on myös oikeassa lukuvaiheessa ja asemassa
25 toteuttamaan isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta
koodaavan DNA:n ekspression, ja
(3) replikaatio- ja integraatio- ja integrointi- ja integrointi-
vektorin ylläpidosta isäntäsolussa.

Tietenkin voisi yllä kuvattu vektori sisältää myös anti-
30 bioottiresistenssin antavan geenin tai jonkin muun elemen-
tin, joka antaa keinon valikoida vektorin sisältäviä isän-
täsoluja, mutta sellaiset valikoitavat elementit eivät
ehkä ole välttämättömiä eikä tavoiteltuja, kun vektori
integroituu isäntäsolun kromosomaaliseen DNA:han.

Plasmidi pPS20 on tämän keksinnön mukainen ekspres-
siovektori, joka on esimerkkinä vektorityypistä, joka on
tarkoitettu lisäämään isopenisilliini N -syntetaasin ak-
tiivisuuden solunsisäistä konsentraatiota β -laktaamianti-
5 bioottia tuottavassa isäntäsolussa. Plasmidi pPS20 konst-
ruoitiin sijoittamalla plasmidin pIT221 noin 2,7 kb Hind-
III-restriktiofragmentti plasmidin pIT335 ainoaan HindIII-
restriktioentsyymin tunnustuspaikkaan. Plasmidin pIT221
noin 2,7 kb HindIII-restriktiofragmentti käsittää hiivan
10 *Saccharomyces cerevisiae* fosfoglyseraattikinaasi (PGK) -
geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvens-
sin liittyneenä oikeassa asemassa ja suunnassa hygromysiini-
resistenssin antavan geenin ekspresion toteuttamiseksi.
Koska plasmidin pIT221 noin 2,7 kb HindIII-restriktiofrag-
15 mentti voitaisiin sijoittaa HindIII:lla hajotettuun plas-
midiin pIT335 molemmissa kahdesta suunnasta, liittyminen,
joka tuotti plasmidi pPS20:n, tuotti myös toiminnallisesti
ekvivalentin isomeerin, joka on nimetty plasmidiksi
pPS20,1. Plasmidin pPS20 restriktiopaikka- ja toiminta-
20 kartta on esitetty kuviossa 5; plasmidien pPS20 ja pPS20,1
konstruktiota kuvataan esimerkissä 4.

Plasmidi pIT221 -lähtömateriaali, jota käytettiin
plasmidien pPS20 ja pPS20,1 konstruoinnissa kuvattiin EP-
patenttijulkaisussa 177 243. Konstruktion kulkukaaviot
25 I-VI ja esimerkit 1-6 kuvaavat plasmidin pIT221 konstruk-
tiota ja julkaisu liitetään tähän viitteenä. Plasmidin
pIT221 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty
kuviossa 4.

Plasmidin pIT221 noin 2,7 kb HindIII-restriktio-
30 fragmentti sisältää hygromysiiniresistenssin antavan gee-
nin liittyneenä hiivan PGK transkriptiota ja translaatiota
aktivoivaan sekvenssiin oikeassa asemassa ja suunnassa
hygromysiiniresistenssin antavan aktiivisuuden ilmenemi-
seksi (HmR). Kuten on esitetty EP-patenttijulkaisussa
35 177 243 voidaan PGK-HmR -geeniä käyttää transformoimaan

Cephalosporium acremonium ja läheisiä isäntäsoluja hygromysiiniresistenttin fenotyypin muodostamiseksi.

Plasmidi pPS20 sisältää PGK-HmR -geenin ja Cephalosporium acremonium/pPS20 -transformantteja voidaan valikoida hygromysiiniresistenssin antavan aktiivisuuden perusteella, minkä transformantit ilmentävät. Plasmidi pPS20 sisältää myös tämän keksinnön mukaisen isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n yhdessä genom DNA:n kanssa, joka reunustaa isopenisilliini N -syntetaasia koodaava DNA:n Cephalosporium acremoniumin genomissa. Koska plasmidi pPS20 sisältää melkein 3 kb genom DNA:ta, joka sijaitsi vastavirtaan isopenisilliini N -syntetaasia koodaavassa DNA:ssa Cephalosporium acremoniumin genomissa, sisältää plasmidi pPS20 ilman muuta isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin. Useimmat transkriptiota ja translaatiota aktivoivat sekvenssit koodataan aktivoitavan DNA:n suhteen vastavirtaan, vaikkakin jotkut ribosomaalisista RNA:ta koodaavat DNA-sekvenssit aktivoituvat transkriptiota aktivoivien sekvenssien kautta, jotka eivät sijaitse koodaavassa alueessa vastavirtaan. "Vastavirtaan" on sana, jota käytetään molekyylibiologian alalla, ja tässä tekstissä se viittaa DNA:han 5'-suunnassa isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n koodaavan säikeen 5'-päästä.

Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi koodattuna plasmidilla pPS20 sijaitsee oikein aikaansaamaan isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavan DNA:n ekspression, koska plasmidin pPS20 konstruoinnin yhteydessä ei tehty deleetioita eikä insertioita, jotka olisivat vaikuttaneet transkriptiota ja translaatiota aktivoivaan sekvenssiin, DNA:ssa, joka oli isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavan DNA:n koodittavan säikeen 5'-pään vieressä. Plasmidia pPS20 voidaan sen tähden käyttää lisäämään Cephalosporium acremoniumin ja vastaavien isäntäsolujen

antibioottien tuottokykyä ja tehokkuutta, soluissa, joissa C. acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi toimii. Tämä lisääntynyt antibiootin tuottokyky ja tehokkuus johtuu isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden lisääntyneestä tasosta transformantissa, johtuen isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavan DNA:n ylimääräisten ekspressoituneiden kopioiden läsnäolosta. Plasmidi pPS20 sisältää myös hygromysiiniresistenssin antavan geenin, joka toimii C. acremoniumissa ja sallii C. acremonium/pPS20:n transformanttien seulonnan.

Sen jälkeen kun Cephalosporium acremonium/pPS20 -transformantit on seulottu, ei kuitenkaan ole tarvetta ylläpitää seulonta-ainetta, hygromysiini B:tä, transformanttien kasvualustassa. Seulonta-aineeseen ei ole mitään tarvetta, koska C. acremonium/pPS20 -transformantit ovat hyvin stabiileja. Tämän stabiilisuuden uskotaan johtuvan siitä, että plasmidi pPS20 transformoi C. acremoniumin kromosomaalisen integraation kautta. Tämä keksintö ei kuitenkaan rajoitu plasmideihin, jotka aikaansaavat isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspression C. acremoniumissa ja transformoivat kromosomaalisen integraation kautta. Ekstrakromosomaalisia replikoituvia ekspressiovektoreita C. acremoniumia varten on helppo valmistaa US-patentissa 4 492 758 kuvatun mukaisesti. US-patentti 4 492 758 kuvaa mitokondriaalisia DNA-segmenttejä, jotka voidaan sijoittaa vektoriin kuten plasmidin pPS20, antamaan välttämättömät toiminnot vektorin replikaatiolle C. acremoniumissa.

Kuten edellä kuvattiin, sisältää plasmidi pPS20 ja yksi plasmideista, joista pPS20 on peräisin, pIT335, Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin. Koska C. acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivaa sekvenssiä, joka sijaitsee plasmideissa pIT335 ja pPS20, voidaan käyttää aikaansaamaan laajan DNA-sekvenssijoukon ekspressiota, on aktivoiva

sekvenssi tämän keksinnön tärkeä osa. Vaikkakin *C. acremoniumin* transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin sekvenssitiedot ovat rajoitetut, aktivoivan sekvenssin tiedetään koodautuvan noin 500 bp Sali-NcoI -restriktiofragmentissa, joka sijaitsee välittömästi vastavirtaan isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavan DNA:n suhteen ja sen vieressä plasmideissa pIT335 ja pPS20. Mikä tahansa restriktiofragmentti, joka sisältää edellä mainitun noin 500 bp Sali-NcoI -restriktiofragmentin, sisältää ilman muuta *C. acremoniumin* transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin.

Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivasta sekvenssistä, joka koodautuu plasmidissa pIT335, on olemassa sekvenssitietoja. Alla oleva sekvenssi on DNA-sekvenssi, joka sijaitsee vastavirtaan isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta koodaavasta DNA:sta, joka on plasmidissa pIT335. Vain osa noin 500 bp Sali-NcoI -restriktiofragmentin sekvenssistä, joka sisältää aktivoivan sekvenssin, tunnetaan, kuten ilmenee sekvenssissä esitetystä merkinnällä "XXXXXXXXXX" varustetusta alueesta. Lisäselvityksenä siitä, kuinka aktivoiva sekvenssi on sijoittunut plasmidissa pIT335, kuvataan restriktiofragmentti yksinsäikeisen DNA:n päällekkäissequensseinä jotka on ominaisia restriktioentsyymien Sali ja NcoI katkaisulle.

Osa *Cephalosporium acremonium*in DNA-sekvenssistä-
Plasmidissa pIT335 koodautuvat transkriptiota ja translaa-
tiota aktivoiva sekvenssi

```

          +~380 bp +
5  5'-TCGAC XXXXXXXXXXXX CGAATACTTG AATATTCCTT GGTTCGCTCTT
    |  |||||||||||| | |||||||||||| | |||||||||||| | ||||||||||||
    3'-G XXXXXXXXXXXX GCTTATGAAC TTATAAGGAA CCAGCGAGAA

      CTGATTTTCG AGGCTTCTCC TTCCGCCATC GTCGCCTCAC
      |||||||||||| | |||||||||||| | |||||||||||| | ||||||||||||
      GACTAAAAGC TCCGAAGAGG AAGGCGGTAG CAGCGGAGTG

10 GCATATCTCG TCTTTCACAT CTTACACCAG CAGGACAAAC
    |||||||||||| | |||||||||||| | |||||||||||| | ||||||||||||
    CGTATAGAGC AGAAAGTGTA GAATGTGGTC GTCCTGTTG

      CGTCAC-3'
      |||||
      GCAGTGGTAC-5'

```

15

↑ → isopenisilliini N -syntetaasia koodavan
alueen alku. "TAC" on komplementaarinen
5'-ATG-3':lle, joka koodaa isopenisilliini
N -syntetaasin aminoterminaalista metionyy-
liä.

20

*Cephalosporium acremonium*in transkriptiota ja
translaatiota aktivoivaa sekvenssiä voidaan käyttää minkä
tahansa DNA-sekvenssin ekspression toteuttamiseen, kuten
on havainnollistettu plasmidilla pPS21. Plasmidi pPS21 on
25 plasmidi pIT221:n johdannainen, joka saadaan, kun korva-
taan PGK:n transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sek-
venssi, jota käytetään aikaansaamaan hygromysiiniresis-
tenssin antavan geenin ekspressio, tämän keksinnön mukai-
sella *C. acremonium*in transkriptiota ja translaatiota ak-
30 tivoivalla sekvenssillä. Korvaaminen suoritettiin poista-
malla ensin plasmidin pIT221 noin 300 bp *Xma*I-fragmentti,
jolloin syntyy plasmidi pPS19. Tämä *Xma*I-deleetio suori-
tettiin *Bam*HI-restriktioentsyymillä tunnistuspaikan poista-
miseksi, joka olisi voinut häiritä pPS21:n konstruoimista.
35 Plasmidi pPS19 hajotettiin sitten *Bam*HI:llä ja käsiteltiin

..

E. colin DNA-polymeraasi I:n Klenow-fragmentilla. BamHI-hajotus poistaa noin 230 bp BamHI-restriktiofragmentin, joka sisältää pGK:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin; Klenow-käsittely muodostaa kaksisäikeistä DNA:ta yksisäikeisistä BamHI:-päällekkäisfragmenteista. Suuri, noin 7,7 kb plasmidin pPS19 BamHI-fragmentti liitettiin sitten plasmidin pIT335 noin 0,8 kb, Klenow-käsiteltyyn, NcoI-restriktiofragmenttiin, joka plasmidi sisältää C. acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin.

Tietenkin Klenow-käsitelty NcoI-restriktiofragmentti voisi liittyä toiseen kahdesta suunnasta vain yhden mahdollisista sijaintipaikoista saavuttaessa halutun tuloksen oikean Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin sijainnin aikaansaamaan hygromysiiniresistanssin antavan geenin ekspressiota. Plasmidin pPS21 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 7 ja plasmidin pPS19 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 6. Yksityiskoh-
taisempi kuvaus plasmidin pPS21 konstruktioista on esitetty esimerkissä 5.

Plasmidi pPS21A on toinen tämän keksinnön mukaisista vektoreista, joka käyttää hyväksi IPS-geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoivaa sekvenssiä aikaansaamaan hygromysiiniresistanssin antavan geenin ekspressiota Cephalosporium acremoniumilla. Hyödyllistä välituote plasmidia, joka nimetään plasmidiksi pPS23, käytettiin konstruoitaessa plasmidi pPS21A. Plasmidi pPS23 konstruoitiin eristämällä plasmidin pIT335 noin 850 bp NcoI-restriktiofragmentti, joka plasmidi sisältää IPS-geenin aktivoivan sekvenssin, kiinnittämällä linkkerit joissa on BamHI:n ja NcoI:n kanssa yhteen sopivat yksisäikeiset päällekkäisfragmentit noin 850 bp NcoI-fragmenttiin, ja liittämällä muodostunut plasmidista pIT335 peräisin oleva noin 860 bp BamHI-restriktiofragmentti BamHI:llä hajotettuun plasmidi-

diin pUC8. Tämä liittäminen tuotti kaksi plasmidia, pPS23 ja pPS23,1, jotka eroavat ainoastaan liitetyn BamHI-restriktiofragmentin sijoittumisen puolesta. Plasmidi pUC8 on saatavissa Pharmacia P-L Biochemicalsilta, 800 Centennial Ave., Piscataway, N.J. 08854.

5 Plasmidi pPS23 hajotettiin restriktioentsyymillä BamHI, ja noin 860 bp BamHI-restriktiofragmentti, joka sisältää IPS:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin, eristettiin ja liitettiin BamHI:llä hajotettuun plasmidiin pPS19. Tämä liitäntä tuotti joukon hyödyllisiä plasmideja, mukaan lukien plasmidin pPS21A. Plasmidi pPS21A muodostuu kun plasmidin pPS23 noin 0,86 kb BamHI-restriktiofragmentti liitetään plasmidin pPS19 noin 7,7 kb BamHI-restriktiofragmenttiin ja se käsittää IPS-geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin oikeassa asemassa aikaansaamaan hygromysiiniresistenssin antavan geenin ekspression. Linkkerit, joita käytettiin plasmidin pPS23 konstruoinnissa varmistivat, että plasmidissa pPS21A säilyisi sopiva lukukehys hygromysiiniresistenssin antavan geenin ilmenemiselle. Plasmidin pPS21A konstruktiota kuvataan esimerkissä 7; plasmidin pPS21A restriktiopaikka- ja toimintakertta on esitetty kuviossa 8.

Useita muita hyödyllisiä plasmideja tuotettiin myös samassa ligaatiossa, joka tuotti plasmidin pPS21A. Plasmidi pPS22 sisältää samat sekvenssit kuin plasmidi pPS21A, mutta BamHI-restriktiofragmentti, joka sisältää IPS-geenin aktivoivan sekvenssin, on sijoittunut vastakkaiseen suuntaan plasmidin pPS21A sijaintiin nähden. Näin muodoin plasmidi pPS22 ei tuo hygromysiiniresistenssiä Cephalosporium acremoniumille suurella frekvenssillä, joten plasmidi pPS22 toimii hyödyllisenä negatiivisena kontrollina C. acremonium-transformaatioissa.

Toisella tässä ligaatiossa muodostuneella plasmidilla on käyttöä sekä negatiivisena kontrollina Cephalos-

porium acremoniumin transformaatioissa että myös plasmidi-
na, jota voidaan käyttää identifioimaan *C. acremoniumin*
sekvenssejä, joilla on transkriptiota ja translaatiota
aktivoivaa aktiivisuutta. Kuten edellä on kuvattu, sisäl-
5 tää plasmidi pPS19 *Saccharomyces cerevisiae*n PGK:n trans-
kriptiota sen ja translaatiota aktivoivan sekvenssin so-
pivassa asemassa aikaansaamaan hygromysiiniresistenssin
antavan geenin ekspression. Plasmidin pPS19 hajotus res-
triktioentsyymillä BamHI tuottaa kaksi fragmenttia: toinen
10 fragmentti on kooltaan noin 230 bp ja sisältää PGK:n akti-
voivan sekvenssin, ja toinen fragmentti on kooltaan noin
7,6 kb ja sisältää enimmänsen osan hygromysiiniresistenssin
antavan geenin koodaavasta sekvenssistä.

Plasmidin pPS19 noin 7,6 kb BamHI-restriktiofrag-
15 mentin renkaanmuodostus tuottaa plasmidin pPS24, jolta
puuttuu transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvens-
si asemassa, joka tuottaisi hygromysiiniresistenssin anta-
van geenin ekspression vektorissa. Plasmidi pPS24 voi sen
tähden transformoida *Cephalosporium acremoniumin* hygromy-
20 siiniresistentiksi integroitumalla *C. acremoniumin* DNA:han
sellaiseen asemaan, että *C. acremoniumin* endogeeninen
transkriptiota ja translaatiota aktivoiva sekvenssi tuot-
taa geenin ekspression. Näin muodoin plasmidin pPS24 DNA:n
integraatiopaikan identifiointi hygromysiiniresistenssissä
25 *C. acremonium/pPS24* -transformantissa identifioi myös *C.*
acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan
sekvenssin. Vaihtoehtoisesti voitaisiin *C. acremoniumin*
DNA kloonata plasmidin pPS24 ainoaan BamHI-paikkaan ja
syntyneitä plasmideja voitaisiin käyttää *C. acremoniumin*
30 transformointiin. Ne plasmidit, jotka transformoivat *C.*
acremoniumin hygromysiiniresistenssiksi suurella frekvens-
sillä, sisältäisivät ilman muuta transkriptiota ja trans-
laatiota aktivoivan sekvenssin, joka on toiminnallinen *C.*
acremoniumissa.

Vielä muita hyödyllisiä plasmideja muodostui samassa liigaatiossa, joka tuotti plasmidin pPS21A. Nämä plasmidit, plasmidit pPS25 ja pPS25,1, muodostuivat liittämällä kaksi plasmidin pPS19 BamHI-restriktiofragmenttia plasmidin pPS23 noin 860 bp BamHI-restriktiofragmenttiin. Plasmidissa pPS25 sekä PGK:n että IPS:n aktivoivat sekvenssit ovat sopivassa asemassa aikaansaamaan hygromysiiniresistenssin antavan geenin ekspression. Plasmidi pPS25 sisältää IPS:n aktivoivan sekvenssin, joka sijaitsee välittömästi vastavirtaan hygromysiiniresistenssin antavan geenin koodaavaan sekvenssiin nähden ja PGK:n aktivoivan sekvenssin, joka sijaitsee välittömästi vastavirtaan IPS:n aktivoivaan sekvenssiin nähden. Plasmidi pPS25 antaa hygromysiiniresistenssin *Cephalosporium acremonium*ille. Plasmidin pPS25 restriktiopaikka ja toimintakartta on esitetty kuviossa 9. Plasmidien pPS22, pPS24 ja pPS25 konstruktioita kuvataan myös esimerkissä 7.

Plasmidi pPS25,1 eroaa plasmidista pPS25 vain noin 0,23 kb BamHI-restriktiofragmentin aseman puolesta, joka sisältää PGK:n aktivoivan sekvenssin. Plasmidissa pPS25,1 ei PGK:n aktivoiva sekvenssi sijaitse sellaisessa asemassa, joka sallii PGK:n aktivoivan sekvenssin aikaansaada hygromysiiniresistenssin antavan geenin ekspression. Kuitenkin, sekä plasmidi pPS25 että pPS25,1 transformoivat *Cephalosporium acremonium*iin hygromysiiniresistenssifenotyypin samalla suurella frekvenssillä, osoittaen, ettei PGK:n aktivoiva sekvenssi ole välttämätön hygromysiiniresistenssifenotyypin ilmenemiselle.

Muita hyödyllisiä tämän keksinnön mukaisia plasmideja, jotka antavat hygromysiiniresistenssin *Cephalosporium acremonium*ille voidaan konstruoida hajottamalla osittain plasmidia pPS21 restriktioentsyymillä PstI, jota seuraa uudelleenliigaatio. Plasmidi pPS28 syntyy, kun poistetaan plasmidista pPS21A noin 1,85 kb PstI-restriktiofragmentti, joka sisältää *Cephalosporium*in replikaation aloi-

tuskohdan. Plasmidi pPS29 syntyy, kun poistetaan plasmidista pPS21A sama PstI-fragmentti, joka poistettiin, jotta saatiin plasmidi pPS28, yhdessä noin 0,49 kb PstI-restrikti fragmentin kanssa, joka sijaitsee Cephalosporiumin replikaation aloituskohdan ja plasmidin pPS21A IPS-geenin aktivoivan sekvenssin välissä. Plasmidien pPS28 ja vastavasti pPS29 restriktiopaikka- ja toimintakartat on esitetty kuvioissa 10 ja 11. Plasmidien pPS28 ja pPS29 konstruktioita on kuvattu esimerkissä 8.

