

---

Octrooiraad



12 A Terinzagelegging 11 8502061

Nederland

19 NL

---

54 **Nieuwe vectorplasmiden, hun constructie en toepassing, en micro-organismen waarin ze zijn opgenomen.**

51 Int.Cl<sup>4</sup>.: C12N 15/00.

71 Aanvrager: Stichting Katholieke Universiteit te Nijmegen.

74 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.  
Vereenigde Octroobureaux  
Nieuwe Parklaan 107  
2587 BP 's-Gravenhage.

---

21 Aanvraag Nr. 8502061.

22 Ingediend 17 juli 1985.

32 --

33 --

31 --

62 --

---

43 Ter inzage gelegd 16 februari 1987.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

Titel: Nieuwe vectorplasmiden, hun constructie en toepassing, en micro-organismen waarin ze zijn opgenomen.

De uitvinding heeft betrekking op nieuwe vectorplasmiden ten behoeve van recombinant DNA technieken, alsmede op een werkwijze voor de constructie van deze plasmiden en op de toepassing ervan, en op micro-organismen, in het bijzonder E. coli, waarin ze zijn opgenomen.

Gedurende de laatste jaren is een groot aantal recombinant DNA moleculen geconstrueerd, waarin verscheidene unieke biologische functies gecombineerd zijn tot aantrekkelijke hulpmiddelen voor het kloneren en manipuleren van DNA. (Old & Primose, 1982). Deze vectoren worden in het algemeen gekenmerkt door de aanwezigheid van een genetische determinant waarvan het fenotype veranderd wordt door inactivering als gevolg van een insertie. Daarnaast bezitten deze vectoren een aantal unieke knipplaatsen voor restrictie-enzymen, waardoor het mogelijk is om een grote verscheidenheid van restrictiefragmenten direct te kloneren.

Recentelijk zijn er kloneringsvehikels geconstrueerd die een directe identificatie van recombinantklonen mogelijk maken zonder de noodzaak van "replicaplating". De meest veelzijdige van deze vectoren zijn de filamenteuze faag vectoren en de pUC-plasmiden die gebruik maken van de complementatie van de lacZ mutatie van geschikte gastheerstammen (Vieira & Messing, 1982; Messing 1983). Dente et al. (1983) hebben de constructie beschreven van een familie van kloneringsvectoren, waarin de eigenschappen van de pUC-plasmiden en de M13mp-fagen gecombineerd worden. Door een fragment met de functionele replicatieoorsprong en het morfogenetisch signaal van de Ff-faag fl in de pUC plasmiden

te kloneren werden nieuwe vectorplasmiden (pEMBL-plasmiden) verkregen. In afwezigheid van helperfagen is de replicatie van deze plasmiden afhankelijk van de ColE1-oorsprong. Bij infectie van cellen die  
5 deze plasmiden bevatten met de faag IRI (een afgeleide van fl) gaan de plasmiden over tot de Ff-replicatiemodus, hetgeen leidt tot het selectief verpakken van één streng (de F-streng) in faagachtige deeltjes.

Hoewel de M13mp-fagen en de pEMBL-plasmiden  
10 bijzonder geschikt zijn voor de bereiding van grote hoeveelheden enkelstrengs DNA dat bijvoorbeeld voor DNA-sequentieanalyse gebruikt kan worden, hebben zij één groot nadeel. Met behulp van deze vectoren kan slechts één van de DNA-strengen verpakt worden, namelijk  
15 de streng waarop de viraal-streng replicatieoorsprong is gelegen. Aangezien het in het algemeen noodzakelijk is om van beide strengen van een DNA-fragment de nucleotidensequentie te bepalen, moet het bewuste fragment daarom in beide oriëntaties in de vector gekloneerd  
20 worden. Dikwijls wordt de sequentie van een betrekkelijk groot DNA-molecuul bepaald door middel van "shotgun" klonering van willekeurig gegenereerde fragmenten (Sanger et al., 1980; Messing et al., 1981; Peeters et al., 1985). In dit geval is voor opheldering van  
25 de DNA-sequentie van beide strengen de aanwezigheid in de klonenbibliotheek vereist van klonen die overlappende fragmenten bevatten in omgekeerde oriëntatie. Als hieraan niet voldaan is moet het bewuste fragment uit het recombinant plasmide geïsoleerd worden en  
30 in omgekeerde oriëntatie opnieuw gekloneerd worden. Als alternatief kan de nucleotidensequentie bepaald worden via sequentieanalyse met behulp van dubbelstrengs DNA, direct of na een behandeling met exonuclease III (Wallace et al., 1981; Guo & Hu, 1982). Het is  
35 duidelijk, dat beide methoden de isolatie en zuivering van intracellulair plasmide DNA vereisen, hetgeen