10 Vielä toinen hyödyllinen johdannainen konstruointiin käyttämällä plasmidia pPS21A lähtömateriaalina. Plasmidin pPS21A noin 3,45 kb HindIII-restrikti fragmentti sijoitettiin plasmidin pIT335 ainoaan HindIII-paikkaan, jolloin syntyivät plasmidit pPS26 ja pPS26,1, jotka eroavat toisistaan ainoastaan plasmidista pPS21A otetun HindIII-restrikti fragmentin sijoittumisen puolesta. Plasmidit pPS26 ja pPS26,1 sisältävät käsittelemättömän Cephalosporium acremoniumin IPS-geenin ja hygromysiiniresistenssin antavan geenin IPS-geenin aktivoivan sekvenssin tuottamana.

15 Plasmidien pPS26 ja pPS26,1 konstruktioita kuvataan esimerkissä 9 ja plasmidin pPS26 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 12.

25 EP-patenttijulkaisussa 177 243, kuvataan samanlaisen vektorin konstruointia kuin plasmidi pIT221, plasmidi, jota kuten edellä on todettu, kuvataan myös samassa patenttijulkaisussa, mutta tämä samanlainen vektori sisältää lisäksi Cephalosporium acremoniumin ribosomaalisen RNA:n koodaavan DNA:n. Plasmidilla, pPS26, on lisääntynyt kyky integroitua C. acremoniumin kromosomaaliseen DNA:han

30 rRNA:ta koodaavan DNA:n läsnäolosta johtuen. Plasmidin pPS26 konstruktio on esitetty em. EP-patenttijulkaisun esimerkissä 13, joka mainitaan tässä viitteenä. Koska plasmidi pPS26 sisältää saman PGK-HmR -geenin kuin plasmidi pIT221, on pPS26-johdannainen, joka voisi syntyä korvattaessa PGK:n transkriptiota ja translaatiota aktivoiva

35

sekvenssi tämän keksinnön mukaisella *C. acremoniumin* akti-
voivalla sekvenssillä, selvästi tämän keksinnön piirissä.

Plasmidi pPS26 sisältää noin 3,7 kb XmaI-restrikti-
tiofragmentin, joka sisältää *Cephalosporium acremoniumin*
5 rRNA-geenit. Tämän XmaI-fragmentin läsnäolo plasmidissa
lisää todennäköisyyttä, että plasmidi integroituu *C. acre-*
moniumin genomiin homologisen rekombinaation kautta, kun
plasmidi transformoidaan *C. acremoniumiin*. Näin ollen kon-
struoitiin plasmidit pPS30 ja pPS30,1 lisäämällä plasmidin
10 pPS6 noin 3,7 kb XmaI-restriktiofragmentti, joka sisältää
osan *C. acremoniumin* rRNA-geeneistä plasmidin pPS21A ai-
noaan XmaI-paikkaan; plasmidit pPS30 ja pPS31,1 eroavat
toisistaan ainoastaan XmaI-restriktiofragmentin sijainti-
suunnan puolesta. Plasmidit pPS31 ja pPS31,1 konstruoitiin
15 lisäämällä plasmidin pPS6 noin 3,7 kb:n XmaI-restriktio-
fragmentti plasmidin pPS29 ainoaan XmaI-paikkaan. Plasmidi-
en pPS30, pPS30,1, pPS31 ja pPS31,1 konstruktioita kuva-
taan esimerkissä 10.

Tämän keksinnön mukaiset plasmidivektorit, jotka
20 käyttävät hyväksi *Cephalosporium acremoniumin* IPS-geenin
transkriptiota ja translaatiota aktivoivaa sekvenssiä ai-
kaansaamaan hygromysiiniresistenssin antavan geenin eks-
pressiota, ovat paljon parempia kuin plasmidit, jotka
käyttävät hyväksi *Saccharomyces cerevisiae* PGK:n akti-
25 voivaa sekvenssiä aikaansaamaan hygromysiiniresistenssin
antavan geenin ekspressiota *C. acremoniumissa*. Näiden vek-
toreiden paremmuutta osoittaa kaksi havaintoa:

(1) transformaatiofrekvenssi mitattuna hygromysiiniresis-
tenttien *Cephalosporium acremonium* -transformanttien luku-
30 määränä per mikrogrammaa kohti transformaatioissa käytettyä
DNA-vektoria, on 50-300 kertaa suurempi, kuin IPS:n akti-
voivaa sekvenssiä, verrattuna PGK:n aktivoivalle sekvens-
sille, käytetään toteuttamaan vektorissa olevan hygromy-
siiniresistenssin antavan geenin ekspressiota; ja

35 (2) regeneraatioaika, mitattuna aikana, joka kuluu kunnes

pesäkkeet tulevat paljaalla silmällä näkyviksi transformaation jälkeen, on noin 50 % pienempi, kun käytetään IPS:n aktivoivaa sekvenssiä, verrattuna PGK:n aktivoivalle sekvenssille, toteuttamaan vektorilla olevan hygromysiini-resistenssin antavan geenin ekspressiota.

5 Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivaa sekvenssiä voidaan käyttää ilmentämään mitä tahansa DNA-sekvenssiä C. acremoniumissa, kuten edellä kuvatut ekspressiovektorit osoittavat. Näin
10 ollen tämä keksintö käsittää C. acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin käytön, koodattuna plasmidin pIT335 noin 0,5 kb SalI-NcoI-restriktiofragmentissa, toteuttamaan minkä tahansa DNA-sekvenssin ekspressio, joka sekvenssi koodaa hyödyllisen aineen.

15 Tämä keksintö perustuu intaktin toiminnallisen, Cephalosporium acremoniumin DNA-sekvenssin kloonamiseen, joka koodaa ei ainoastaan isopenisilliini N -syntetaasin aminohapposekvenssia, vaan myös transkriptiota ja translaatiota aktivoivaa sekvenssiä, joka on välttämätön toteuttaessa isopenisilliini N -syntetaasin ilmeneminen C. acremoniumissa. Samaten, tämän keksinnön mukainen IPS-geeni käsittää sekvenssit, jotka sijaitsevat myötävirtaan
20 koodaavassa alueessa, jotka vastaavat transkription päättämistä ja mRNA:n polyadenylaatiosta ja prosessisignaalia. Tavallisesti sekvenssit, jotka vastaavat transkription päättämistä, polyadenylaatiosta ja mRNA:n prosessoinnista koodautuvat alueella noin 5000 bp myötävirtaan koodausalueen lopetuskodonista. Sen tähden noin 0,5 kb
25 BamHI-PstI -restriktiofragmentti, joka sisältää IPS:n karboksiterminaalia koodaavan DNA:n ja sen myötävirtasekvenssit, sisältää myös IPS-geenin transkription lopetus- ja
30 mRNA:n polyadenylaation ja prosessisignaalit.

Yksi vektori, plasmidi pPS27, on konstruoitu, joka
35 sisältää IPS:n transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin, jota seuraa hygromysiiniresistenssin antava

geeni, jota seuraa IPS-geenin transkription lopetus ja mRNA:n polyadenylaatio- ja prosessisignaalit. Plasmidi pPS27:n konstruoimiseksi liitettiin plasmidin pIT335 noin 1,4 kb BamHI-XhoI-restriktiofragmentti Sali-BamHI:llä hajotettuun plasmidiin pUC8 (Sali- ja XhoI-"overlapit" (päällekkäisfragmentit) ovat yhteensopivia), jolloin saatiin plasmidia pIT336 (kuvio 14).

Plasmidi pIT336 hajotettiin restriktioentsyymillä PstI ja suljettiin renkaaksi kaikkien Cephalosporiumin DNA-sekvenssien poistamiseksi plasmidista paitsi noin 0,5 kb:n BamHI-PstI-restriktiofragmentti, joka sisältää IPS-geenin transkription lopetus- ja mRNA:n polyadenylaatio- ja prosessisignaalit, jotta saataisiin plasmidi pPS35 (kuvio 15)

Plasmidi pPS35 hajotettiin sitten restriktioentsyymillä HindIII, ja plasmidin pPS29 noin 2,3 kb:n HindIII-restriktiofragmentti, joka plasmidi sisältää IPS-geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin, jota seuraa hygromysiiniresistenssin antava geeni, integroitui HindIII:lla hajotettuun plasmidiin pPS35 sopivassa sijaintiasemassa, jotta saataisiin plasmidi pPS27. Plasmidin pPS27 konstruktiota kuvataan esimerkissä 11, ja plasmidin pPS27 restriktiopaikka ja toimintakartta on esitetty kuviossa 16.

Plasmidin pPS27 hyödyllinen johdannainen voidaan konstruoida eristämällä plasmidin pPS27 noin 2,3 kb:n HindIII- ja noin 0,5 kb:n HindIII-BamHI -restriktiofragmentit ja liittämällä nämä fragmentit sopivassa asemassa plasmidin pIT335 noin 5,9 kb:n BgIII-HindIII -restriktiofragmentit, jolloin saadaan plasmidi pPS34. Plasmidi pPS34 sisältää sekä hygromysiiniresistenssin antavan geenin että myös isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan geenin, joita kontrolloivat IPS-geenin säätelyelementit. Plasmidin pPS34 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 13.

Plasmidia pIT336 voidaan käyttää lähtömateriaalina konstruoitaessa plasmidi, joka integroituu *Cephalosporium acremonium*in genomiin isopenisilliini N -syntetaasin geeniin lokukseen. Tällä plasmidilla, pPS37, on käyttöä insertio- inaktivaatiotutkimuksissa, sillä plasmidin pPS37 transformatio *C. acremonium*-kantaan tuottaa kannan IPS-vajaita mutantteja, kun plasmidi pPS37 integroituu IPS-geenin koodaavaan alueeseen. Plasmidi pPS37 konstruointiin lisäämällä plasmidin pPS21A noin 3,45 kb:n HindIII-restriktiofragmentti, joka sisältää hygromysiiniresistenssin antavan geenin IPS-geenin aktivoivan sekvenssin säätelyn alaisena, NruI:llä hajotettuun plasmidiin pIT336. Plasmidissa pIT336 on ainutkertainen NruI-paikka, joka sijaitsee plasmidissa olevan IPS:n koodaavan alueen osassa. Lisäämällä noin 3,45 kb:n HindIII-fragmentti, joka on tasapäinen johtuen Klenow-entsyymikäsittelystä, NruI:llä hajotettuun plasmidiin pIT336 itse asiassa tuotetaan kaksi plasmidia, pPS37 ja pPS37,1, jotka eroavat toisistaan ainoastaan sijoitetun kappaleen orientaation puolesta. Sekä plasmidi pPS37 että plasmidi pPS37,1 ovat hyödyllisiä transformoitaessa *C. acremonium*, hygromysiiniresistenttien, IPS-vajaiden transformanttien muodostamiseksi.

Tämä keksintö on urauurtava keksintö siinä suhteessa, että se edustaa ensimmäistä DNA-sekvenssin kloonausta ja modifiointia, joka sekvenssi koodaa entsymaattista aktiivisuutta jota usein kutsutaan syklaasiaktiivisuudeksi, joka on välttämätön tripeptidisubstraatin kondensaation katalysoimiseksi substituoiduksi β -laktaamiksi. Monet organismit, muut kuin *C. acremonium*, ekspressoivat suuressa määrin samanlaista, ellei identtistä, syklaasiaktiivisuutta. Eri sukua olevien antibiootteja tuottavien organismien syklaasiaktiivisuuden samanlaisuus johtuu eri syklaasien aminohapposekvenssin vastaavasta samanlaisuudesta ja DNA-sekvenssin samanlaisuudesta, joka koodaa syklaasiaktiivisuutta.

Tämä keksintö tarjoaa syklaasientsyymien sekä amino-
 happo- että DNA-sekvenssin, erikoisesti Cephalosporium ac-
 remoniumin isopenisilliini N -syntetaasille, ja sitä voi-
 daan näin ollen käyttää syklaasientsyymia koodaavan DNA:n
 5 eristämiseen β -laktaamia tuottavista organismeista. Näitä
 DNA-sekvenssejä voidaan esimerkiksi käyttää leimattujen
 koettimien valmistukseen, joita vuorostaan voidaan käyttää
 syklaasia koodaavien DNA-sekvenssien seulontaan edellä
 mainituissa β -laktaamia tuottavissa organismeissa. Tämän
 10 isopenisilliini N -syntetaasia koodaavan DNA:n suuri G- ja
 C-pitoisuus, noin 63 %, tekee nämä DNA-yhdisteet erityisen
 hyödyllisiksi Streptomyces clavuligeruksen isopenisilliini
 N -syntetaasia koodaavan DNA:n eristämisessä. Streptomy-
 ces-DNA:lla tiedetään olevan suuri G- ja C-pitoisuus,
 15 usein lähestyen 70 %, joten tämän keksinnön mukaisen DNA:n
 suuri G- ja C- pitoisuus tekee DNA-yhdisteet erityisen
 hyödyllisiksi homologisten S. clavuligerus- tai muiden
 Streptomyces-DNA-sekvenssien eristämisessä. Tämä keksintö
 koskee DNA-yhdisteitä, jotka koodaavat syklaasiaktiivi-
 20 suutta ja lisäksi ekspressiovektoreita, jotka aikaansaavat
 syklaasi- aktiivisuuden ekspression suuressa määrässä
 isäntäorganismeja.

Seuraavat esimerkit annetaan keksinnön edelleen ja
 valaisemiseksi mutta niiden ei ole tarkoitettu mitenkään
 : 25 rajoittavan tämän keksinnön piiriä.

Esimerkki 1

E. colin K12 JA221/pIT335 viljely ja plasmidin
 pIT335 eristäminen

A. E. colin K12 JA221/pIT335 viljely

30 E. colin K12 JA221/pIT335 lyofilisaattipullin saa-
 daan Northern Regional Research Laboratories' lta, Peoria,
 Illinois, talletusnumerolla NRRL B-15960. Lyofilisaattiam-
 pullia voidaan suoraan käyttää "viljelmänä" seuraavassa
 prosessissa.

Yksi litra L-lientä (10 g tryptonia, 10 g NaCl, ja 5 g hiivauutetta litraa kohti), joka sisälsi 50 µg/ml am-
pisilliinia siirrostettiin E. colin K12 JA221/pIT335 -vil-
jelmällä ja inkuboitiin ilmaravistelijassa 37°C:ssa kunnes
5 optinen tiheys 590 nm:ssa (OD₅₉₀) oli noin 1 absorbanssi-
yksikköä, jolloin 150 mg kloramfenikolia lisättiin viljel-
mään. Inkubointia jatkettiin noin 16 tuntia. Kloramfeniko-
lilisäys estää proteiinisynteesin, ja estää näin solujen
edelleen jakautumisen, mutta sallii plasmidin replikoinnin
10 jatkuvan.

B. Plasmidin pIT335 eristäminen

Esimerkissä 1A valmistettua viljelmää sentrifugoitiin Sorvallin GSA-roottorissa (Dupont Co., Instrument Products, Biomedical Division, Newtown, CN 06470) 6000 rpm
15 5 minuutin ajan 4°C:ssa. Muodostunut supernatantti heitet-
tiin pois ja solupelletti pestiin 40 ml:lla TES-puskuria
(10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 10 mM NaCl ja 1 mM EDTA) ja
sitten jälleen pelletoitettiin. Supernatantti poistettiin
20 jälleen ja solupelletti jäädytettiin kuivassa jääetanoli-
hauteessa ja sulatettiin sitten. Sulanut solupelletti sus-
pendoitiin 10 ml:aan liuosta, jossa oli 25 % sakkaroosia
ja 50 mM EDTA. Seokseen lisättiin 1 ml lysotsyymiliuosta 5
mg/ml, 3 ml 0,25 M EDTA, pH = 8,0, ja 100 µl RNA A 10 mg/
ml, sekoitettiin ja inkuboitiin jäiden päällä 15 minuut-
25 tia. 3 ml hajottavaa liuosta (valmistettu sekoittamalla 3
ml 10 % Triton-X 100, 75 ml 0,25 M EDTA, pH = 8,0, 15 ml 1
M Tris-HCl, pH = 8,0, ja 7 ml vettä) lisättiin lysotsyymi-
käsiteltyihin soluihin, sekoitettiin ja syntynyttä liuosta
inkuboitiin jäiden päällä vielä 15 minuuttia. Hajonneet
30 solut jäädytettiin kuivassa jääetanolihauteessa ja sitten
sulatettiin.

Solujäänteet poistettiin liuoksesta sentrifugoimal-
la 25 000 rpm 40 minuutin ajan SW27-roottorilla (Beckman,
7360 N. Lincoln Ave., Lincolnwood, IL 60646) ja uuttamalla
35 puskuroidulla fenolilla. Sitten lisättiin 30,44 g CsCl ja

noin 1 ml etiumbromidiliuosta 5 mg/ml liuoksen tilavuus säädettiin 40 ml:ksi ja dekantoiitiin VTi50 ultra-sentrifugiputkeen (Beckman). Putken sulkemisen jälkeen liuosta sentrifugoitiin VTi50-roottorissa 42000 rpm noin 16 tunnin ajan. Muodostunut plasmidivyoähyke, tehtynä näkyväksi ultravioletivalon avulla, eristettiin ja laitettiin sitten Ti75-putkeen ja -roottoriin (Beckman) ja sentrifugoitiin 50 000 rpm 16 tuntia. Kaikki tarvittavat tilavuuden säädöt tehtiin käyttäen TES:iä, joka sisälsi 0,761 g/ml CsCl:a.

Plasmidivyoähyke eristettiin jälleen, uutettiin suolalla kyllästetyllä isopropanolilla etiumbromidin poistamiseksi ja laimennettiin 1:3 TES-puskurilla. Kaksi tilavuutta etanolia lisättiin sitten liuokseen, mitä seurasi inkubointi yli yön -20°C:ssa. Plasmidi-DNA pelletoiitiin sentrifusiomalla liuosta SS34 roottorissa (Sorvall) 15 minuuttia 10 000 rpm. Noin 1 mg plasmidin pIT335 DNA:ta, joka saatiin tällä menetelmällä, suspendoiitiin 1 ml:aan TE-puskuria (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0, ja 1 mM EDTA) ja säilytettiin -20°C:ssa. Plasmidin pIT335 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 1.

Esimerkki 2

Plasmidin pIT337 konstruointi

A. E. colin K12 RV308/pCZ106 viljely ja plasmidin pCZ106 eristäminen

E. colin K12 RV308/pCZ106 lyofilisaattiviljelmä saadaan Northern Regional Research Laboratories'ltä, Peoria, Illinois, tallentusnumerolla NRRL B-15959. Lyofilisaattia käytetään siirrostamaan 1 litra L-lientä, joka sisältää 50 µg/ml kanamysiiniä, ja siirrostettua lientä inkuboidaan 25°C:ssa ilmaravistelijalla, kunnes OD₅₉₀ on 0,5-1,0 absorbanssiyksikköä. Kun viljelmän optinen tiheys saavuttaa tason 0,5-1,0 absorbanssiyksikköä, nostetaan lämpötilaa 37°C:seen ja inkubointia jatketaan 2-6 tuntia. "Runaway"-replikoni on kuten aikaisemmin on todettu, lämpötilaherkkä ja menettää kopiomäärän säätelyn 37°C:ssa.

2-6 tunnin inkubointi 37°C:ssa on täysin riittävä aika kontrolloimattomalle replikaatiolle.

2-6 tunnin inkuboinnin jälkeen 37°C:ssa, solut otetaan talteen ja plasmidin pCZ106 DNA eristetään suuressa määrin esimerkin 1B menetelmän mukaisesti. Noin 5 mg plasmidin pCZ106 DNA:ta saadaan ja suspendoidaan 5 ml:aan TE-puskuria. Plasmidin pCZ105 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 2.

B. Plasmidin pCZ106 NcoI- ja BamHI-hajotus ja plasmidin pCZ106 noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI- ja noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmenttien eristäminen

Suunnilleen 25 µg, vastaten 25 µl:aa, plasmidin pCZ106 DNA:ta, joka valmistettiin esimerkissä 2, lisättiin ja sekoitettiin seuraavien komponenttien kanssa: 10 µl 10 x BamHI-reaktiopuskuria [1,5 M NaCl, 60 mM Tris-HCl, pH 7,9, 60 mM MgCl₂, ja 1 mg/ml naudan seerumin albumiini (BSA)], 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä* BamHI, 5 µl (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä NcoI ja 55µl H₂O:ta. Syntyneitä reaktioseosta inkuboitettiin neljä tuntia 37°C:ssa, minkä ajan jälkeen reaktio oli olennaisesti päättynyt.

NcoI-BamHI -reaktioseokselle suoritettiin sitten elektroforeesi 1 % agarosigeelillä kunnes halutut noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI- ja noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI -fragmentit olivat selvästi erottuneet muusta reaktiotuotteesta, noin 0,3 kb:n restriktiofragmentista. Elektroforeesikäsitellyn DNA:n visuaalinen tarkastelu suoritettiin värjäämällä geeli laimeassa etidiumbromidiliuoksessa (0,5 µg/ml) ja altistamalla värjätty geeli pitkäaaltoiselle UV-valolle. Haluttujen fragmenttien paikantamisen jälkeen tehtiin geeliin pieni rako kunkin halutun fragmentin eteen, ja pieni pala Schleicher and Schuell (Keene, NH 03431) NA-45 DEAE -membraania pistettiin kuhunkin ragoon. Elektroforeesi jatkettiin, jolloin DNA sitoutui ei-kovalenttisesti

DEAE -membraaniin. Sen jälkeen kun halutut fragmentit olivat sitoutuneet DEAE-membraaniin, membraanit poistettiin ja huuhdeltiin matalasuolaisella puskurilla (100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, ja 20 mM Tris-HCl, pH 8). Seuraavaksi kukin membraani pistettiin pieneen putkeen ja upotettiin korkeasuolaiseen puskuriin (1 M NaCl, 0,1 M EDTA ja 20 mM Tris-HCl, pH 8) ja inkuboitiin sitten 65°C:ssa yksi tunti DNA:n poistamiseksi DEAE-paperista. Inkuboinnin jälkeen 65°C:ssa, inkubointipuskuri otettiin talteen ja membraani huuhdeltiin korkeasuolaisella puskurilla. Huuhteluliuos yhdistettiin inkubointipuskurin kanssa ennen haluttujen DNA-fragmenttien talteenottoa.