8502061

een nogal tijdrovend proces is, met name wanneer hierbij een groot aantal klonen betrokken is. Bovendien zijn de resultaten van de sequentieanalyse met behulp van dubbelstrengs DNA gewoonlijk niet zo goed als met  
5 behulp van een enkelstrengs DNA matrijs (Deininger, 1983).

De uitvinding verschaft nu een nieuw vectorplasmide, dat deze nadelen opheft doordat het opgebouwd is uit een uitgangsvector waarin in tegengestelde oriëntatie ten opzichte van elkaar

10 (a) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van een filamenteuze bacteriofaag van E. coli bacteriën met F-pili, en

15 (b) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van een filamenteuze bacteriofaag van E. coli bacteriën met N-pili, zijn opgenomen.

Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een dergelijk vectorplasmide dat

20 (a) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van de filamenteuze bacteriofaag Ff (M13, fd en fl) of een mutant daarvan, en

25 (b) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van de filamenteuze bacteriofaag IKE of een mutant daarvan bevat.

Bij voorkeur is het nieuwe vectorplasmide gebaseerd op een pUC plasmide als uitgangsvector, liefst gebaseerd op het plasmide pUC9 als uitgangsvector.

30 Een bijzondere uitvoeringsvorm van een dergelijk nieuw vectorplasmide is gebaseerd op pUC9, waarbij (a) is ingevoegd in de unieke herkenningssequentie voor het restrictie-enzym NarI en (b) is ingevoegd in de unieke herkenningssequentie voor het restrictie-  
35 enzym NdeI, of omgekeerd.

In deze beschrijving wordt een voorbeeld van

9502061

een dergelijk plasmide gegeven, nl. plasmide pKUN9 met de in fig. 1 getoonde opbouw. Een ander voorbeeld is het uit pKUN9 afgeleide plasmide pKUN19 met de in fig. 2 weergegeven opbouw.

5 De uitvinding omvat ook vectorplasmiden als bovenstaand gedefiniëerd, waarin op een geschikte plaats een stuk dubbelstrengs DNA is ingevoegd.

De uitvinding strekt zich ook uit over microorganismen in het bijzonder E. coli bacteriën, welke een  
10 vectorplasmide volgens de uitvinding bevatten. Liefst wordt het vectorplasmide opgenomen in E. coli bacteriën, die gevoelig zijn voor infectie door F-specifieke en/of N-specifieke filamenteuze bacteriofagen. D.w.z. E. coli bacteriën met F-pili en/of N-pili, dankzij  
15 de aanwezigheid van Ftra en/of Ntra genen.

De uitvinding strekt zich verder uit tot toepassingen van de nieuwe vectorplasmiden volgens de uitvinding en tot werkwijzen voor het construeren van de nieuwe vectorplasmiden volgens de uitvinding.

20 Zo verschaft de uitvinding een werkwijze voor het selectief verpakken van één van de strengen of van elk van beide strengen van een stuk dubbelstrengs DNA in enkelstrengs DNA bevattende faag-achtige deeltjes, waarbij men voor infectie door F-specifieke filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, die  
25 een vectorplasmide volgens de uitvinding bevatten, waarin het stuk dubbelstrengs DNA is ingevoegd, met F-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige transducerende deeltjes isoleert, en/of voor infectie door N-specifieke  
30 filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, die een vectorplasmide volgens de uitvinding bevatten, met N-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige transducerende deeltjes isoleert, of een deel van een populatie van  
35 zowel voor F-specifieke als voor N-specifieke filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, die een vectorplasmide volgens de uitvinding bevatten,

met F-specifieke filamenteuze bacteriofagen en een ander deel van genoemde populatie met N-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige transducerende deeltjes isoleert.