Korkeasuolaisen DNA-liuoksen tilavuus säädettiin niin, että NaCl-pitoisuus oli 0,25 M ja sitten lisättiin kolme tilavuutta kylmää absoluuttista etanolia. Syntyneet liuokset sekoitettiin ja laitettiin -70°C:seen 10-20 minuutin ajaksi. Jäähdyttämisen jälkeen liuokset sentrifugoitiin 15 000 rpm 15 minuutin ajan. Toisen saostuksen jälkeen jäännössuolan poistamiseksi, DNA-pelletit huuhdeltiin etanolilla, kuivattiin, suspendoitiin 20 µl:aan TE-puskuria, ja muodostivat noin 5,0 µg haluttuja plasmidin pCZ106 noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI- ja noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI -restriktiofragmentteja. Saadut puhdistetut fragmentit liuotettiin erikseen 25 µl:aan TE-puskuria ja säilytettiin -20°C:ssa.

^{*)} Ellei toisin ole mainittu, saatiin restriktio- ja ligatioentsyymit New England Biolabs' lta, 32 Tozer Road, Beverly, MA 01915. Tässä olevat yksikkömääritelmat vastaavat valmistajan antamia yksikkömääritelmiä.

C. Plasmidin pIT335 NcoI- ja BamHI noin 1,5 kb NcoI-BamHI-hajotus ja -restriktiokappaleen noin eristäminen, joka koodaa isopenisilliini N -syn-tetaasia

Suunnilleen 25 µg, vastaten 25 µl:aa, plasmidin pIT335 DNA:ta, jota valmistettiin esimerkissä 1B, hajotet-

tiin restriktioentsyymeillä NcoI ja BamHI oleellisesti
 esimerkin 2B menetelmän mukaisesti. Saatu NcoI-BamHI -ha-
 jotettu DNA laitettiin 1 % agarosigeelille ja haluttu 1,5
 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmentti eristettiin oleelli-
 5 sesti esimerkin 23 menetelmän mukaisesti. Suunnilleen 5 µg
 haluttua fragmenttia saatiin, suspendoitiin 25 µl:aan TE-
 puskuria ja säilytettiin -20°C:ssa.

D. Plasmidin pIT337 lopullinen konstruointi

5 µl plasmidin pCZ106, noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI- ja
 10 2,5 µl noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI -restriktiofragmentteja,
 joka plasmidi oli puhdistettu esimerkissä 2B ligatoitiin 5
 µl:aan plasmidin pIT335 noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restrik-
 tiofragmenttiin, joka plasmidi oli puhdistettu esimerkissä
 2C, jolloin muodostui plasmidi pIT337. Reaktiivilavuus oli
 15 30 µl ja se käsitti edellä mainitut DNA-fragmentit, 1,1 µl
 (noin 100 yksikköä) T4 DNA-ligaasia, 3 µl 10 x ligaatio-
 puskuria (0,5 M Tris-HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 200 mM di-
 tiotreitoli (DTT), 10 mM ATP, ja 1 mg/ml BSA) ja 13,4 µl
 H₂O. Reaktioseosta inkuboitiin kaksi tuntia 15°C:ssa, minkä
 20 jälkeen reaktio oli oleellisesti päättynyt. Ligatoitu DNA
 muodosti halutun plasmidin pIT337 DNA:n. Plasmidin pIT337
 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa
 3.

Esimerkki 3

25 E. colin K12 RV308/pIT337 konstruointi ja E. colin
 tuottaman isopenisilliini N -syntetaasin määrittäminen

A. E. colin K12 RV308/pIT337 konstruointi

50 ml E. coli K12 RV308 (NRRL B-15624) -viljelmää
 L-liemessä kasvatettiin OD₅₉₀-arvoon noin 0,5 absorbanssi-
 yksikköä. Viljelmä jäähdytettiin jäiden päällä kymmenen
 30 minuutin ajan, ja solut otettiin talteen sentrifugoimalla.
 Solupelletti suspendoitiin 25 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂ ja
 inkuboitiin jäiden päällä 25 minuuttia. Solut pellettoitiin
 taas kerran sentrifugoimalla, ja pelletti suspendoitiin
 35 2,5 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂ ja inkuboitiin jäiden päällä
 yli yön.

200 µl tätä solususpensiota sekoitettiin ligatoidun DNA:n kanssa, jota oli valmistettu esimerkissä 2D ja inkuboitettiin jäiden päällä 20 minuuttia ja sitten solut kerättiin talteen sentrifugoimalla. Solupelletti suspendoitiin
5 noin 1 ml:aan L-lientä ja suspensiota inkuboitettiin 25°C:ssa yksi tunti. Soluseoseriä viljeltiin L-agarmaljoilla (L-liemi, jossa oli 15 g/l agarua), joissa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, ja maljoja inkuboitettiin 25°C:ssa. E. coli K12 RV308/pIT337 -transformantit todettiin oikeiksi seulomalla
10 kanamysiiniresistenssin suhteen ja transformanttien plasmidi-DNA:n restriktioentsyymianalyysillä plasmidi-DNA:ta saatiin E.colin K12 RV308/pIT337 -transformanteista oleellisesti esimerkissä 2A kuvatun mukaisesti, mutta pienemässä mitassa, ja CsCl-gradientti -vaiheet jätettiin pois.

15 B. E. colin K12 RV308/pIT337 viljely isopenisillini N -syntetaasin aktiivisuuden ekspressoimiseksi

Useita E. colin K12 RV308/pIT337 transformanttien
isolaatteja, jotka transformantit oli valmistettu esimerk-
20 kin 3A mukaisesti, siirrostettiin kukin erikseen 5 ml:n L-liemieriin, joissa oli 50 µg/ml kanamysiiniä, ja viljelmiä inkuboitettiin ilmaravistelijalla 25°C:ssa kunnes OD₅₉₀ oli noin 0,2 absorbanssiyksikköä. Viljelmät siirrettiin sitten 37°C:sen ilmaravistelijalle ja inkuboitettiin 37°C:ssa noin 6
25 tunnin ajan.

6 tunnin kuluttua, 37°C:ssa inkuboiden, yksi ml kutakin viljelmää otettiin talteen, ja solut pelletoitettiin sentrifugoimalla Solupelletit pestiin kukin erikseen 1 ml:lla 10 mM NaCl ja suspendoitiin sitten 1 ml:aan IPS-uuttopuskuria (0,05 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,01 M KCl ja 0,01 M MgSO₄). Soluja sonikoitiin kuudessa viiden sekunnin sonikointierässä, joka aikaansaatiin Sonifier Cell Disruptor'illa, Malli W185, Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Plainview, Long Island, NY, käyttäen mikrokärkeä. Sonikointikäsitteilyerien välinen aika oli 60 sekuntia, ja
35

seosta pidettiin jääetanolihauteessa käsittelyn aikana. Sonikoinnin jälkeen soluseosta sentrifugoitiin jäännösten poistamiseksi ja käytettiin sitten suoraan määrittelyksessä.

C. Isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden
määrittäminen

5

Seuraava määrittämismenetelmä on muunnettu Shenin et al. menetelmästä, [J. of Antibiotics 37 (1984) 1044-1048].

Isopenisilliini N -syntetaasin määrittämisreaktio suoritettiin kokonaistilavuuden ollessa 500 µl. Reaktion aloittamiseksi 1,0 ml liuosta, jossa oli 1,4 mM δ-(L-α-aminoadipyyli)-L-kysteinyyli-D-valiinia ja 3,75 mM DTT:tä annettiin reagoida huoneenlämmössä 30-60 minuutin ajan kaiken dimeerisen tripeptidin pelkistämiseksi monomeeriseen muotoon. 50 µl kutakin seuraavaa kantaliuosta jaettiin kuhunkin määrittämisputkeen (steriilit, lasiset, kertakäyttöiset 13 x 100 mm putket): 500 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM KCl, 100 mM MgSO₄, 2,0 mM FeSO₄ ja 6,7 mM askorbiinihappo. Seuraavaksi lisättiin vaihtelevia määriä uutetta, joka oli laimennettu vedellä 150 µl:ksi. Kuhunkin putkeen lisättiin sitten noin 100 µl:n erinä tripeptidiliuosta; tripeptidin lisäys aloittaa reaktion. Kutakin putkea sekoitettiin substraatin lisäyksen yhteydessä. Reaktioseosastiat sijoitettiin sitten pyörivää liikettä tekevään ravistelijauteeseen 250 rpm, inkubaatiolämpötilassa 25°C. Reaktioaika oli 45 minuuttia. 45 reaktiominuutin jälkeen otettiin kaksi 100 µl:n näytettä ja annosteltiin biomäärittämisslevyjen kuoppiin, ja 100 yksikköä penisillinaasi A:ta lisättiin näytteen loppuosaan. Penisillinaasi A saatiin Riker's Laboratories Inc.'lta, entsyymiä myydään 100 000 yksikön ampulleissa, jotka liuotettiin 5 ml:n vesierillä. Viisi µl (100 yksikköä) liuotettua penisillinaasi A:ta lisättiin kuhunkin reaktioseokseen, annettiin reagoida 5 minuuttia huoneenlämmössä ja sitten 100 µl kutakin penisillinaasi A:lla käsiteltyä uutetta annosteltiin biomäärittämisslevyjen kuoppiin. Tämä penisillinaasi A -käsittely

35

tehdään, jotta voitaisiin tarkistaa, että biomäärityslevyjen vyöhykkeet johtuvat penisilliinin läsnäolosta eikä kefalosporiinin tai muun kontaminantin läsnäolosta.

5 Penisilliini N:n standardikäyrä valmistettiin lisäämällä 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 ja 20,0 µg penisilliini N:ää biomäärityskuoppiin. Penisillinaasi A:n aktiivisuus tarkistettiin myös lisäämällä 4 µl entsyymivalmistetta noin 200 µl:aan penisilliini N:ää (0,2 µg/ml).

10 Biomäärityslevyt koostuivat K131-ravintoagarista, joka valmistetaan liuottamalla 30,5 g BBL:n Antibiotic Mediumia # 11 (Becton Dickinson & Company, Cockeysville, MD) yhteen litraan deionisoitua vettä, kiehauttamalla liuos, jäädyttämällä 70°C:seen ja sitten autoklavoimalla 15 35 minuuttia 121°C:ssa ja 15 psi. Maljoille levitettiin 4 ml tuoretta yli yön kasvanutta *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) per 700 ml agarია. M. luteusta kasvatettiin K544-ravintoliemessä, jonka koostumus on: Difcon peptoni, 5,0 g, Difcon hiivauute 1,5 g, natriumkloridi, 3,5 g, dikaliumfosfaatti (vedetön), 3,7 g, monokaliumfosfaatti, 1,3 20 g, Difcon lihauute, 1,5 g, yhdessä litrassa deionisoitua vettä - - liuos kiehautetaan, jäädytetään 25°C:seen, pH säädetään 7,0:ksi 1N HCl:n ja 1N NaOH:n avulla, ja sitten autoklavoidaan 20 minuuttia ja 15 psi ennen käyttöä. Siirrostettu agar annosteltiin 100 x 15 mm:n maljoille, 15 ml 25 siirrostettua agarია maljaa kohti. Kuopat valmistettiin imun avulla käyttäen kertakäyttöistä 5 ml:n pipettia, kukin kuoppa oli 10 mm halkaisijaltaan.

Kun maljat oli valmistettu ja näytteet annosteltu kuoppiin, maljat laitettiin 37°C:n inkubaattoriin 18 tunniksi. 30 Määritystulokset määritettiin mittaamalla kunkin näytekuopan ympärillä olevan kirkkaan alueen halkaisija, joka on seurauksena siitä, ettei M. luteus kykene kasvaan, kun penisilliiniä on läsnä.

Määritystulokset on alla taulukoituna.

Taulukko II

Isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuus E. colin
K12 RV308/pIT337 solu-uutteissa

Näyte	Vyöhykkeen koko (mm)
5	
2 µg penisilliini N -standardi	16
5 " penisilliini N -standardi	18
10 " penisilliini N -standardi	27
20 " penisilliini N -standardi	31
10	
25 " E. coli K12 RV308/pIT337 solu-uutetta	10
50 " E. coli K12 RV308/pIT337 solu-uutetta	22
100 " E. coli K12 RV308/pIT337 solu-uutetta	27
150 " E. coli K12 RV308/pIT337 solu-uutetta	29
Kaikki käsitellyt penisilliininäytteet	0
15	
E. coli K12 RV308/pCZ106 solu-uutepuoli	0
Kontrollireaktiot ilman substraattia	0

Vaikkakin määrityksen lineaarisuus, mitattuna vyöhykkeen kokona, putoaa huomattavasti kun vyöhykekoko kasvaa yli 21 mm, osoittavat määritystulokset selvästi, että E. colin K12 RV308/pIT337 transformantit ilmentävät isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden, kun taas E. colin K12 RV308/pCZ106 transformantit eivät.

E. colin tuottama materiaali on huomattavasti pysyvämpää kuin Cephalosporium acremoniumista peräisin oleva isopenisilliini N -syntetaasi. Tämä suurempi pysyvyys havaittiin ensiksi jäädytys-sulatuskokeissa. C. acremoniumin isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuus inaktivoituu nopeasti uudelleen jäädytettäessä ja sulatettaessa, mutta tämän keksinnön mukainen E. colin tuottama isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuus on melkoisen resistentti jäädyttämiselle ja sulattamiselle.

Suurempi stabiilisuus johtuu luultavasti eroavaisuudesta entsyymiä valmistettaessa C. acremoniumin ja E. colin välillä. Esimerkiksi, C. acremoniumista eristetyllä

isopenisilliini N -syntetaasilla ei näytä olevan ensimmäisiä kahta aminoterminaalista aminohappotähdettä, metioniinia ja glysiiniä, jotka koodautuvat C. acremoniumin isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden koodaavassa DNA:ssa ja jotka ovat myös läsnä tämän keksinnön mukaisessa E. colin tuottamassa materiaalissa. Kuten tuodaan esiin julkaisussa Tsunasawa et al. J. of Biol. Chem. 260 (1985) 5382-91, E. coli tuottaa peptidaasia, joka katkaisee aminoterminaalisen metioniinitähteen proteiinista, kun seuraavalla tähteellä on suhteellisen pieni sivuketju. IPS-proteiinissa seuraa aminoterminaalista metioniinia glysiinitähde, joten aminoterminaalinen metioniini katkeaa.

Huomioon ottaen E. colin tuottaman isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuuden suurempi stabiilisuus ja erilainen aminohappotähdesekvenssi, sisältää tämä keksintö myös uuden proteiinin: E. colin tuottaman isopenisilliini N -syntetaasin.

Esimerkki 4

Plasmidin pPS20 konstruointi

20 A. HindIII:lla hajotetun plasmidin pIT335 valmistaminen

5 µl plasmidin pIT335 DNA:ta valmistettuna esimerkiksi 1B, joka vastaa noin 5 µg plasmidin DNA:ta, lisättiin ja sekoitettiin 5 µl:aan 10 x HindIII-puskuria (500 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM MgCl₂ ja 1 mg/ml BSA), 5 µl:aan (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä HindIII ja 35 µl:aan H₂O. Syntyneitä reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa neljä tuntia. HindIII:lla hajotettu plasmidin pIT335 DNA uutettiin kerran fenolilla ja kerran CHCl₃:lla. Uuttamisten jälkeen, HindIII:lla hajotettu plasmidin pIT335 DNA tehtiin 0,25 M:ksi NaCl:ssa, laimennettiin kahdella tilavuudella absoluuttista etanolia, jäähdytettiin kuivassa jääetanolihauteessa ja sitten saostunut DNA otettiin talteen sentrifugoimalla. Noin 5 µg HindIII-hajotettua plasmidin pIT335 DNA:ta, joka saatiin tällä menetelmällä,

liuotettiin 10 µl:aan TE-puskuria ja säilytettiin -20°C:ssa.

5 B. Plasmidin pIT221 HindIII-hajotus ja plasmidin pIT221 noin 2,7 kb:n HindIII-restriktiofragmentin eristäminen, joka plasmidi sisältää hygromysiiniresistenssin antavan geenin

10 EP-patenttijulkaisussa 177 243 kuvataan vektoreita ja olosuhteita *Cephalosporium acremonium*in transformoimiseksi. Konstruktiokulkukaaviot 1-6 ja esimerkit 1-6 jotka sisällytetään tähän viitteenä, kuvaavat plasmidin pIT221 konstruoinnin. Plasmidin pIT221 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 4.

15 Plasmidi pIT221 eristettiin *E. colista* K12 JA221/pIT221 oleellisesti tämän julkaisun esimerkin 1 menetelmän mukaisesti. Noin 50 µg plasmidia pIT221 hajotettiin 100 µl:ssa 1 x HindIII-reaktiopuskuria, jossa oli 100 yksikköä restriktioentsyymiä HindIII, oleellisesti esimerkin 4A menetelmän mukaisesti. HindIII:lla hajotetun plasmidin pIT221 DNA:n uuttamisen, saostamisen ja uudelleenliuotuksen jälkeen esimerkin 4A menetelmän mukaisesti, laitettiin 20 DNA 1 %:lle agarosigeelille elektroforeesia varten. Haluttu plasmidin pIT221 noin 2,7 kb:n HindIII-restriktiofragmentti, joka plasmidi sisältää hiivan *Saccharomyces cerevisiae* fosfoglyseraattikinaasin transkriptiota ja 25 translaatiota aktivoivan sekvenssin ja koodaa hygromysiiniresistenssin antavan fosfotransferaasientsyymiin, eristettiin ja puhdistettiin geelistä ja muista liuotustuotteista oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaisesti.

30 Noin 5 µg haluttua noin 2,7 kb:n HindIII restriktiofragmenttia eristettiin edellä kuvatulla menetelmällä. Saatu puhdistettu fragmentti liuotettiin 10 µl:aan TE-puskuria ja säilytettiin -20°C:ssa.

C. Plasmidin pPS20 lopullinen konstruointi

35 Noin 1 µl HindIII-hajotettua plasmidin pIT335 DNA:ta, joka oli valmistettu esimerkissä 4A, ja 4 µl plas-

midin pIT221 noin 2,5 kb:n HindIII-restriktiofragmenttia, joka oli valmistettu esimerkissä 4B, liitettiin 30 µl:ssa ligaatiopuskuria, jossa oli 100 yksikköä T4 DNA -ligaasia oleellisesti esimerkin 2C menetelmän mukaisesti. Ligatoitu DNA muodosti halutun plasmidin pPS20. Plasmidin pPS20 res-
5 triktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 5.

Noin 2,7 kb:n HindIII-restriktiofragmentti voisi sijoittua plasmidiin pIT335 molemmissa kahdesta orientaat-
tiosta, joten ligatoitu DNA muodosti myös toisen plasmidin
10 pPS20,1. Plasmidi pPS20,1 on toiminnallisesti ekvivalent-
tinen plasmidin pPS20 kanssa ja eroaa plasmidista pPS20
vain noin 2,7 kb:n HindIII-restriktiofragmentin orientaa-
tion suhteen.

D. E. colin K12 JA221/pPS20 konstruointi ja plasmidi-
15 din pPS20 DNA:n eristäminen

50 ml E. colin K12 JA221 (NRRL B-15211) viljelmää L-liemessä kasvatettiin OD₅₉₀-arvoon noin 0,2. Viljelmää
jäähdytettiin jäällä kymmenen minuuttia ja solut otettiin
talteen sentrifugoimalla. Solupelletti suspendoitiin 25
20 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂ ja inkuboitiin jäällä 25 minuut-
tia. Solut pelletoitettiin jälleen kerran sentrifugoimalla ja
pelletti suspendoitiin 2,5 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂ ja
inkuboitiin jäällä yli yön.

200 µl tätä solususpensiota sekoitettiin ligatoidun
25 DNA:n kanssa, joka oli valmistettu esimerkissä 4C, ja in-
kuboitiin jäiden päällä 20 minuuttia. Seosta inkuboitiin
sitten 2 minuutin ajan 40°C:ssa, mitä seurasi 10 minuutin
inkubointi huoneenlämmössä. 3 ml L-lientä lisättiin so-
luseokseen, ja sitten soluja inkuboitiin ilmaravistelijas-
30 sa 37°C:ssa kaksi tuntia.

Soluseoksen jakeita viljeltiin L-agarmaljoilla (L-
liemi, jossa on 15 g/l agarua), joissa oli 100 µg/ml ampi-
silliinia, ja maljoja inkuboitiin sitten 37°C:ssa. E. co-
lin K12 JA221/pPS20-transformantit osoitettiin oikeiksi
35 ampisilliiniresistenttien transformanttien plasmidi DNA:n

restriktioentsyymianalyysillä. Plasmidi-DNA:ta saatiin E. colin K12 JA221/pPS20 ja E. colin K12 JA221/pPS20,1 transformanteista oleellisesti esimerkin 1 menetelmän mukaisesti, mutta pienemmässä mitassa, ja CsCl-gradienttivaiheet jätettiin pois.

Esimerkki 5

A. Plasmidin pIT335 DNA:n NcoI-hajotus ja Klenow-käsittely ja syntyneen noin 0,85 kb:n fragmentin eristäminen, joka fragmentti koodaa Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin

Noin 50 µl, vastaten 50 µg, plasmidin pIT335 DNA:ta, jota oli valmistettu esimerkissä 1, lisättiin ja sekoitettiin 10 µl:aan 10 x BamHI-puskuria, 5 µl:aan (noin 50 yksikköä) restriktioentsyymiä NcoI, ja 35 µl:aan H₂O. Syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa neljä tuntia. Reaktioseos tehtiin sitten 0,25 M:ksi NaCl:ssa, laimennettiin kahdella tilavuudella absoluuttista etanolia, jäädytettiin 10 minuuttia kuivassa jää-etanoli -hauteessa ja; sentrifugoitiin saostuneen DNA pellettoimiseksi. NcoI-hajotettu plasmidin pIT335 DNA-pelletti liuotettiin 50 µl:aan 1 x Klenow-puskuria (40 mM KPO₄, pH 7,5, 6,6 mM MgCl₂, 1,0 mM 2-merkaptoetanolii, 33 µM dATP, 33 µM dCTP, 33 µM dGTP, ja 33 µM TTP). 2 µl (noin 10 yksikköä, New England Biolabs) E. colin DNA-polymeraasi I:n, tunnettu nimellä Klenow, suurta fragmenttia lisättiin ja sekoitettiin DNA:n kanssa, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 16°C:ssa yksi tunti. Reaktio lopetettiin uuttamalla puskuroidulla fenolilla.

NcoI-hajotettu, Klenow-käsitelty plasmidin pIT335 DNA laitettiin sitten 1 %:lle agarosigeelille elektroforeesia varten. Noin 0,85 kb:n restriktiofragmentti, joka sisältää Cephalosporium acremoniumin IPS-geenin transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin, eristettiin geeliltä ja puhdistettiin oleellisesti esimerkin 2B mukai-

sesti. Noin 4 µg haluttua fragmenttia saatiin ja suspen-
doitiin 10 µl:aan TE-puskuria.

B. Välituote plasmidin pPS19 konstruointi

1 µl plasmidin pIT221 DNA:ta liuotettiin viiteen
5 µl:aan 10 x XmaI-puskuria (250 mM NaCl, 60 mM Tris-HCl, pH
7,5, 60 mM MgCl₂, 60 mM 2-merkapttoetanol ja 1 mg/ml BSA),
43 µl:aan H₂O:ta ja 2 µl:aan (noin 10 yksikköä) restriktio-
entsyymiä XmaI. Syntyneitä reaktiota inkuboitiin 37°C:ssa
neljä tuntia. Reaktio lopetettiin fenoliuutolla. XmaI-re-
10 aktioseos uutettiin CHCl₃:lla, minkä jälkeen reaktioseos
tehtiin 0,25 M:ksi NaCl:ssa, laimennettiin 2:lla tilavuu-
della absoluuttista etanolia, jäädytettiin 10 minuuttia
kuivassa jää-etanoli-hauteessa ja saostunut XmaI-hajotettu
plasmidin pIT221 DNA pelletoitettiin sentrifugoimalla.

15 XmaI:llä hajotettu plasmidin pIT221 DNA liuotettiin
uudelleen 100 µl:aan IX ligaatiopuskuria, jossa oli 500
yksikköä T4 DNA -ligaasia. Ligaatioreaktiota inkuboitiin
12°C:ssa noin 16 tuntia ja käytettiin sitten E. colin K12
JA221 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 4D mene-
20 telmän mukaisesti. Ampisilliiniresistentit plasmidin pPS19
transformantit identifioitiin transformanttien plasmidi-
DNA:n restriktioentsyymianalyysillä. Plasmidin pPS19 DNA:-
ta valmistettiin oleellisesti esimerkin 1 menetelmän mu-
kaisesti. Plasmidin pPS13 restriktiopaikka ja toiminta-
25 kartta on esitetty kuviossa 6.

C. Plasmidin pPS19 DNA:n BamHI-hajotus ja Klenow- käsittely ja noin 7,7 kb:n fragmentin eristämi- nen

30 50 µg plasmidin pPS19 DNA:ta hajotettiin restriktio-
entsyymillä BamHI ja käsiteltiin Klenowilla oleellises-
ti esimerkin 4A menetelmän mukaisesti, paitsi että BamHI-
restriktioentsyymiä, eikä NcoI-restriktioentsyymiä, käy-
tettiin hajottamaan plasmidin pPS19 DNA:ta. BamHI:llä ha-
jotettu, Klenow-käsitelty plasmidin pPS19 DNA laitettiin 1
35 %:lle agarosigeelille, ja noin 7,7 kb:n fragmentti eris-

tettiin ja puhdistettiin oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaisesti. Noin 5 µg haluttua fragmenttiä saatiin, liuotettiin 10 µl:aan TE-puskuria ja säilytettiin -20°C:ssa.

5 D. Plasmidin pPS21 lopullinen konstruointi

2 µl noin 0,85 kb:n fragmenttiä, joka oli valmistettu esimerkissä 5A, liitettiin 2 µl:aan noin 7,7 kb:n fragmenttia, joka oli valmistettu esimerkissä 5C, 30 µl:ssa 1 x ligaatiopuskuria, joka sisälsi 500 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Ligaatioreaktioseosta inkuboitiin 12°C:ssa 16 tuntia, ja liitetty DNA muodosti halutun plasmidin pPS21 DNA:n.

E. E. colin JA221/pPS21 konstruointi

15 Ligatoitua DNA:ta, jota oli valmistettu esimerkissä 5D, käytettiin E. colin K12 JA221 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 4D menetelmän mukaisesti. Ampisilliiniresistentit transformantit seulottiin plasmidin pPS21 läsnäolon suhteen transformanttien plasmidi-DNA:n restriktioentsyymianalyysillä. Koska noin 0,8 kb:n fragmentti saattoi sijoittua plasmidin pPS19 noin 7,7 kb:n fragmenttiin jommassa kummassa kahdesta orientaatiosta, ja koska vain yksi sijainti on oikeassa asemassa Cephalosporium acremoniumin transkriptiota ja translaatiota aktivoivaan sekvenssiin nähden hygromysiiniresistenssin antavan geenin
25 ekspressiota varten, vain noin puolet transformanteista olivat haluttua E. colia K12 JA221/pPS21. Yhtä sellaista E. colin K12 JA221/pPS21 -transformanttia käytettiin plasmidin pPS21 DNA:n valmistamiseksi oleellisesti esimerkin 1 menetelmän mukaisesti.

Esimerkki 6

Cephalosporium acremoniumin geneettinen transformointi plasmideilla pPS20 ja pPS21

EP-patenttijulkaisussa 177 243 kuvataan seuraava transformatiomenetelmä.

A. Cephalosporium acremonium -kannat

Edullinen Cephalosporium-kanta transformatiota varten saadaan American Type Culture Collectionista, Rockville, Maryland, talletusnumerolla ATCC 11550. Muut Cephalosporium-kannat tai mitkä tahansa kaupalliset kannat, jotka on johdettu ATCC 11550:stä mutaatiolla, valinnalla tai geneettisellä jalostuksella kefalosporiini C:n parannetun tuoton aikaansaamiseksi, ovat myös sopivia käytettäväksi transformanttien valmistukseen tämän keksinnön mukaisilla vektoreilla ja plasmideilla.

B. Soluviljelmän siirroksen valmistaminen

Cephalosporium acremonium -solujen geneettiseksi transformoimiseksi tehokkaasti, on välttämätöntä poistaa soluseinät stabiilien protoplastien muodostamiseksi. Sellaisen protoplastien valmistuksessa on hyvin edullista aloittaa tasalaatuisella siirroksella. Muutoin solujen preparointi viljelmässä ei ole toistettavissa ja aikaa menetetään yrityksissä valmistaa C. acremoniumin protoplasteja epäsopeista ja riittämättömistä solumääristä.

C. Soluviljelmän tasalaatuisen siirroksen valmistaminen

Ampulli itiöitä (suunnilleen 10^9 konidiaa 1,5 ml:ssa säilytysalustaa: 5 % laktoosi, 10 % glyseroli ja 0,1 % Tween 80)1 joko lyofilisoituna tai otettuna nestetyypivarastosta ja sulatettu huoneenlämmössä, laimennetaan 5 ml:aan steriiliä salinia. Noin 0,1 ml tätä suspensiota käytetään siirrostettaessa jokainen noin 50:stä vinopinnasta, jotka sisältävät 20 ml Tryptikaasi[®]-Soy Agar-(BBLTM, Division of Becton, Dickinson & Company, Cockeysville, Maryland 21030) -alustaa. Ennen siirrostamista alustan anne-

taan kuivua kunnes pintakosteutta ei enää havaita. Siirrostettuja vinopintoja inkuboidaan noin neljä päivää 25 °C:ssa. Noin 10 ml säilytysalustaa lisätään myseelikasvustoon, joka peittää jokaisen vinopinta-alustan pintaa. Vinopintoja sekoitetaan koeputkisekoittajalla konidioiden suspendoimiseksi ja kunkin vinopinna konidiosuspensio yhdistetään ja jäädytetään 10 ml:n erinä -80°C:ssa. Jäädytynyt konidiosuspensio menettää hitaasti elinkykynsä, eikä sitä tulisi käyttää noin kolmen kuukauden säilytyksen jälkeen -80°C:ssa.

D. Solujen kasvatus protoplastien valmistusta varten

Noin 106 ml nestemäistä alustaa 500 ml:n ravistelupullossa siirrostetaan soluilla jäätyneestä 10 ml:n itiösuspensiosta, joka oli valmistettu esimerkissä 6C. Solut saadaan sentrifugoimalla (10 min x 2600 rpm), ja suspendoidaan sitten suoraan nestemäiseen kasvualustaan ^{*)}. Supernatantin dekantointi on välttämätöntä ennen suspendointia, koska laktoosi ja glyseroli vaikuttavat haitallisesti solujen kasvuun. Pullo, jossa suspendoidut solut ovat, laitetaan pyörivää liikettä tekevään vesihauderavistelijaan ja inkuboidaan 29-30°C:ssa 24 tuntia 285 rpm 1 tuuman liike. Suositeltu 29-30°C:n lämpötila viljelyvaiheessa on erityisen edullinen transformoitavien protoplastien valmistukseen, mutta myös alemmat noin 25°C:n lämpötilat ovat sopivia. Alan ammattimiehet, huomaavat, että 29-30°C on erilainen kuin lämpötila (25°C), joka on edullinen viljeltäessä *Cephalosporium acremonium*ia antibioottien tuotantotarkoituksissa.

^{*)}Nestemäinen kasvualusta valmistettiin seuraavasti: 100 ml liuosta A annostellaan 500 ml:n ravistuspulloon, pullo suljetaan kaupallisella tulpalla ja autoklavoidaan 121°C:ssa 20 minuutin ajan. 2 ml liuosta B ja 4 ml liuosta C lisätään sitten liuokseen A nestemäisen kasvualustan valmistamiseksi.

Liuos A: sakkaroosi, 36 g/l, L-asparagiini, 7,5 g/l, KH_2PO_4 , 15 g/l, K_2HPO_4 , 21 g/l, Na_2SO_4 , 0,75 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,18 g/l, CaCl_2 , 0,06 g/l, suolaliuos 1 ml/l, säätämätön pH. Suolaliuos: $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/l) Liuos B: glukooosi, 108 g/l (autoklavoitu 121°C, 30 min). Liuos C: sakkaroosi, 25 g/l, maissin liotusvesi (4 % w/v tyyppi), 12,5 ml, ammoniumasetatti, 5,5 g/l, CaCO_3 , 5 g/l, pH säädetty KOH:lla 6,5, ja autoklaavissa 121°C:ssa 20 minuuttia.

10 E. Cephalosporium-protoplastien valmistaminen

Solut 24 tunnin ikäisestä viljelmästä otetaan talteen imusuodatuksella (Whatman # 1 paperi Büchnersuppilossa) ja suspendoidaan McIlvain's puskuriin, pH 7,1 (0,1 M sitruunahappo ja 0,2 M kaksiemäksinen natriumfosfaatti), johon on lisätty ditiotreitolia pitoisuuteen 0,01 M. Riittävä määrä puskuria lisätään jotta saataisiin lopullinen solupitoisuus 1 g (punnittu imusuodatuksen jälkeen) solumassaa 20 ml puskuria kohti. Solususpensio laitetaan pyörivää liikettä tekevään vesihauderavistelijaan 50 ml:n ravistuspullossa ja inkuboidaan 29-30°C:ssa 90 minuuttia 140 rpm, yhden tuuman liike. Ditiotreitolilla käsitellyt solut pestään vedellä ja suspendoidaan sitten entsyymiliuokseen (25 mg/ml beta-glukuronidaasi, Sigma Chemical Company, McIlvaine's puskurissa, pH 6,35, johon on lisätty 0,8 M NaCl ja 0,02 M MgSO_4). Lopullinen solupitoisuus on 1 g käsiteltyä solumassaa 10 ml entsyymiliuosta kohti. Solususpensio laitetaan sitten pyörivää liikettä tekevälle vesihauderavistelijalle 29-30°C:ssa kolmeksi tunniksi 120 rpm, 1 tuuman liike. Protoplastien suspensio laimennetaan 4 tilavuudella pesuliuosta (0,8 M NaCl ja 0,02 M MgSO_4) ja sitten suodatetaan ilman imua kahden paperipyyhekerroksen läpi. Suodos, joka sisältää protoplastit, sentrifugoidaan huoneenlämmössä 5 minuuttia 2600 rpm. Supernatantti dekantoidaan ja protoplastipelletti suspendoidaan 10 ml:aan pesuliuosta. Pesumenettely toistetaan kahdesti, sitten

protoplastit suspendoidaan riittävään määrään 0,8 M NaCl konsentraation $2-3 \times 10^8$ protoplastia ml kohti saavuttamiseksi, laskettuna hemasytometrillä.

F. Transformaatiomenettely

5 Kutakin transformoitavaa plasmidia varten lisätään
1 ml Cephalosporiumin protoplastisuspensiota ($2-3 \times 10^8$ per
ml) 0,8 M NaCl:ssa 0,005 ml:aan juuri tislattua DMSO:ta ja
tehdään sitten 80 mM:ksi CaCl_2 :ssa. Noin 20 μg transformoi-
vaa plasmidia, transformaatiosta riippuen joko pPS20 tai
10 pPS21, ja polyetyleeniglykolia 4000 (Baker, > 20 % w/v
vedessä) lisätään protoplastisuspensioon, seoksen muodos-
tamiseksi, jonka tilavuus on 10 ml. Seosta inkuboidaan 10
minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoidaan sitten 700
rpm 5 minuuttia, mitä seuraa sentrifugointi 2500 rpm 10
15 minuuttia. Protoplastipelletti suspendoidaan 1 ml:aan 0,8
M NaCl:ia. Jakeita (0,1 ml) siirretään tryptikaasi-soija-
agaralustan pinnalle (BBL), joka on rikastettu 10,8 %:lla
sakkaroosia protoplastien osmoottiseksi stabiloimiseksi.
20 Petriمالجات inkuboidaan 24 tuntia 15°C :ssa, minkä jälkeen
jokaiseen maljaan lisätään 4 ml nesteytettyä agarია ($0,41$
% w/v, 42°C :ssa), jossa on 0,8 M NaCl ja riittävästi hyg-
romysiiniä, jotta saavutetaan loppukonsentraatio 100 $\mu\text{g}/$
ml. Kun päällimäinen kerros on jähmettynyt, inkuboidaan
petriمالجوا sitten 25°C :ssa kosteuskaapissa. Vaikkakin
25 jatkoviljelyyn riittävän kokoiset transformanttipesäkkeet
ovat läsnä 12 päivää transformaation jälkeen, hitaammin
kasvavilta transformanteilta voi viedä niinkin kauan kuin
60 päivää, että ne saavuttavat sopivan koon jatkoviljelyä
varten. Epäonnistuneet transformantit on helposti erotet-
30 tavissa pysyvistä transformanteista, koska epäonnistuneet
transformantit eivät pysty kasvamaan jatkoviljeltäessä
tuoreessa kasvualustassa, jossa on 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromysiiniä.

G. *Cephalosporium acremonium*/pPS20 - ja *C. acremonium*/pPS21 -transformanttien analyysi

Cephalosporium acremonium/pPS20 -transformantit ekspressoivat merkittävästi suurempia tasoja isopenisilliini N -syntetaasin aktiivisuutta kuin kontrolliplasmidien X. *acremonium*-transformantit, kuten plasmidi pIT221. Tästä suuresta aktiivisuustasosta seuraa transformanttien lisääntynyt kyky valmistaa isopenisilliini N:ää, joko fermentaatiossa tai *C. acremonium*/pPS20 -transformanttien solu-uutteissa. *Cephalosporium acremonium*/pPS21 -transformantit ovat hygromysiiniresistenttejä, mikä osoittaa tämän keksinnön mukaisen *C. acremonium*in transkriptiota ja translaatiota aktivoivan sekvenssin toimivuuden.

Esimerkki 7

15 Plasmidien pPS21A, pPS22, pPS23, pPS23,1, pPS24, pPS25 ja pPS25,1 konstruoiminen

A. Välituoteplasmidien pPS23 ja pPS23,1 konstruointi

(i) BamHI-hajotetun plasmidin pUC8 valmistaminen

20 Noin 5 µg plasmidia pUC8 (saatu Pharmacia P-L Biochemicals'ilta) liuotettiin 5 µl:aan 10 x BamHI-reaktiopuskuria ja 40 µl:aan H₂O. Noin 5 µl (50 yksikköä) restriktioentsyymiä BamHI lisättiin DNA-liuokseen, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa kaksi tuntia. Reaktio lopetettiin uuttamalla puskuroidulla fenolilla, jota seurasi uutto kloroformilla. BamHI:llä hajotettu plasmidin pUC8 DNA saostettiin säätämällä NaCl-pitoisuus 0,25 M:ksi, lisäämällä 2 tilavuutta etanolia ja jäähdyttämällä -70°C:ssa 10 minuuttia. BamHI-hajotetun plasmidin pUC8 DNA otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 5 µl:aan H₂O.

(ii) Plasmidin pIT335 noin 0,85 kb:n NcoI-restriktiofragmentin eristäminen

35 Noin 10 µg plasmidia pIT335 liuotettiin 5 µl:aan 10 x BamHI-puskuria ja 40 µl:aan H₂O. Noin 5 µl (50 yksikköä) restriktioentsyymiä NcoI lisättiin DNA-liuokseen, ja syn-

P-L Biochemicalsilta, L-liemessä kasvatettiin OD₅₉₀-arvoon noin 0,5 absorbanssiyksikköä. Viljelmää jäähdytettiin jäiden päällä 10 minuuttia, ja solut otettiin talteen sentrifugoimalla. Solupelletti suspendoitiin 25 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂:a ja inkuboitiin jäiden päällä 25 minuuttia. Solut pellettoitiin jälleen kerran sentrifugoimalla, ja solupelletti suspendoitiin 2,5 ml:aan kylmää 100 mM CaCl₂:a ja inkuboitiin jäiden päällä yli yön.

200 µl tätä solususpensiota sekoitettiin ligatoidun DNA:n kanssa, jota valmistettiin edellä, ja inkuboitiin jäiden päällä 20 minuuttia. Tämän jakson lopussa solut asetettiin vesihauteeseen 42°C:seen 2 minuutiksi ja palautettiin sitten jäihin vielä 10 minuutiksi. Solut otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 1 ml:aan L-lientä ja inkuboitiin 37°C:ssa 2 tuntia.

Eriä soluseoksesta viljeltiin L-agarmaljoilla (L-liemi, jossa oli 15 grammaa litra agarria kohti), joissa oli 100 µg ampicilliinia/ml, 40 µg X-gal/ml, ja 40 µg IPTG/-ml. Maljoja inkuboitiin 37°C:ssa yli yön. Pesäkkeet, jotka sisältävät plasmidin ilman inserttiä, kuten E. coli K12 JM109/pUC8, näyttävät sinisiltä näillä maljoilla. Pesäkkeet, jotka sisältävät plasmidin insertin kanssa, kuten E. coli K12 JM109/pPS23, ovat valkoisia. Useita valkoisia pesäkkeitä valittiin ja seulottiin suorittamalla niiden plasmidi-DNA:n restriktioanalyysi noin 0,85 kb:n BamHI-restriktiofragmentin läsnäolon suhteen, jossa fragmentissa on IPS:n aktivoiva sekvenssi. Plasmidi-DNA:ta saatiin E. colin K12 JM109/pPS23 ja E. colin K12 JM109/pPS23,1 soluista oleellisesti kuten esimerkissä 2A on kuvattu.

B. Plasmidin pPS23 noin 0,85 kb:n BamHI-restriktiofragmentin eristäminen

Noin 50 µg plasmidin pPS23 DNA:ta liuotettiin 15 µl:aan 10 x BamHI-reaktiopuskuria ja 125 µl:aan H₂O. Noin 10 µl (100 yksikköä) restriktioentsyymiä BamHI lisättiin DNA-liuokseen ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa kak-

si tuntia. BamHI:llä liuotettu plasmidi pPS23 DNA laitettiin 1 % agarosigeelille, ja noin 0,85 kb:n BamHI-restriktiofragmentti, joka sisältää IPS-geenin aktivoivan sekvenssin, eristettiin oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaisesti. Haluttua fragraenttia saatiin noin 5 µg ja se suspendoitiin 10 µl:aan H₂O.