5 De uitvinding strekt zich uit tot sequentie-analyse van elk van de aldus afzonderlijk verkregen strengen van het desbetreffende stuk DNA, en meer in het algemeen tot het gebruik van een vectorplasmide volgens de uitvinding, waarin een stuk dubbelstrengs  
10 DNA is ingevoegd, voor klonering van DNA of boodschapper RNA, DNA sequentiebepaling, plaatsgerichte mutagenese, SI-mapping, tot expressie brengen van gekloneerd DNA en voor het bereiden van een enkelstrengs hybridizatie-probe.

15 In zijn algemeenheid worden de nieuwe vectorplasmiden volgens de uitvinding geconstrueerd doordat men (a) resp. (b) kloonert in een restrictie-enzym herkenningssequentie van een uitgangsvector, transformanten selecteert, hierin (b) resp. (a) kloonert in  
20 een andere restrictie-enzym herkenningssequentie van de uitgangsvector, en transformanten selecteert.

Meer in het bijzonder gaat men zo te werk, dat men (a) resp. (b) kloonert in de unieke herkennings-sequentie voor het restrictie-enzym NarI of die voor  
25 het restrictie-enzym NdeI van pUC9, transformanten selecteert met behulp van een polA mutant van E. coli welke met F-specifieke resp. N-specifieke filamenteuze bacteriofagen is geïnfecteerd, vervolgens in één van de verkregen recombinant plasmiden (b) resp. (a) kloonert  
30 in de nog niet gebruikte unieke herkenningssequentie en transformanten selecteert met behulp van een polA mutant van E. coli welke met N-specifieke resp. F-specifieke filamenteuze bacteriofagen is geïnfecteerd.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding,  
35 die in het experimentele gedeelte nader wordt toegelicht, is een werkwijze voor het construeren van het vectorplas-

mide pKUN9, waarbij men het plasmide pUC9 behandelt met het restrictie-enzym NdeI en Klenow DNA polymerase I onder vorming van een lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, dit lineaire DNA ligeert met een  
5 lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, verkregen door het plasmide pIKori 2b (1) te behandelen met de restrictie-enzymen EcoRI en BamHI, het fragment met de (+)oorsprong + morfogenetisch signaal van Ike te isoleren en met Klenow DNA polymerase I te behan-  
10 len, transformanten met de in de NdeI plaats van pUC9 ingevoegde replicatieoorsprong + morfogenetisch signaal van Ike selecteert door transformatie van een polA mutant van E. coli welke met Ike of een mutant daarvan is geïnfecteerd en selectie van ampicilline-resistente  
15 kolonies, het recombinante plasmide, dat de (+)-oorsprong van Ike in dezelfde oriëntatie als het lacZ gen van pUC9 bevat, isoleert, dit plasmide behandelt met het restrictie-enzym NarI en Klenow DNA polymerase I,  
20 onder vorming van een lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, dit lineaire DNA ligeert met een lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, verkregen door het plasmide pEMBL8 te behandelen met het restrictie-enzym RsaI, het fragment met de (+)-oorsprong + morfogenetisch signaal van fl te isoleren  
25 en met Klenow DNA polymerase I te behandelen, en transformanten met de in de NarI plaats van pUC9 ingevoegde replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal van fl selecteert door transformatie van een polA mutant van E. coli welke met Ff of een mutant daarvan is  
30 geïnfecteerd en selectie van ampicilline-resistente kolonies.

Een verdere voorkeursuitvoeringsvorm van de uitvinding, welke eveneens in het experimentele gedeelte zal worden toegelicht, betreft een werkwijze voor  
35 het construeren van het uit pKUN9 afgeleide vectorplasmide pKUN19, waarbij men het plasmide pUC19 behandelt

met de restrictie-enzymen EcoRI, HindIII en vervolgens met HaeII, de produkten van de digestie isoleert en toevoegt aan de fragmenten welke verkregen worden bij digestie van het plasmide pKUN9 met de restrictie-enzymen  
5 EcoRI, HindIII en PstI, aan dit mengsel ligase toevoegt en de gevormde DNA moleculen naar E. coli JM83 transformeert en selecteert op agarplaten die ampicilline en X-gal bevatten.

Het van plasmide pKUN9 afgeleide plasmide pKUN19  
10 bevat de polylinkersequentie van het pUC19 plasmide. Daardoor bevat het ten opzichte van pKUN19 zelfs nog een viertal extra unieke knipplaatsen voor restrictie-enzymen en dus kloneringsplaatsen in het lacZ-gen.