C. BamHI:llä hajotetun plasmidin pPS19 DNA:n valmistaminen

Noin 5 µg plasmidin pPS19 DNA:ta liuotettiin 10 µl:aan 10 x BamHI-reaktiopuskuria ja 35 µl:aan H₂O. Noin 5 µl (50 yksikköä) restriktioentsyymien BamHI lisättiin plasmidin pPS19 DNA-liuokseen, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 37°C:ssa kaksi tuntia. Reaktioseosta, jossa oli BamHI:llä hajotettua plasmidin pPS19 DNA:ta, uutettiin kerran puskuroidulla fenolilla ja sitten kahdesti fenolilla. DNA saostettiin sitten, otettiin talteen sentrifugomalla ja suspendoitiin uudelleen 10 µl:aan H₂O.

D. Plasmidien pPS21A, pPS22, pPS24, pPS25 ja pPS25,1 lopullinen konstruktio

Noin 1 µl noin 0,86 kb:n BamHI-restriktiofragmenttia lisättiin seokseen, jossa oli 1 µl BamHI:llä hajotettua plasmidin pPS19 DNA:ta, 3 µl 10 x ligaasipuskuria, 2 µl T4 DNA -ligaasia, ja 23 µl H₂O. Syntynyttä ligaatioreaktioseosta inkuboitiin yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA käsitti halutut plasmidit pPS21A, pPS22, pPS24, pPS25 ja pPS25,1.

Ligatoitua DNA:ta käytettiin E. coli K12 C600:n transformointiin, mikä kanta on saatavissa American Type Culture Collectionista, Rockville, MD 20852, talletusnumerolla ATCC 33525, oleellisesti esimerkin 7A (iv) menetelmän mukaisesti. Transformoidut solut viljeltiin L-agar-maljoilla, joissa oli 100 µg/ml ampisilliinia, ja maljoja inkuboitiin yli yön +37°C:ssa.

Yksittäisiä pesäkkeitä poimittiin transformaatiomaljoilta, viljeltiin ja käytettiin plasmidi-DNA:n valmis-

tukseen. Plasmidi-DNA analysoitiin restriktioentsyymiana-
lyysillä. Seuraavassa taulukossa osoitetaan sopivat res-
triktioentsyymien hajotustuotteet, joita voidaan käyttää
plasmidien erottamiseksi toisistaan.

5

Plasmidi	Entsyymi	kappaleiden koko(kb)
pPs19	<u>BamHI</u>	7,62 ja 0,23
	<u>PstI</u>	5,15, 1,85 ja 0,85
10 pPS21A	<u>BamHI</u>	7,62 ja 0,85
	<u>PstI</u>	5,15, 1,85, 0,99 ja 0,49
pPS22	<u>BamHI</u>	7,62 ja 0,85
	<u>PstI</u>	5,15, 1,85, 0,94 ja 0,54
15 pPS24	<u>BamHI</u>	7,62
	<u>PstI</u>	7,62
20 pPS25 ja pPS25,1	<u>BamHI</u>	5,15, 1,85, 0,99 ja 0,72
	<u>PstI</u>	7,62, 0,85 ja 0,23

25 Plasmidien pPS21A ja pPS25 restriktiopaikka- ja toiminta-
kartat esitetään kuvioissa 8 ja 9, vastaavasti.

Plasmideja -PS21A, pPS25,1 ja pPS25 käytettiin Cep-
halosporium acremoniumin transformoimiseksi oleellisesti
esimerkin 6 menetelmän mukaisesti. C. acremonium/pPS21A-,
C. macremonium/pPS25,1- ja C. acremonium/pPS25 -transfor-
30 mantit olivat hygromysiiniresistenttejä. Plasmideja pPS22
ja pPS24 käytettiin myös C. acremonium transformoimiseksi,
mutta nämä plasmidit transformoivat C. acremoniumin hygro-
mysiiniresistentiksi paljon alhaisemmalla frekvenssillä
kuin plasmidit pPS21A, pPS25,1 ja pPS25, oletettavasti sen
35 vuoksi, että plasmidien pPS22 ja pPS24 täytyy liittyä C.
acremoniumin genomiin sopivassa orientaatiossa, jotta C.
acremoniumin genomien aktivoiva sekvenssi voisi toteuttaa
hygromysiiniresistenssin antavan geenin ekspression.

Esimerkki 8

Plasmidien pPS28 ja pPS29 konstruointi

Noin 20 µl plasmidin pPS21A DNA:ta liuotettiin 10 µl:aan 10 x PstI-reaktiopuskuria (1,0 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂, ja 1 mg/ml BSA) ja 88 µl:aan H₂O. Noin 2 µl (150 yksikköä) restriktioentsyymiä PstI lisättiin DNA-liuokseen, reaktioseosta inkuboitiin 4 minuuttia 37°C:ssa, ja sitten reaktio lopetettiin inkubamalla 10 minuuttia 70°C:ssa. Osittain PstI-hajotettu plasmidin pPS21A DNA laitettiin agarosigeelille ja elektroforeesin ja geelin värjäyksen jälkeen havaittiin seuraavat kappaleet: 8,5 kb (lineaarisoitu plasmidi), 8,0 kb, 7,5 kb, 7,0 kb, 6,6 kb, 6,1 kb, 5,2 kb, 3,3 kb, 2,3 kb, 1,9 kb, 1,5 kb, 1,0 kb, ja 0,5 kb. Noin 6,6 kb:n ja noin 6,1 kb:n PstI-restriktiofragmentit eristettiin erikseen oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaisesti; kumpaakin fragmenttia saatiin talteen noin 0,5 µg. Noin 6,6 kb:n PstI-restriktiofragmentti liuotettiin 3 µl:aan 10 x ligasipuskuria ja 25 µl:aan H₂O. Noin 2 µl T4 DNA -ligaasia lisättiin DNA-liuokseen, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA muodosti halutun plasmidin pPS28 DNA:n, jota käytettiin E. coliin K12 C600 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 7 menetelmän mukaisesti. Samalla tavalla suljettiin noin 6,1 kb:n PstI-restriktiofragmentti ligatoimalla, jolloin saatiin pPS29, joka myös transformoitiin E. coliin K12 C600. Plasmidien pPS28 ja pPS29 restriktiopaikka- ja toimintakartat on esitetty kuvissa 10 ja 11, vastaavasti.

Plasmideja pPS28 ja pPS29 käytettiin *Cephalosporium acremonium*in transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 6 menetelmän mukaisesti. *C. acremonium*/pPS28 - ja *C. acremonium*/pPS29, -transformanteilla oli hygromysiiniresistentti fenotyyppi ja plasmidien pPS28 ja pPS29 DNA transformoi *C. acremonium*in hygromysiiniresistentiksi suurella frekvenssillä.

Esimerkki 9

Plasmidien pPS26 ja pPS26,1 konstruointi

Noin 20 µg plasmidia pPS21A liuotettiin 10 µl:aan
10 x HindIII-reaktiopuskuria ja 85µl H₂O. Noin 5 µl (50 yk-
5 sikköä) restriktioentsyymiä HindIII lisättiin DNA-liuok-
seen ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin kaksi tuntia
37°C:ssa. HindIII-hajotettu plasmidin pPS21A DNA lai-
tettiin 1 % agarosigeelille ja suoritettiin elektroforee-
si kunnes noin 3,45 kb:n, noin 3,16 kb:n, noin 1,2 kb:n ja
10 0,69 kb:n HindIII-restriktiofragmentit erottuivat selvästi
geelillä. Noin 3,45 kb:n HindIII-restriktiofragmentti
eristettiin oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaises-
ti. Noin 5 µg haluttua noin 3,45 kb:n HindIII-restriktio-
fragmenttia saatiin ja suspendoitiin 10 µl:aan H₂O.

15 Noin 2 µl plasmidin pPS21A noin 3,45 kb:n HindIII-
restriktiofragmenttia lisättiin 1 µl:aan HindIII-hajotet-
tua plasmidia pIT335, jota oli valmistettu esimerkissä 4A,
3 µl:aan 10 x ligaasipuskuria, 22 µl:aan H₂O ja 2 µl T4 DNA
-ligaasia. Syntynyttä ligaatioreaktioseosta inkuboitiin
20 yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA muodosti halutut plasmidit
pPS26 ja pPS26,1. Ligatoitua DNA:ta käytettiin E. coli
K12 C600 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 7 mene-
telmän mukaisesti. E. coli K12 C600/pPS26 - ja E. coli K12
C600/pPS26,1 -transformantit identifioitiin ampisilliini-
25 resistentin fenotyypin suhteen ja niiden plasmidi-DNA:n
restriktioentsyymianalyysillä. Plasmidin pPS26 restriktio-
tiopaikka ja toimintakartta on esitetty kuviossa 12.

Plasmideja pPS26 ja pPS26,1 käytettiin Cephalosporium
acremoniumin transformoimiseksi oleellisesti esimer-
kin 6 menetelmän mukaisesti. Plasmidit pPS26 ja pPS26,1
30 transformoivat C. acremoniumin hygromysiinille resisten-
tiksi suurella frekvenssillä ja C. acremonium/pPS26 - ja
C. acremonium/pPS26,1 -transformantit tuottivat merkittä-
västi enemmän isopensilliini N:ää, mitattuna Micrococcus
35 luteuksen kasvun inhibiitiovyöhykkeinä, kuin niiden ei-
transformoidut rinnakkaisviljelmät.

Esimerkki 10

Plasmidien pPS30, pPS30,1, pPS31 ja pPS31,1 konstruointi

A. Plasmidin pPS6 noin 3,7 XmaI-restriktiofragmentin eristäminen

5

Plasmidi pPS6 kuvataan EP-patenttijulkaisun 177 243 esimerkissä 13, joka sisällytetään tähän viitteenä. Noin 10 µg plasmidia pPS6 liuotettiin 20 µl:aan 10 x XmaI-reaktiopuskuria (250 mM NaCl, 100 mM Tris-ELCl, pH 7,5, 100 mM MgCl, 100 mM 2-merkaptoetanolli, ja 1 mg/ml BSA) ja 165 µl:aan H₂O. Noin 15 µl (30 yksikköä) restriktioentsyymiä XmaI lisättiin plasmidin pPS6 DNA-liuokseen ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin neljä tuntia 37°C:ssa.

XmaI:llä hajotettu plasmidin pPS6 DNA laitettiin 15 % agarosigeelille ja sille tehtiin elektroforeesi, kunnes noin 3,7 kb:n XmaI-restriktiofragmentti erottui selvästi muista hajotustuotteista. Noin 3,7 kb:n XmaI-restriktiofragmentti eristettiin sitten oleellisesti esimerkin 2B menetelmän mukaisesti. Noin 5 µg haluttua noin 3,7 kb:n XmaI-restriktiofragmenttia saatiin ja suspendoitiin 10 µl:aan H₂O.

20

B. Plasmidien pPS30 ja pPS30,1 lopullinen konstruointi

Noin 1 µg plasmidin pPS21A DNA:ta liuotettiin 25 µl:aan 10 x XmaI-reaktiopuskuria ja 6 µl:aan H₂O. Noin 2 µl (6 yksikköä) restriktioentsyymiä XmaI lisättiin plasmidin pPS21A DNA-liuokseen ja syntynyttä reaktiota inkuboitiin neljä tuntia 37°C:ssa. Reaktio lopetettiin uuttamalla puskuroidulla fenolilla, mitä seurasi kaksi uuttoa kloroformilla. Reaktioseos saostettiin sitten, otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 23 µl:aan H₂O.

30

Noin 2 µl plasmidin pPS6 noin 3,7 kb:n XmaI-restriktiofragmenttia, 3 µl 10 x ligaasi-puskuria ja 2 µl T4 DNA-ligaasia lisättiin XmaI:llä hajotetun plasmidin pPS21A DNA-liuokseen, ja syntynyttä ligaatioreaktioseosta inku-

35

boitiin yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA muodosti halutut plasmidit pPS30 ja pPS30,1, jotka eroavat toisistaan ainoastaan noin 3,7 kb:n XmaI-fragmentin orientaation puolesta.

5 Ligatoitua DNA:ta käytettiin E. coli K12 C600 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 7 menetelmän mukaisesti. E. coli K12 C600/pPS30 - ja E.coli K12 C600/pPS30,1 -transformantit identifioitiin niiden ampicilliniresistentin fenotyypin osalta ja niiden plasmidi-DNA:n
10 restriktioentsyymianalyysillä.

Plasmideja pPS30 ja pPS30,1 käytettiin myös Cephalosporium acremoniumin transformoimiseksi. C. acremonium/pPS30 ja C. acremonium/pPS30,1 -transformantit olivat resistenttejä hygromysiinille.

15 C. Plasmidien pPS31 ja pPS31,1 lopullinen konstruointi

Plasmidit pPS31 ja pPS31,1 konstruointiin ja sitten transformoitiin E. coliin K12 C600 ja Cephalosporium acremoniumiin oleellisesti esimerkin 10B menetelmän mukaisesti sillä poikkeuksella, että plasmidia pPS29, eikä plasmidia pPS21A, käytettiin lähtömateriaalina konstruoinnissa.

Esimerkki 11

Plasmidin pPS27 konstruointi

25 A. Plasmidin pIT336 konstruointi

Noin 1 µg plasmidia pUC8 liuotettiin 2 µl:aan 10 x BamHI-reaktiopuskuria ja 16 µl:aan H₂O. Noin 2 µl (20 yksikköä) restriktioentsyymiä BamHI lisättiin plasmidin pUC8 DNA-liuokseen, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin
30 kaksi tuntia 37°C:ssa. BamHI:llä hajotettu plasmidin pUC8 DNA saostettiin, otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 2 µl:aan 10 x Sali-reaktiopuskuria (1,5 M NaCl, 60 mM Tris-HCl, pH 7,9, 60 mM MgCl₂; 60 mM 2-merkaptota-noli, ja 1 mg/ml BSA) ja 16 µl:aan H₂O. Noin 2 µl (20 yksikköä) restriktioentsyymiä Sali lisättiin BamHI:llä hajo-

tetun plasmidin pUC8 DMA-liuokseen ja syntynyttä reaktio-
seosta inkuboitiin kaksi tuntia 37°C:ssa. Reaktio lopetet-
tiin fenolilla uuttamalla kanssa, mitä seurasi kaksi uut-
toa kloroformilla Sali-BamHI:llä hajotetun plasmidin pUC8
5 DNA saostettiin, otettiin talteen sentrifugoimalla ja sus-
pendoitiin 5 µl:aan H₂O.

Noin 10 µg plasmidia pIT335 liuotettiin 10 µl:aan
10 x BamHI-reaktiopuskuria ja 80 µl:aan H₂O. Noin 5 µl (50
yksikköä) kumpaakin restriktioentsyymiä XhoI ja BamHI li-
10 sätettiin plasmidin pIT335 DNA:n liuokseen ja syntynyttä
reaktioseosta inkuboitiin kaksi tuntia 37°C:ssa. Reak-
tioseos laitettiin sitten 1 % agarosigeelilla ja sitten
tehtiin elektroforeesi kunnes noin 1,4 kb:n BamHI-XhoI -
restriktiofragmentti erottui muista reaktiotuotteista,
15 jotka olivat 5,6 kb:n, 1,3 kb:n ja 0,01 kb:n fragmentit.
Noin 1,4 kb:n BamHI-XhoI -restriktiofragmentti, joka si-
sälsi IPS-geenin transkription lopetus- ja mRNA:n polyade-
nylaatio- ja prosessisignaalit, eristettiin oleellisesti
esimerkin 2B mukaisesti. Noin 2 µg haluttua fragmenttiä
20 saatiin ja suspendoitiin 5 µl:aan H₂O.

5 µl Sali-BamBI:llä hajotettua plasmidia pUC8 li-
sätettiin seokseen, jossa oli 2 µl plasmidin pIT335 noin 1,4
kb:n BamHI-XhoI -restriktiofragmenttia, 3 µl 10 x ligaasi-
puskuria, 18 µl H₂O ja 2 µl T4 DNA -ligaasia. Syntynyttä
25 reaktioseosta inkuboitiin yli yön 15°C:ssa. Sali- ja XhoI-
"overlapit" (päällekkäisfragmentit) sopivat yhteen liga-
tiota varten mutta kerran ligatoituvaan ei Sali eikä XhoI
katkaise DNA:ta liitoskohdasta. Ligatoitu DNA muodosti
halutun plasmidin pIT336 ja sitä käytettiin E. colin K12
30 RR1 Δ M15 transformoimiseksi, joka on saatavissa NRRL:stä
talletusnumerolla NRRLB-15440, oleellisesti esimerkin 7A
(iv) menetelmän mukaisesti. Transformoidut solut viljel-
tiin L-agarmaljoilla, jotka sisälsivät 100 µg/ml ampicil-
liinia, 40 µg/ml X-gal ja 40 µg/ml IPTG. Pesäkkeitä, jotka
35 eivät osoittaneet sinistä väriä transformaatiomaljoilla,

viljeltiin, käytettiin plasmidi-DNA:n valmistamiseksi ja plasmidi-DNA analysoitiin restriktioentsyymianalyysillä *E. coli* K12 RR1 Δ M15/pIT336 -transformanttien identifioimiseksi. Plasmidin pIT336 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 14.

5

B. Plasmidin pPS35 konstruointi

Noin 2 μl plasmidia pIT226 liuotettiin 2 μl:aan 10 x PstI-reaktiopuskuria ja 17 μl:aan H₂O. Noin 1 μl (10 yksikköä) restriktioentsyymiä PstI lisättiin pIT336:n DNA-liuokseen ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin 2 tuntia 37°C:ssa. Reaktio lopetettiin uuttamalla fenolilla, mitä seurasi kaksi uuttoa kloroformilla. PstI:llä hajotettu plasmidin pIT336 DNA saostettiin sitten, otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 86 μl:aan H₂O:ta.

10

15

Noin 10 μl 10 x ligaasi-puskuria ja 4 μl T4 DNA-ligaasia lisättiin PstI-hajotetun plasmidin pIT336 DNA-liuokseen ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA muodosti halutun plasmidin pPS35 ja sitä käytettiin *E. coli* K12 JA221 transformoimiseksi, joka on saatavissa NRRL:stä talletusnumerolla NRRL B-15211, oleellisesti esimerkin 7A (iv) menetelmän mukaisesti. Transformoidut solut viljeltiin L-agar-maljoilla, joissa oli 100 μg/ml ampicilliinia. Useita ampicilliinille resistenttejä pesäkkeitä eristettiin ja käytettiin plasmidi DNA:n valmistukseen. Halutut *E. coli* K12 JA221/pPS35 -transformantit identifioitiin niiden plasmidi-DNA:n restriktioentsyymianalyysillä. Plasmidin pPS35 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 15.

20

25

C. Plasmidin pPS27 lopullinen konstruointi

Noin 2 μl plasmidia pPS35 liuotettiin 2 μl:aan 10 x HindIII-reaktiopuskuria ja 17 μl:aan vettä. Noin 1 μl (10 yksikköä) restriktioentsyymiä HindIII lisättiin plasmidin pPS35 DNA-liuokseen, ja syntynyttä reaktioseosta inkuboitiin kaksi tuntia 37°C:ssa. Reaktio lopetettiin uuttamalla fenolilla, mitä seurasi kaksi uuttoa kloroformilla. Hind-

35

III-hajotettu plasmidin pPS35 DNA saostettiin, otettiin talteen sentrifugoimalla ja suspendoitiin 3 µl:aan 10 x ligaasipuskuria ja 23 µl:aan H₂O.

5 Noin 2 µl plasmidin pPS29 noin 2,3 kb:n HindIII-restriktiofragmenttia, joka plasmidi valmistettiin ja eristettiin oleellisesti esimerkin 9 menetelmän mukaisesti käyttäen lähtömateriaalina plasmidia pPS29 plasmidin pPS21A sijasta, ja joka sisältää hygromysiiniresistenssin antavan geenin, jonka IPS-geenin aktivoiva sekvenssi toteuttaa, ja 2 µl T4 DNA -ligaasia lisättiin HindIII-hajotetun plasmidin pPS35 DNA-liuokseen. Syntyneitä ligaatio-reaktioseosta inkuboitiin yli yön 15°C:ssa. Ligatoitu DNA muodosti halutun plasmidin pPS27 ja sitä käytettiin E. coli K12 JA221 transformoimiseksi oleellisesti esimerkin 15 11B menetelmän mukaisesti.

Ampisilliiniresistenttejä transformantteja viljeltiin ja käytettiin plasmidi-DNA:n valmistamiseen, joka analysoitiin restriktioentsyymianalyysillä haluttujen E. coli K12 JA221/pP527 -transformanttien identifioimiseksi. 20 Vain yksi lisätyn 3,45 kb:n HindIII-restriktiofragmentin orientaatio tuottaa halutun plasmidin pPS27. Plasmidin pPS27 restriktiopaikka- ja toimintakartta on esitetty kuviossa 12.

Plasmidi pPS27 transformoi *Cephalosporium acremonium*in hygromysiiniresistentiksi fenotyyppiksi suurella 25 frekvenssillä. *C. acremonium*/pPS27 -transformantteja valmistetaan oleellisesti esimerkin 6 menetelmän mukaisesti.

Patenttivaatimukset

1. Eristetty DNA-yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on

5 a) kuviossa 1 esitetyn plasmidin pIT335 noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmentti, joka voidaan saada E. coli -bakteerin kannasta K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960), tai

10 b) DNA-sekvenssi, joka hybridisoituu edellä määritellyn DNA-yhdisteen kanssa rajoittavissa olosuhteissa ja joka koodaa isopenisilliini N -syntetaasia.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty DNA-yhdiste, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidin pIT335 noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmentti.

15 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen eristetty DNA-yhdiste, t u n n e t t u siitä, että sen koodaavan säikeen sekvenssi on

5'-ATG GGT TCC GTT CCA GTT CCA GTG GCC AAC GTC CCC CGA
 20 ATC GAT GTC TCG CCC CTA TTC GGC GAT GAC AAG GAG AAG AAG
 CTC GAG GTA GCT CGC GCC ATC GAC GCC GCA TCG CGC GAC ACA
 GGC TTC TTT TAC GCG GTG AAC CAC GGT GTC GAC CTG CCG TGG
 CTC TCG CGC GAG ACG AAC AAA TTC CAC ATG AGC ATC ACG GAC
 GAG GAG AAG TGG CAG CTC GCC ATC CGG GCC TAC AAC AAG GAG
 25 CAC GAG TCC CAG ATC CGG GCG GGC TAC TAC CTG CCG ATC CCG
 GGC AAG AAG GCG GTC GAA TCG TTC TGC TAC CTG AAC CCC TCC
 TTC AGC CCA GAC CAC CCG CGA ATC AAG GAG CCC ACC CCT ATG
 CAC GAG GTC AAC GTC TGG CCG GAC GAG GCG AAG CAC CCG GGG
 TTC CGG GCC TTC GCC GAG AAG TAC TAC TGG GAC GTC TTC GGC
 30 CTC TCC TCC GCG GTG CTG CGC GGC TAC GCT CTC GCC CTA GGT
 CGC GAC GAG GAC TTC TTC ACC CGC CAC TCC CGC CGT GAC ACG
 ACG CTC TCG TCG GTC GTG CTC ATC CGT TAC CCG TAC CTC GAC
 CCG TAC CCG GAG CCG GCC ATC AAG ACG GCC GAC GAC GGC ACC
 AAG CTC AGC TTC GAG TGG CAC GAG GAC GTG TCC CTC ATC ACG
 35 GTG TTG TAC CAG TCC GAC GTG CAG AAT CTG CAG GTC AAG ACC
 CCG CAG GGC TGG CAG GAC ATC CAG GCT GAC GAC ACG GGC TTC

CTC ATC AAC TGC GGC AGC TAC ATG GCC CAT ATC ACC GAC GAC
 TAC TAC CCG GCC CCG ATC CAC CGC GTC AAA TGG GTC AAC GAG
 GAG CGC CAG TCA CTG CCC TTC TTC GTC AAC CTG GGC TGG GAG
 5 GAC ACC ATC CAG CCG TGG GAC CCC GCG ACC GCC AAG GAT GGG
 GCC AAG GAT GCC GCC AAG GAC AAG CCG GCC ATC TCC TAC GGA
 GAG TAT CTG CAG GGG GGA CTG CCG GGC TTG ATC AAC AAG AAT
 GGT CAG ACC TAA-3'

10 jossa sekvenssissä A on deoksiadenyyli, G on deoksiguanyyli, C on deoksisytidyli ja T on tymidyli.

4. Rekombinantti-DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaisen DNA-yhdisteen.

15 5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi pIT335 (NRRL B-15960), joka on esitetty kuviossa 1.

20 7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on plasmidi pIT337, joka muodostaan liittämällä plasmidin pCZ106 (NRRL B-15959) noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI - ja noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI -restriktiofragmentit plasmidin pIT335 (NRRL B-15960) noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmenttiin, ja joka on esitetty 25 kuviossa 3.

30 8. Patenttivaatimuksen 4 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se käsittää *Saccharomyces cerevisiae* -hiivan fosfoglyseraattikinaasin geenin transkriptio-naalisen ja translaationaalisen aktivoivan sekvenssin valmiudessa hygromysiiniresistenssin antavaa geeniä koodaavan DNA-sekvenssin ekspressiota varten.

35 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen vektori, t u n n e t t u siitä, että se on kuviossa 5 esitetty plasmidi pPS20, joka muodostetaan insertoimalla plasmidin pIT221 noin 2,7 kb:n HindIII-restriktiofragmentti, joka käsittää

Saccharomyces cerevisiae -hiivan transkriptionaalisen ja translaationaalisen aktivoivan sekvenssin, edellä patenttivaatimuksessa 2 määritellyn plasmidin pIT335 ainoaan HindIII-restriktioentsyymin tunnustuskohtaan, tai sen

5 funktionaalisesti ekvivalentti isomeeri, plasmidi pPS20,1.

10. Menetelmä isopenisilliini N -syntetaasiaktiivisuuden tuottamiseksi isäntäsolussa, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheet, joissa:

(1) transformoidaan bakteeri- tai homesieni-isäntä rekombinantti-DNA-ekspressiovektorilla, joka käsittää patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaista DNA-yhdistettä, joka on varustettu ekspressiota varten transkriptionaalisella ja translaationaalisella aktivoivalla sekvenssillä, joka on toiminnallinen mainitussa isäntäsolussa, ja

15 (2) viljellään vaiheessa (1) transformoitua isäntäsolua olosuhteissa, jotka mahdollistavat mainitun DNA:n ekspression.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-yhdiste on kuviossa 1 esitetyn plasmidin pIT335 noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI -restriktiofragmentti, joka voidaan saada E. coli -bakteerin kannasta K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960).

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-yhdiste koodaa aminohapposekvenssiä:

MET GLY SER VAL PRO VAL PRO VAL ALA ASN VAL PRO ARG ILE
 ASP VAL SER PRO LEU PHE GLY ASP ASP LYS GLU LYS LYS LEU
 GLU VAL ALA ARG ALA ILE ASP ALA ALA SER ARG ASP TER GLY
 30 PHE PHE TYR ALA VAL ASN HIS GLY VAL ASP LEU PRO TRP LEU
 SER ARG GLU THR ASN LYS PHE HIS MET SER ILE TER ASP GLU
 GLU LYS TRP GLN LEU ALA ILE ARG ALA TYR ASN LYS GLU HIS
 GLU SER GLN ILE ARG ALA GLY TYR TYR LEU PRO ILE PRO GLY
 LYS LYS ALA VAL GLU SER PHE CYS TYR LEU ASN PRO SER PHE
 35 SER PRO ASP HIS PRO ARG ILE LYS GLU PRO THR PRO MET HIS

5 GLU VAL ASN VAL TRP PRO ASP GLU ALA LYS HIS PRO GLY PHE
 ARG ALA PHE ALA GLU LYS TYR TYR TRP ASP VAL PHE GLY LEU
 10 SER SER ALA VAL LEU ARG GLY TYR ALA LEU ALA LEU GLY ARG
 ASP GLU ASP PHE PHE THR ARG HIS SER ARG ARG ASP THR THR
 LEU SER SER VAL VAL LEU ILE ARG TYR PRO TYR LEU ASP PRO
 TYR PRO GLU PRO ALA ILE LYS THR ALA ASP ASP GLY THR LYS
 LEU SER PHE GLU TRP HIS GLU ASP VAL SER LEU ILE THR VAL
 15 LEU TYR GLN SER ASP VAL GLN ASN LEU GLN VAL LYS THR PRO
 GLN GLY TRP GLN ASP ILE GLN ALA ASP ASP THR GLY PHE LEU
 ILE ASN CYS GLY SER TYR MET ALA HIS ILE THR ASP ASP TYR
 TYR PRO ALA PRO ILE HIS ARG VAL LYS TRP VAL ASN GLU GLU
 ARG GLN SER LEU PRO PHE PHE VAL ASN LEU GLY TRP GLU ASP
 20 THR ILE GLN PRO TRP ASP PRO ALA THR ALA LYS ASP GLY ALA
 LYS ASP ALA ALA LYS ASP LYS PRO ALA ILE SER TYR GLY GLU
 TYR LEU GLN GLY GLY LEU ARG GLY LEU ILE ASN LYS ASN GLY
 GLN THR

20 jossa sekvenssissä ALA on alaniinitähde, ARG on arginiini-
 nitähde, ASN on asparagiinitähde, ASP on asparagiinihap-
 potähde, CYS on kysteiinitähde, GLN on glutamiinitähde,
 25 GLU on glutamiinihappotähde, GLY on glysiinitähde, HIS on
 histidiinitähde, ILE on isoleusiinitähde, LEU on leusiini-
 tähde, LYS on lysiinitähde, MET on metioniinitähde, PHE on
 fenyylialaniinitähde, PRO on proliinitähde, SER on serii-
 nitähde, THR on treoniinitähde, TRP on tryptofaanitähde,
 TYR on tyrosiinitähde ja VAL on valiinitähde.

30 13. Patenttivaatimuksen 10, 11 tai 12 mukainen me-
 netelmä, t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu kuuluu
 sukuihin Cephalosporium tai E. coli.

 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä,
 t u n n e t t u siitä, että isäntäsolu on Cephalosporium
 acremonium tai E. coli.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 10 - 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljelty isäntäsolu on E. coli/pIT337, joka saadaan transformoimalla E. coli plasmidilla pIT337, joka saadaan eristämällä plasmidi pCZ106 E. coli -bakteerikannasta K12 RV308/pCZ106 (NRRL B-15959), hajottamalla ja eristämällä noin 8,7 kb:n NcoI-NcoI - ja noin 1,6 kb:n NcoI-BamHI -fragmentit ja ligatoimalla nämä fragmentit plasmidin pIT335:n noin 1,5 kb:n NcoI-BamHI-restriktiofragmentti, joka voidaan saada E. coli -bakteerin kannasta K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960).

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 10 - 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljelty isäntäsolu on Cephalosporium acremonium/pPS20, joka saadaan transformoimalla Cephalosporium acremonium kuviossa 5 esitetyllä plasmidilla pPS20.

17. Bakteeri tai homesieni, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu minkä tahansa patenttivaatimuksen 4 - 9 mukaisella rekombinantti-DNA-vektorilla.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on E. coli K12/pIT335 (NRRL B-15960).

20. Patenttivaatimuksen 17 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on Cephalosporium acremonium.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se on Cephalosporium acremonium/pPS21, joka saadaan transformoimalla Cephalosporium acremonium kuviossa 7 esitetyllä plasmidilla pPS21.

Patentkrav

1. Isolerad DNA-förening, k ä n n e t e c k n a d
därav, att den är

5 a) ett 1,5 kb:s NcoI-BamHI -restriktionsfragment
från plasmiden pIT335 som presenteras i figur 1, vilket
fragment kan fås från E. coli -bakteriestammen K12 JA221/-
pIT335 fragment (NRRL B-15960), eller

10 b) en DNA-sekvens som hybridiseras med den ovan
definierade DNA-föreningen under begränsande förhållanden
och som kodar för isopenicillin N -syntetas.

2. Isolerad DNA-förening enligt patentkrav 1,
k ä n n e t e c k n a d därav, att den är det 1,5 kb:s
NcoI-BamHI -restriktionsfragmentet från plasmiden pIT335.

15 3. Isolerad DNA-förening enligt patentkrav 1,
k ä n n e t e c k n a d därav, att den kodande strängens
sekvens är

5'-ATG GGT TCC GTT CCA GTT CCA GTG GCC AAC GTC CCC CGA
20 ATC GAT GTC TCG CCC CTA TTC GGC GAT GAC AAG GAG AAG AAG
CTC GAG GTA GCT CGC GCC ATC GAC GCC GCA TCG CGC GAC ACA
GGC TTC TTT TAC GCG GTG AAC CAC GGT GTC GAC CTG CCG TGG
CTC TCG CGC GAG ACG AAC AAA TTC CAC ATG AGC ATC ACG GAC
GAG GAG AAG TGG CAG CTC GCC ATC CGG GCC TAC AAC AAG GAG
CAC GAG TCC CAG ATC CGG GCG GGC TAC TAC CTG CCG ATC CCG
25 GGC AAG AAG GCG GTC GAA TCG TTC TGC TAC CTG AAC CCC TCC
TTC AGC CCA GAC CAC CCG CGA ATC AAG GAG CCC ACC CCT ATG
CAC GAG GTC AAC GTC TGG CCG GAC GAG GCG AAG CAC CCG GGG
TTC CGG GCC TTC GCC GAG AAG TAC TAC TGG GAC GTC TTC GGC
CTC TCC TCC GCG GTG CTG CGC GGC TAC GCT CTC GCC CTA GGT
30 CGC GAC GAG GAC TTC TTC ACC CGC CAC TCC CGC CGT GAC ACG
ACG CTC TCG TCG GTC GTG CTC ATC CGT TAC CCG TAC CTC GAC
CCG TAC CCG GAG CCG GCC ATC AAG ACG GCC GAC GAC GGC ACC
AAG CTC AGC TTC GAG TGG CAC GAG GAC GTG TCC CTC ATC ACG
GTG TTG TAC CAG TCC GAC GTG CAG AAT CTG CAG GTC AAG ACC
35 CCG CAG GGC TGG CAG GAC ATC CAG GCT GAC GAC ACG GGC TTC

CTC ATC AAC TGC GGC AGC TAC ATG GCC CAT ATC ACC GAC GAC
 TAC TAC CCG GCC CCG ATC CAC CGC GTC AAA TGG GTC AAC GAG
 GAG CGC CAG TCA CTG CCC TTC TTC GTC AAC CTG GGC TGG GAG
 GAC ACC ATC CAG CCG TGG GAC CCC GCG ACC GCC AAG GAT GGG
 5 GGC AAG GAT GCC GCC AAG GAC AAG CCG GCC ATC TCC TAC GGA
 GAG TAT CTG CAG GGG GGA CTG CGG GGC TTG ATC AAC AAG AAT
 GGT CAG ACC TAA-3'

10 i vilken sekvens A är deoxiadenyl, G är deoxiguanyl, C är
 deoxicytidyl och T är tymidyl.

4. Rekombinant-DNA-vektor, k ä n n e t e c k n a d
 därav, att den omfattar en DNA-förening enligt patentkrav
 1, 2 eller 3.

15 5. Vektor enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k -
 n a d därav, att den är en plasmid.

6. Vektor enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k -
 n a d därav, att den är plasmiden pIT335 (NRRL B-15960),
 vilken presenteras i figur 1.

20 7. Vektor enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k -
 n a d därav, att den är plasmiden pIT337, vilken bildas
 genom att förena ett ca 1,6 kb:s NcoI-BamHI- och ett ca
 8,7 kb:s NcoI-NcoI -restriktionsfragment från plasmiden
 pCZ106 (NRRL B-15959) med ett ca 1,5 kb:s NcoI-BamHI
 25 -restriktionsfragment från plasmiden pIT335 (NRRL B-
 15960), och vilken presenteras i figur 3.

8. Vektor enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k -
 n a d därav, att den omfattar jästens *Saccharomyces cere-*
visiae fosfoglyceratkinasgens transkriptions- och transla-
 tionsaktiverande sekvens i beredskap för expression av
 30 DNA-sekvensen som kodar för en gen som medför hygromycin-
 resistens.

9. Vektor enligt patentkrav 8, k ä n n e t e c k -
 n a d därav, att den är den i figur 5 presenterade plas-
 miden pPS20, vilken bildas genom att insertera ett ca 2,7
 35 kb:s HindIII-restriktionsfragment från plasmiden pIT221,

vilket innehåller jästens *Saccharomyces cerevisiae* transkriptions- och translationsaktiverande sekvens, till det enda igenkänningsstället för HindIII-restriktionsenzymet i plasmiden pIT335, som definieras i patentkrav 2, eller
 5 dess funktionellt ekvivalenta isomer, plasmiden pP20,1.

10. Förfarande för produktion av isopenicillin N - syntetasaktivitet i en värdcell, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar steg, i vilka:

(1) en bakterie- eller jästsvampvärd transformeras med en rekombinant-DNA-expressionsvektor, som omfattar en DNA-förening enligt patentkrav 1, 2 eller 3, vilken är försedd med en transkriptions- och translationsaktiverande sekvens, som är funktionell i nämnda värdcell, och

(2) den i steg (1) transformerade värdcellen odlas i förhållanden, som möjliggör expression av nämnda DNA.
 15

11. Förfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att DNA-föreningen är det 1,5 kb:s NcoI-BamHI -restriktionsfragmentet från den i figur 1 presenterade plasmiden pIT335, som kan fås från *E. coli* -bakteriestammen K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960).
 20

12. Förfarande enligt patentkrav 10 eller 11, k ä n n e t e c k n a t därav, att DNA-föreningen kodar för aminosyrasekvensen:

25

MET GLY SER VAL PRO VAL PRO VAL ALA ASN VAL PRO ARG ILE
 ASP VAL SER PRO LEU PHE GLY ASP ASP LYS GLU LYS LYS LEU
 GLU VAL ALA ARG ALA ILE ASP ALA ALA SER ARG ASP THR GLY
 PHE PHE TYR ALA VAL ASN HIS GLY VAL ASP LEU PRO TRP LEU
 30 SER ARG GLU THR ASN LYS PHE HIS MET SER ILE THR ASP GLU
 GLU LYS TRP GLN LEU ALA ILE ARG ALA TYR ASN LYS GLU HIS
 GLU SER GLN ILE ARG ALA GLY TYR TYR LEU PRO ILE PRO GLY
 LYS LYS ALA VAL GLU SER PHE CYS TYR LEU ASN PRO SER PHE
 SER PRO ASP HIS PRO ARG ILE LYS GLU PRO THR PRO MET HIS
 35

5 GLU VAL ASN VAL TRP PRO ASP GLU ALA LYS HIS PRO GLY PHE
 ARG ALA PHE ALA GLU LYS TYR TYR TRP ASP VAL PHE GLY LEU
 SER SER ALA VAL LEU ARG GLY TYR ALA LEU ALA LEU GLY ARG
 ASP GLU ASP PHE PHE THR ARG HIS SER ARG ARG ASP THR THR
 LEU SER SER VAL VAL LEU ILE ARG TYR PRO TYR LEU ASP PRO
 TYR PRO GLU PRO ALA ILE LYS THR ALA ASP ASP GLY THR LYS
 LEU SER PHE GLU TRP HIS GLU ASP VAL SER LEU ILE THR VAL
 LEU TYR GLN SER ASP VAL GLN ASN LEU GLN VAL LYS THR PRO
 10 GLN GLY TRP GLN ASP ILE GLN ALA ASP ASP THR GLY PHE LEU
 ILE ASN CYS GLY SER TYR MET ALA HIS ILE THR ASP ASP TYR
 TYR PRO ALA PRO ILE HIS ARG VAL LYS TRP VAL ASN GLU GLU
 ARG GLN SER LEU PRO PHE PHE VAL ASN LEU GLY TRP GLU ASP
 THR ILE GLN PRO TRP ASP PRO ALA THR ALA LYS ASP GLY ALA
 LYS ASP ALA ALA LYS ASP LYS PRO ALA ILE SER TYR GLY GLU
 15 TYR LEU GLN GLY GLY LEU ARG GLY LEU ILE ASN LYS ASN GLY
 GLN THR

i vilken sekvens ALA är en alaningrupp, ARG är en arginin-
 grupp, ASN är en asparagingrupp, ASP är en asparaginsyra-
 grupp, CYS är en kysteingrupp, GLN är en glutamingrupp,
 20 GLU är en glutaminsyragrupp, GLY är en glycingrupp, HIS är
 en histidingrupp, ILE är en isoleucingrupp, LEU är en leu-
 cingrupp, LYS är en lysingrupp, MET är en metioningrupp,
 PHE är en fenylalaningrupp, PRO är en prolingrupp, SER är
 en seringrupp, THR är en treoningrupp, TRP är en trypto-
 25 fangrupp, TYR är en tyrosingrupp och VAL är en valingrupp.

13. Förfarande enligt patentkrav 10, 11 eller 12,
 k ä n n e t e c k n a t därav, att värdcellen hör till
 släktena *Cephalosporium* eller *E. coli*.

14. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e -
 30 t e c k n a t därav, att värdcellen är *Cephalosporium*
acremonium eller *E. coli*.

15. Förfarande enligt något av patentkraven 10 -
 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att den odlade värd-
 cellen är *E. coli*/pIT337, som fås genom att transformera
 35 *E. coli* med plasmiden pIT337, vilken fås genom att isolera

plasmiden pcZ106 från E. coli -bakteriestammen K12 RV308/-pCZ106 (NRRL B-15959), sönderdela och isolera ett ca 1,6 kb:s NcoI-BamHI - och ett ca 8,7 kb:s NcoI-NcoI -restriktionsfragment och ligatera dessa fragment med ett ca 1,5 kb:s NcoI-BamHI -restriktionsfragment från plasmiden pIT335, som kan fås från E. coli -bakteriestammen K12 JA221/pIT335 (NRRL B-15960).

16. Förfarande enligt något av patentkraven 10 - 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att den odlade värdcellen är Cephalosporium acremonium/pPS20, som fås genom att transformera Cephalosporium acremonium med den i figur 5 presenterade plasmiden pPS20.

17. Bakterie eller jästsvamp, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är transformerad med en rekombinant-DNA-vektor enligt något av patentkraven 4 - 9.