Zoals bekend verloopt de replicatie van het  
15 enkelstrengs genoom DNA van de filamenteuze N-specifieke (IKe) en F-specifieke (M13, fd en fl, hier gezamenlijk aangeduid als Ff) bacteriofagen via een dubbelstrengs intermediair dat de replicatieve vorm (RF) genoemd



wordt. In de replicatiecyclus van het DNA worden drie stadia onderscheiden (zie voor een overzicht: Denhardt et al., 1978). In het eerste stadium wordt het virale enkelstrengs DNA omgezet in de replicatieve vorm, 5 een proces dat geheel afhankelijk is van functies, die door de gastheer worden gecodeerd en een in het enkelstrengs faaggenoom aanwezige (complementaire streng) replicatieoorsprong (de (-)oorsprong). In het tweede stadium wordt de replicatieve vorm vele 10 malen gerepliceerd en wordt een grote hoeveelheid nakomelingen van de replicatieve vorm verkregen. Dit proces wordt in gang gezet door de werking van het faag-gecodeerde gen-II eiwit, dat op een specifieke plaats een knip aanbrengt in de virale DNA-streng 15 (de virale streng replicatieoorsprong of (+)-oorsprong). (Meyer et al., 1979). Daardoor ontstaat een 3'-OH uiteinde, dat als primer dienst doet voor replicatie door DNA polymerase volgens een "rolling circle" mechanisme. Na één replicatieronde knipt het gen-II eiwit 20 de van zijn plaats gedwongen virale streng op exact dezelfde plaats, waardoor de oorspronkelijke (+)-streng van de nieuw gesynthetiseerde (+)-streng wordt gescheiden. Tegelijkertijd worden de verkregen enkelstrengs DNA moleculen en de replicatieve vorm covalent gesloten 25 tot circulaire moleculen (Meyer & Geider, 1982). Vroeg in de infectie wordt het nieuwe gesynthetiseerde enkelstrengs DNA als in het eerste stadium omgezet in de replicatieve vorm. Later in de infectie (het derde stadium), wordt het enkelstrengs DNA door een faag-gecodeerd enkelstrengs DNA bindend eiwit (het gen-V 30 eiwit) bedekt, waardoor de omzetting in de replicatieve vorm verhinderd wordt, hetgeen leidt tot de synthese van enkelstrengs DNA nakomelingen. Het nucleoproteïne-complex van enkelstrengs DNA en gen V-eiwit wordt 35 naar het gastheercelmembraan getransporteerd, waar het verpakt wordt tot rijpe faagdeeltjes. Voor dit

proces blijkt een specifieke DNA sequentie nodig te zijn, het morfogenetisch signaal, die naast de (+)-oorsprong gelegen is (Dotto & Zinder 1983).

Aanvraagster heeft nu gevonden dat de biologische functies van de gen-II eiwitten van de fagen IKE en Ff niet uitwisselbaar zijn. Bovendien heeft zij gevonden, dat recombinante plasmiden die zowel de (+)-oorsprong van IKE als die van Ff bevatten, zowel door het gen-II eiwit van IKE als dat van Ff gerepliceerd kunnen worden, mits de virale streng-replicatieoorsprongen in tegengestelde oriëntatie ten opzichte van elkaar zijn aangebracht. In tegenwoordigheid van het gen-II eiwit van IKE wordt alleen de (+)-oorsprong van IKE gebruikt voor de replicatie, terwijl de (+)-oorsprong van Ff gebruikt wordt als gen-II eiwit van Ff aanwezig is. Bovendien kunnen de plasmiden efficiënt verpakt worden tot faagachtige deeltjes, mits zij tevens het morfogenetische signaal van de faag bevatten. De functie van dit signaal is/gekoppeld <sup>in cis</sup> aan de tegenwoordigheid van een functionele (+)-faagoorsprong op dezelfde DNA streng (Dotto et al., 1981; Dotto & Zinder, 1983).

Als dus in recombinant plasmiden de oriëntatie van fragmenten van IKE en Ff, die de replicatieoorsprong en het morfogenetisch signaal bevatten, tegengesteld is, kan men door eenvoudigweg cellen die deze plasmiden bevatten naar keuze met IKE of Ff te infecteren, de DNA streng selecteren die in faagachtige deeltjes moet worden opgenomen.