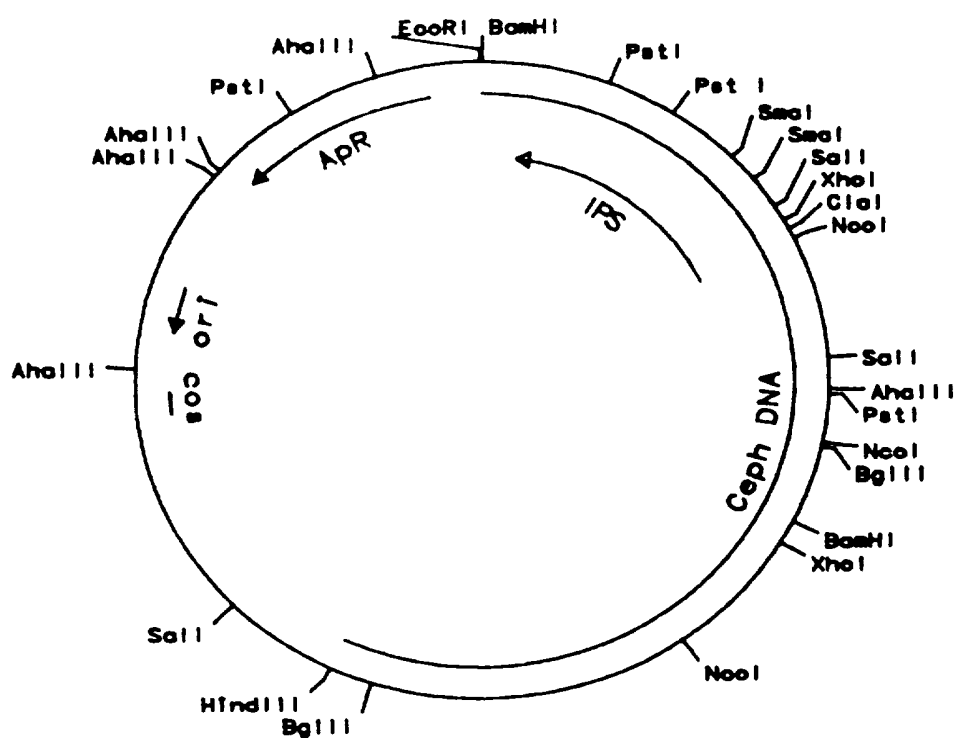
18. Värdcell enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är E. coli.

19. Värdcell enligt patentkrav 18, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är E. coli K12/pIT335 (NRRL B-15960).

20. Värdcell enligt patentkrav 17, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är Cephalosporium acremonium.

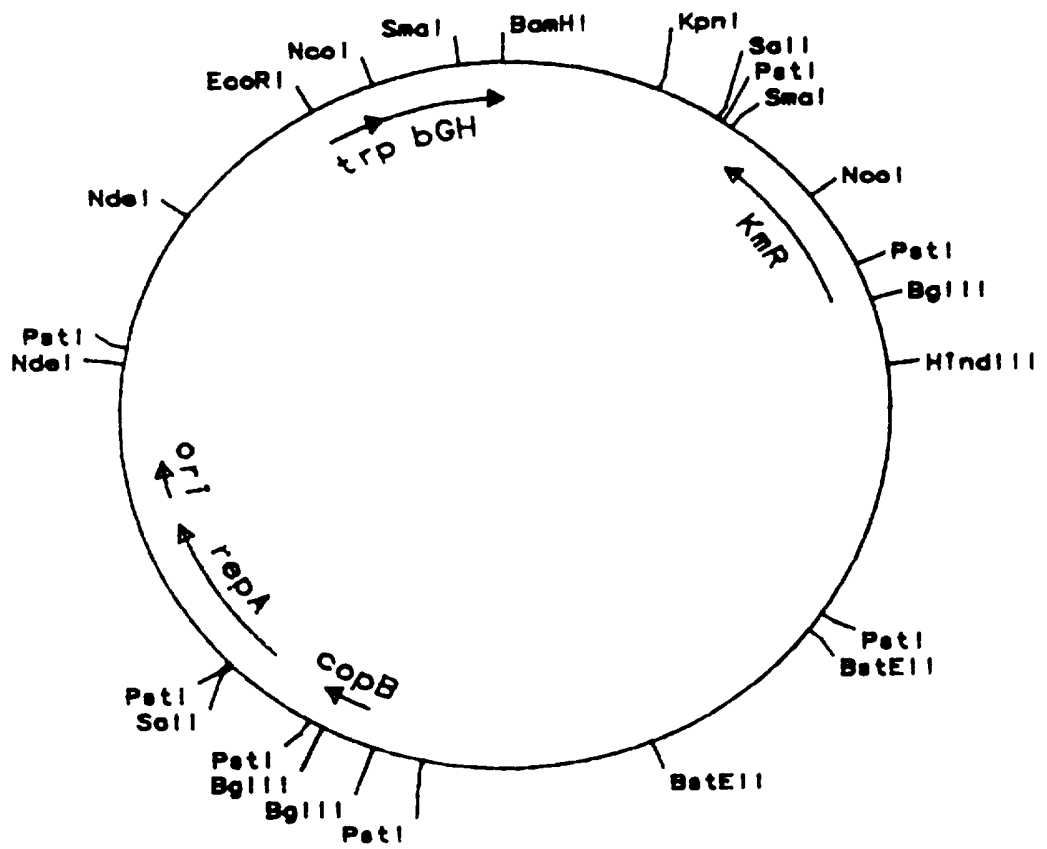
21. Värdcell enligt patentkrav 20, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är Cephalosporium acremonium/pPS21, vilken fås genom att transformera Cephalosporium acremonium med den i figur 7 presenterade plasmiden pPS21.

FIG. I



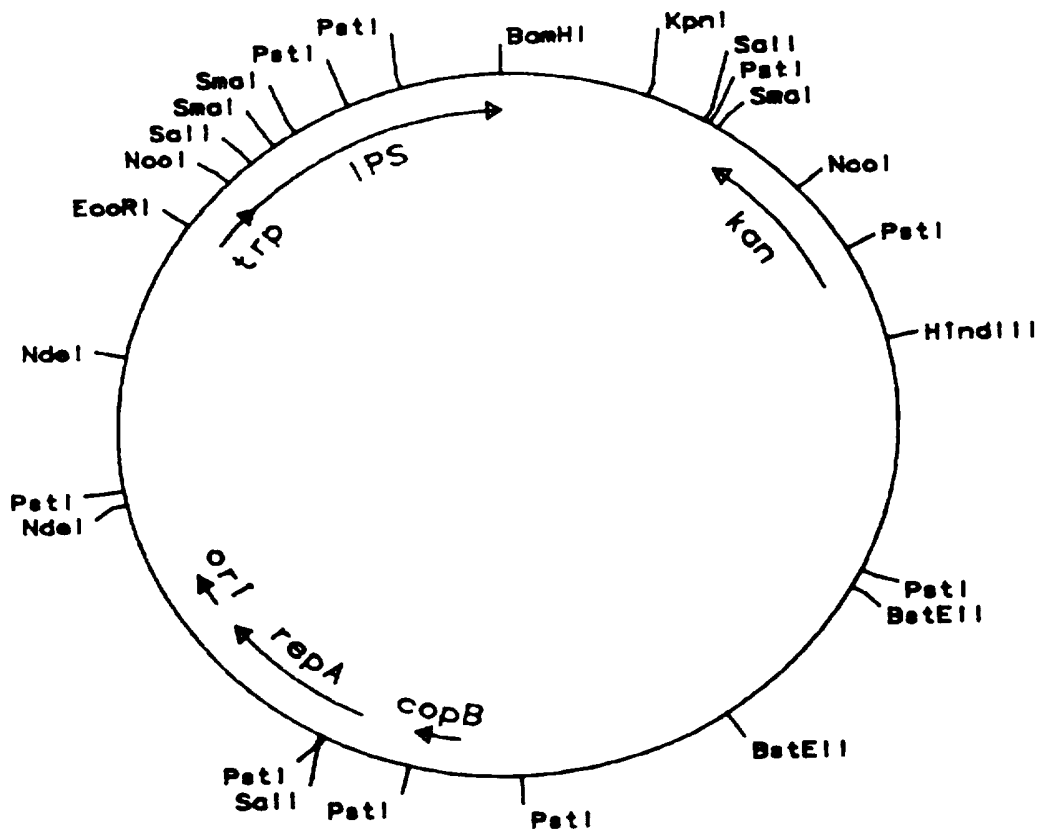
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pIT335
(8,24 kb)

FIG.2



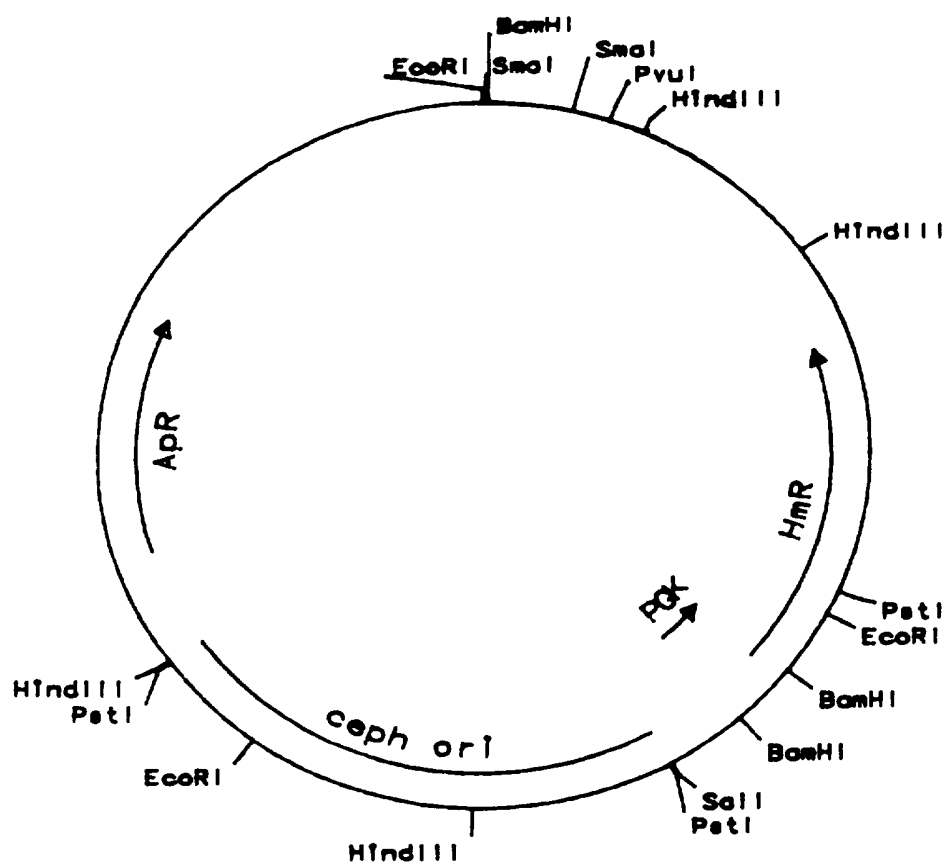
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pCZ106
(10,8 kb)

FIG.3



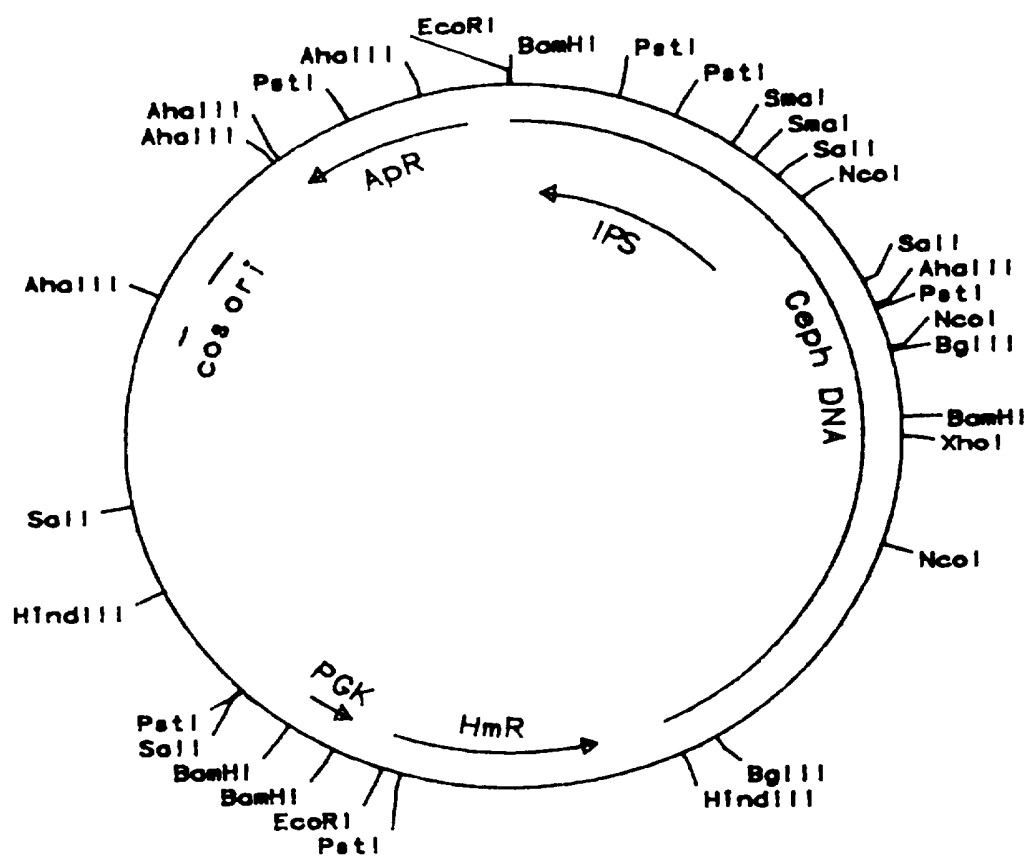
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pIT337
(11,8 kb)

FIG. 4



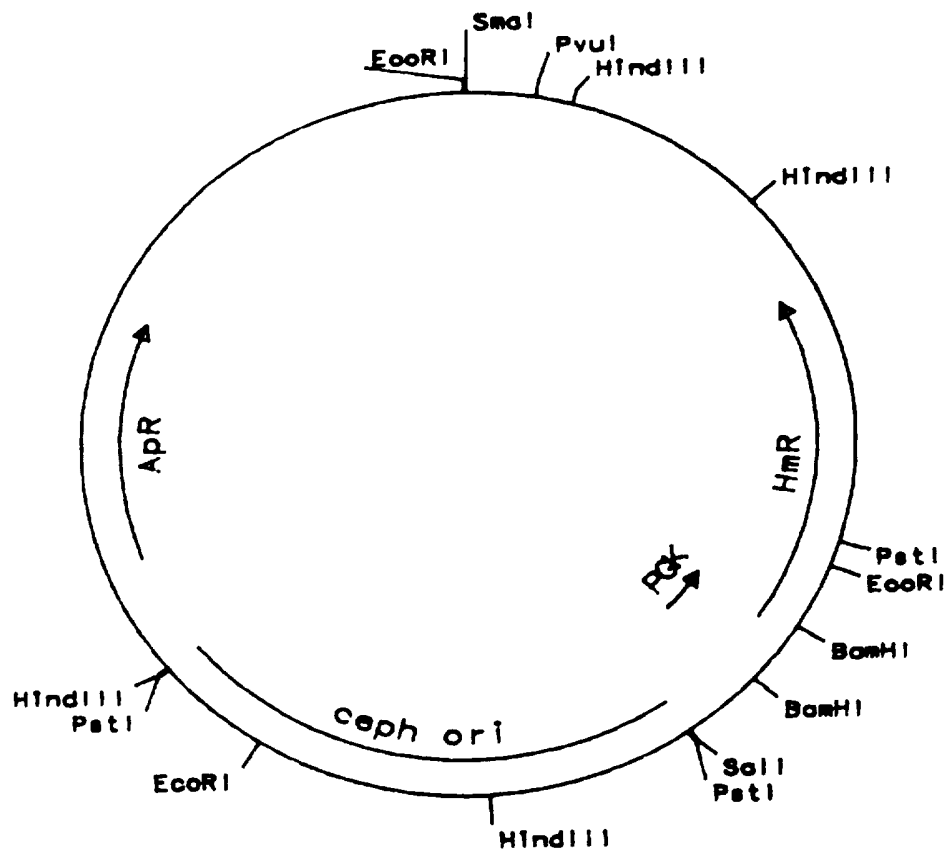
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pIT221
(8,04 kb)

FIG. 5



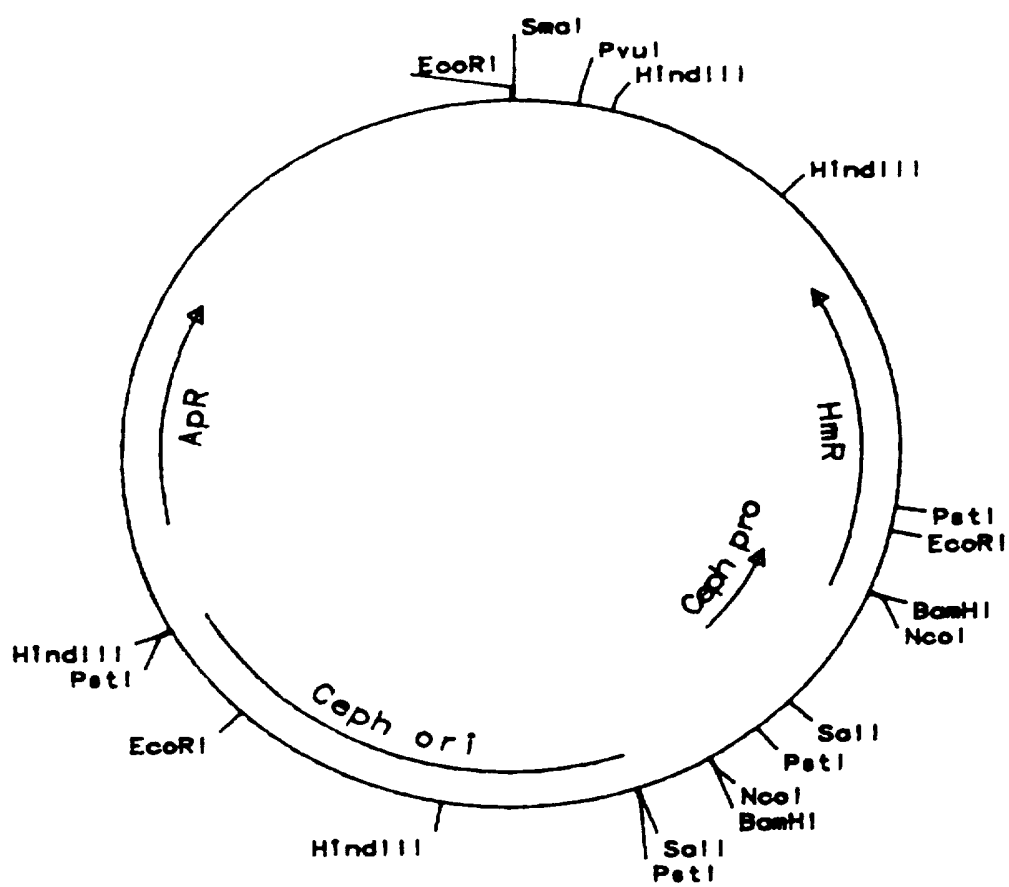
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS20
(11 kb)

FIG. 6



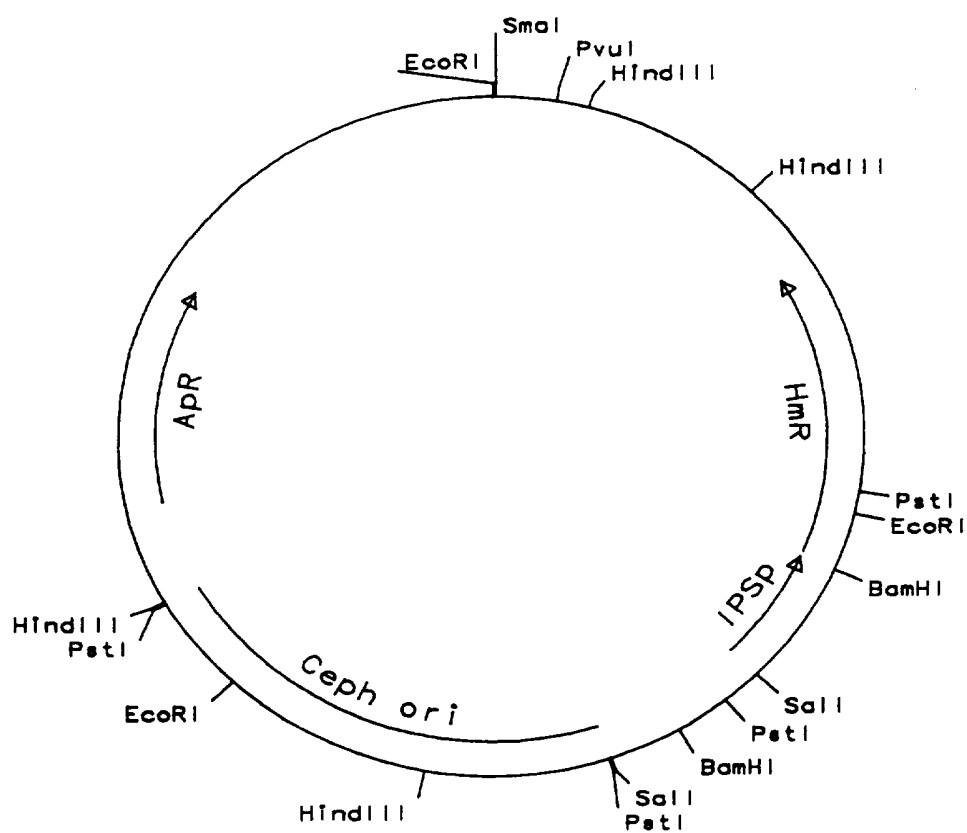
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS19
(7,85 kb)

FIG.7



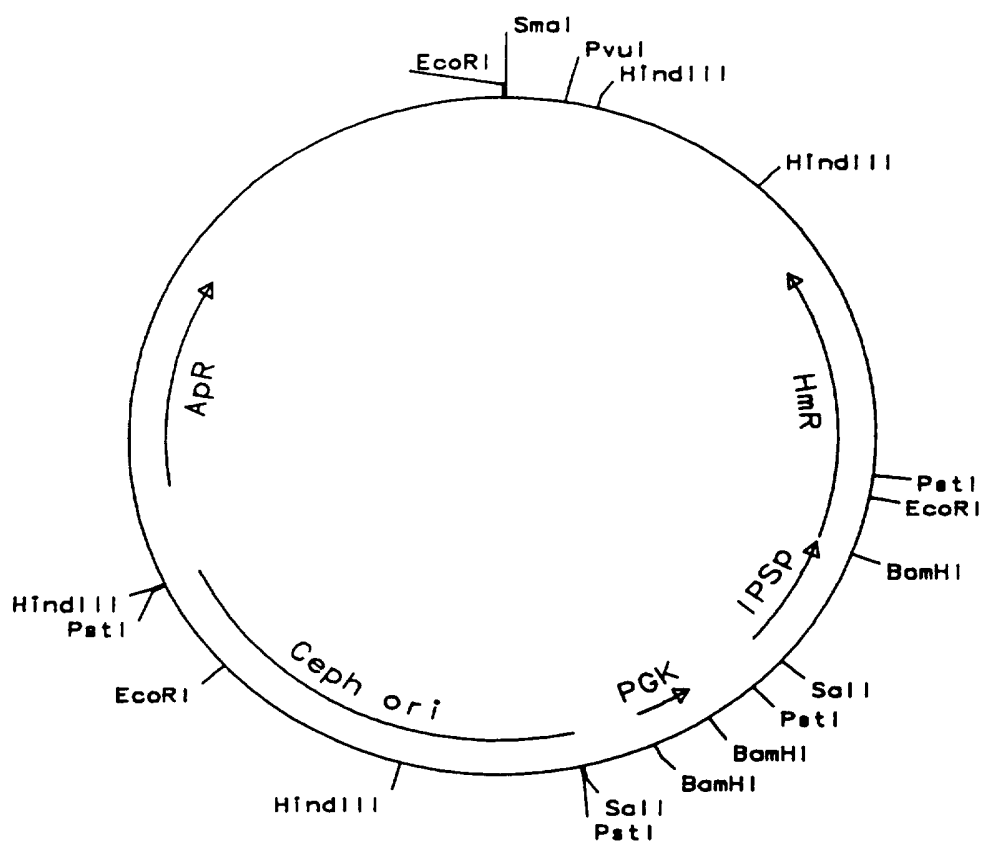
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS21
(8,5 kb)

FIG. 8



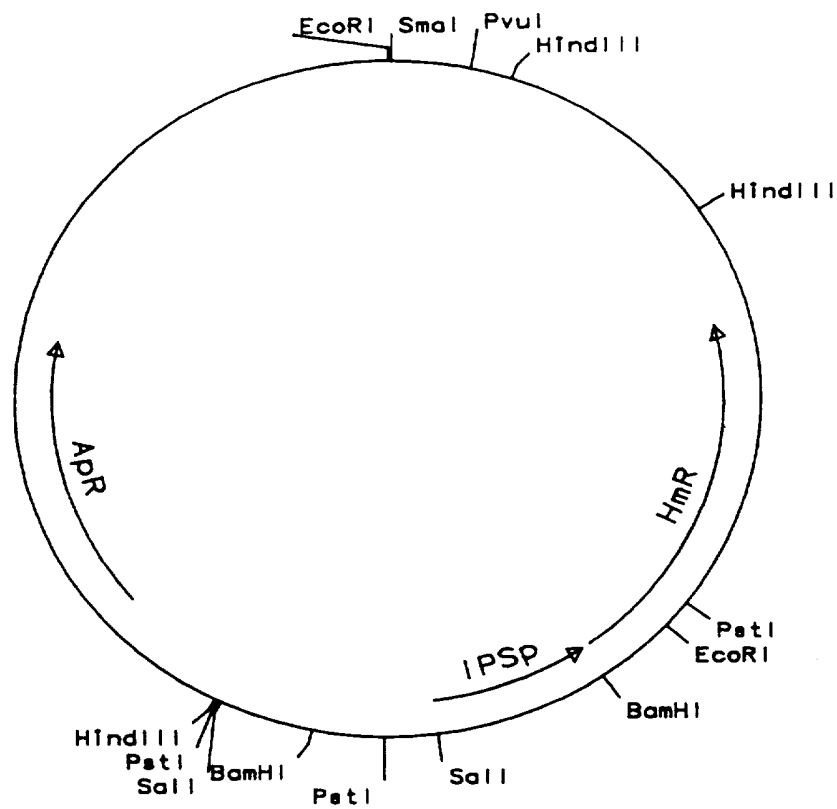
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS21A
(8,5 kb)

FIG. 9



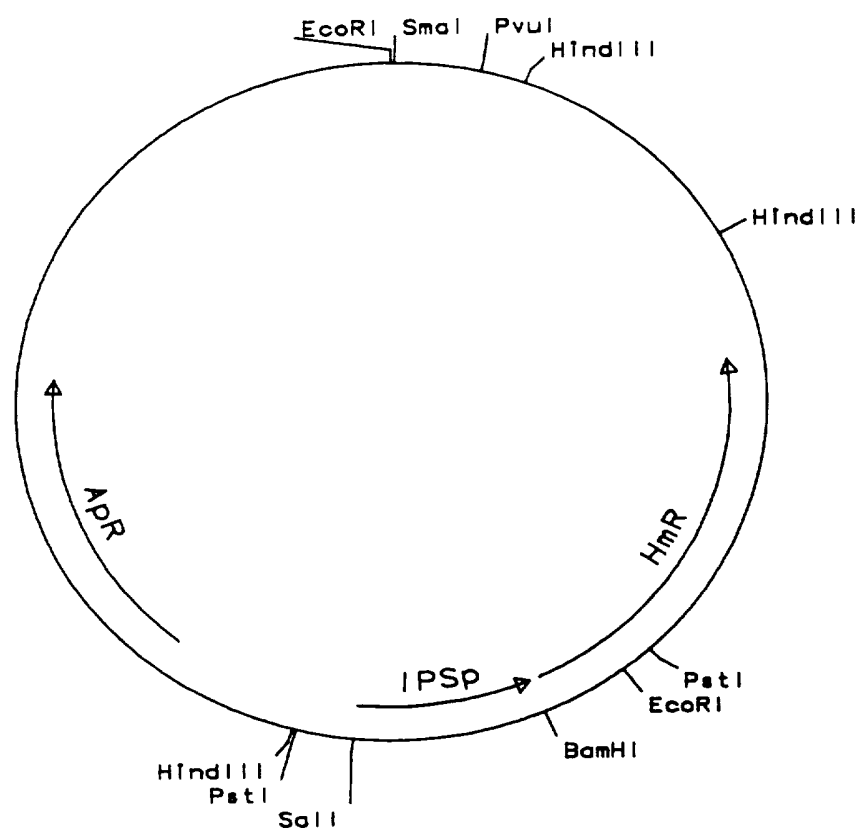
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS25
(8,71 kb)

FIG. 10



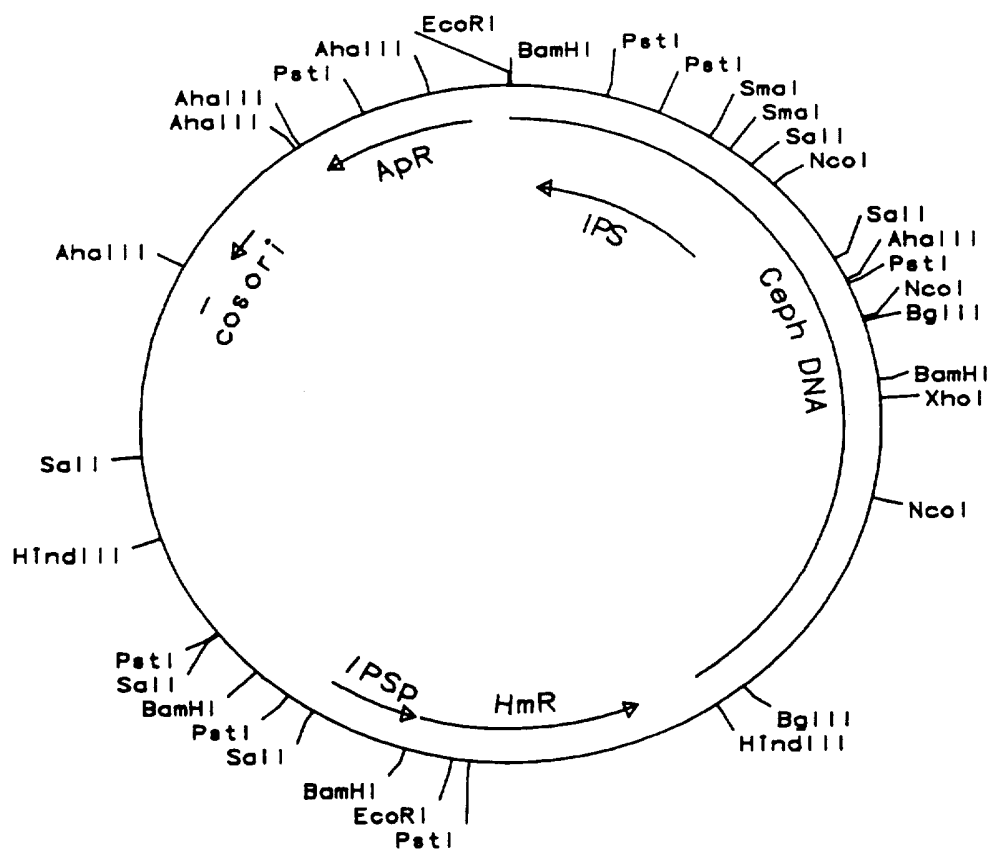
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS28
(6,6 kb)

FIG. II



Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS29
(6,1 kb)

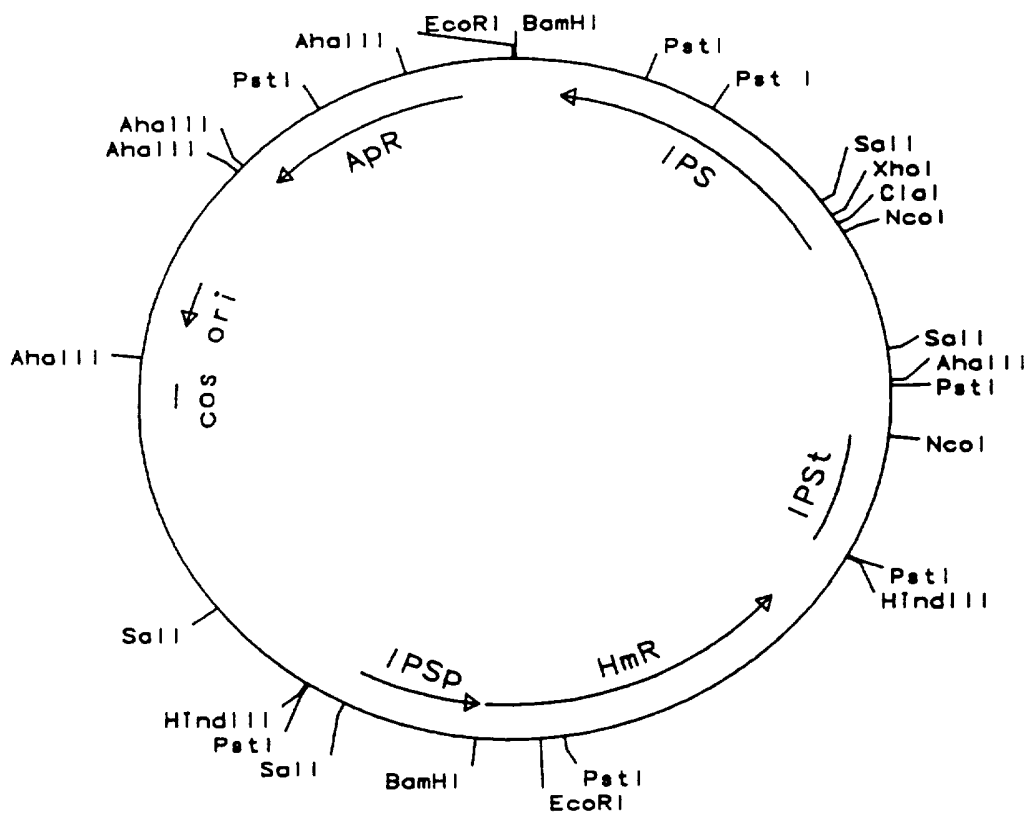
FIG. 12



Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS26

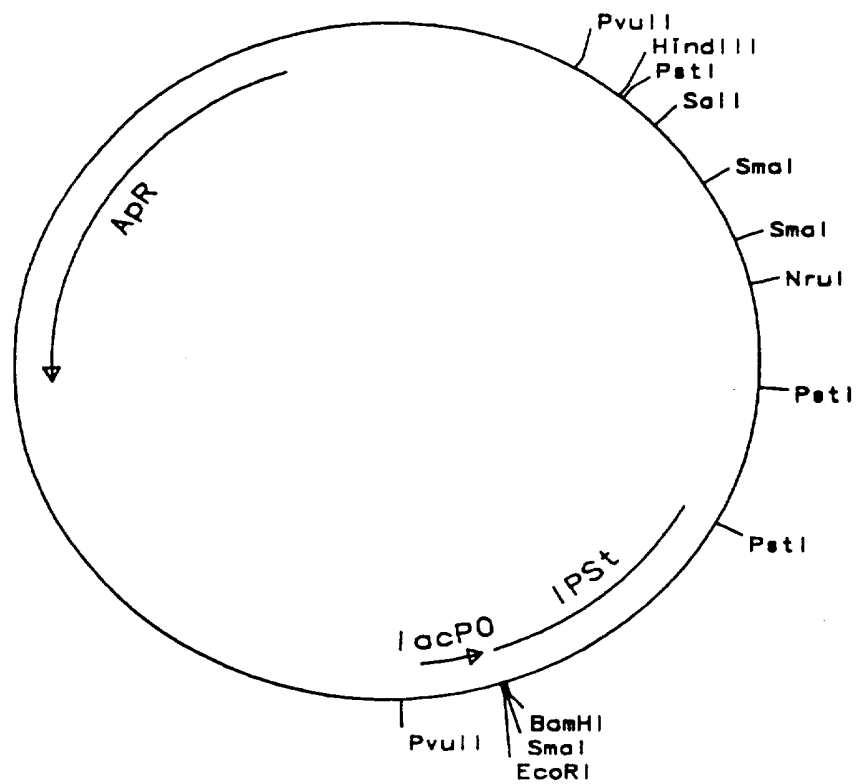
(11,6 kb)

FIG.13



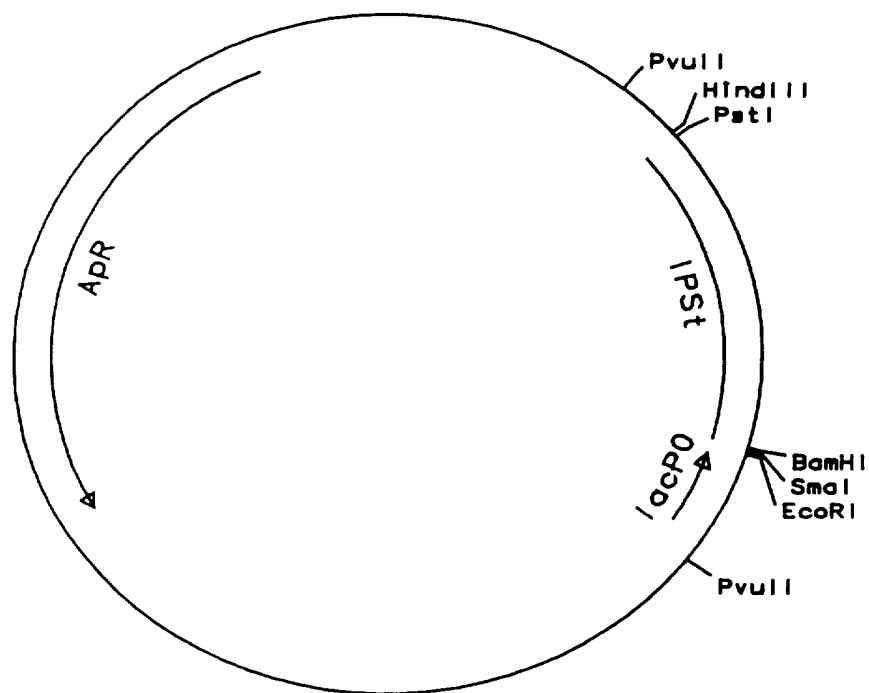
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS34
(8,7 kb)

FIG.14



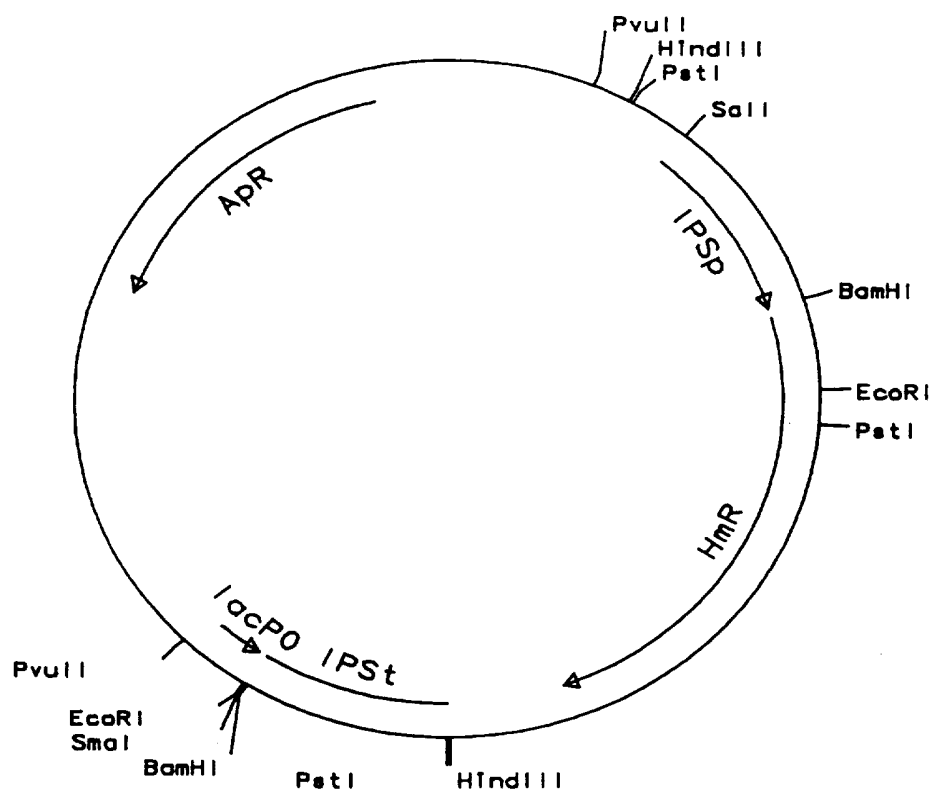
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pIT336
(4,1 kb)

FIG. 15



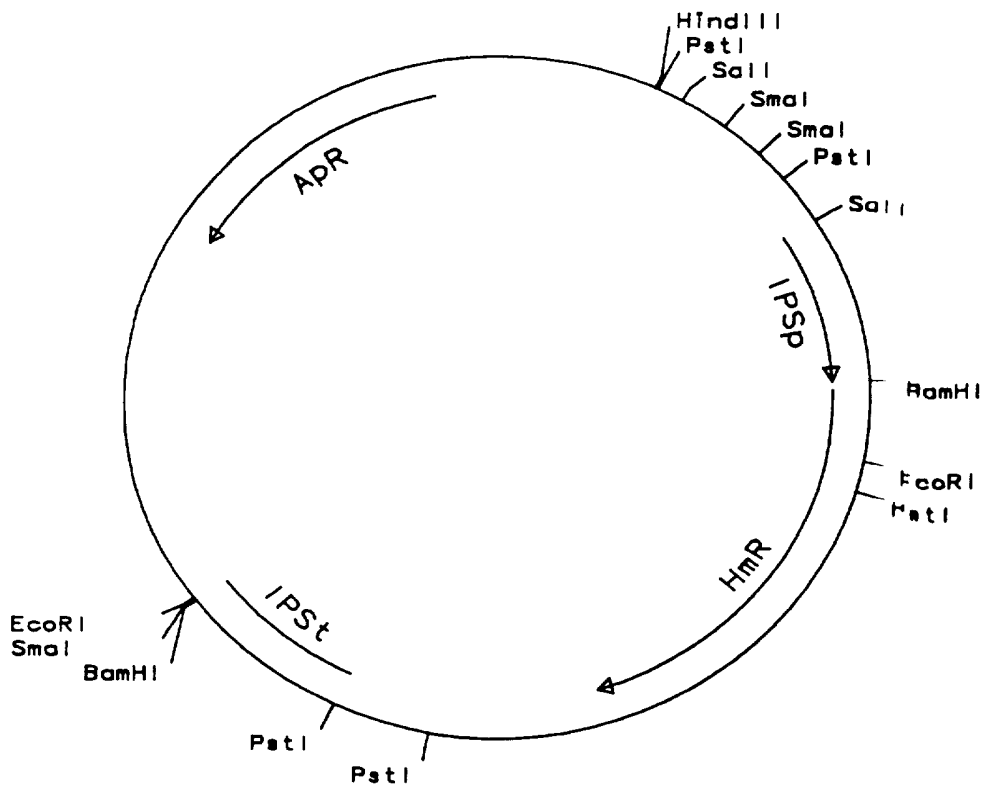
Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS35
(4,1 kb)

FIG.16



Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pPS27
(5,5 kb)

FIG.17



Restriktiopaikka ja toimintakartta plasmidi pBR37
(6,4 kb)