Deze bijzondere eigenschappen werden gebruikt voor de constructie van de veelzijdige vectorplasmiden volgens de uitvinding.

De plasmiden volgens de uitvinding zijn bij voorkeur gebaseerd op een pUC9 plasmide. Gebruik van dit plasmide heeft de voorkeur omdat het een aantal unieke eigenschappen voor kloneringsdoeleinden bezit (Vieira & Messing, 1982).

Ondanks de invoering van de fl en IKe sequenties in pUC9 conform de uitvinding zijn alle kloneringsplaat-  
sen in het lacZ-DNA uniek, met uitzondering van de  
AccI plaats. Een bijkomend voordeel is, dat de relatief  
5 geringe grootte van het plasmide en zijn vermogen  
om recombinante klonen van het vectorplasmide als  
een plasmide te propageren, een stabiele insertie  
mogelijk maken, evenals een verpakking van veel grotere  
DNA-fragmenten dan mogelijk is met behulp van de fagen  
10 van de M13mp-reeks (Dente et al., 1983).

Plasmiden volgens de uitvinding, zoals de plas-  
miden pKUN9 en pKUN19, verenigen niet alleen alle  
unieke eigenschappen van de enkelstrengs faagvectoren  
en de pUC-plasmiden in zich, maar breiden ook hun  
15 toepassing uit door het mogelijk te maken elk van  
beide DNA strengen van één recombinant plasmide afzonderlijk  
in enkelstrengs vorm te verkrijgen. Deze eigenschap  
zal ongetwijfeld in het bijzonder van nut zijn bij  
het gebruik van "shotgun"-kloneren voor het bepalen  
20 van de sequentie van een betrekkelijk groot DNA-molecuul.  
Omdat bij gebruikmaking van de plasmiden volgens de  
uitvinding de dubbele hoeveelheid sequentie-informatie  
uit een enkele kloon verkregen kan worden, kan de  
tijd, nodig voor het ophelderen van de gewenste sequentie,  
25 aanzienlijk verminderd worden. Als alternatief kan  
door betrekkelijk kleine fragmenten te kloneren de  
nucleotidesequentie van beide strengen tegelijkertijd  
bepaald worden. Dit is met name nuttig wanneer in  
de sequentieanalyse van één streng dubbelzinnigheden  
30 gevonden worden.

De plasmiden volgens de uitvinding zijn nuttige  
vectoren voor het kloneren en sequencen van DNA (Sanger  
et al., 1980), evenals voor plaatsgerichte mutagenese  
(Zoller & Smith, 1982), voor "S1-mapping" (Ciliberto  
35 et al., 1983), klonering van boodschapper-RNA (Heidecker &  
Messing, 1983), expressie van gekloneerd DNA (Slocombe

et al., 1982) en voor de produktie van een enkelstrengs hybridisatieprobe (Hu & Messing, 1982).

In de figuren is figuur 1 een schematische weergave van de werkwijze voor de constructie van het plasmide volgens de uitvinding pKUN9 uitgaande van het plasmide pUC9.

Figuur 2 is een schematische weergave van de werkwijze voor de constructie van het plasmide volgens de uitvinding pKUN19 uit het plasmide pKUN9.

Figuur 3 geeft een gedeelte van de nucleotidensequentie weer van het lacZ-gen, dat in de uit geïnfec-teerde cellen geïsoleerde transducerende deeltjes aanwezig is. De sequentie van het verkregen enkelstrengs DNA na infectie met IKE9 kan slechts worden bepaald met de master-primer (bovenste sequentie), terwijl voor de sequentiebepaling van DNA uit de deeltjes verkregen na infectie met IRI de reverse-primer gebruikt moet worden (onderste sequentie).

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van het onderstaande experimentele gedeelte, dat alleen ter toelichting en niet tot beperking van de uitvinding dient.

#### A. Materialen en methoden.

##### (a) Bacteriën, fagen en plasmiden.

De gebruikte bacteriestammen waren Escherichia coli JM83, ( $\phi$ 80 lacZ,  $\delta$ M15, ara,  $\delta$  (lacpro), strA, thi) (Messing, 1979), N4156 en N4156/F' (polA, end, thy, gyrA) (Gallert et al., 1977). Teneinde JM83 gevoelig te maken voor infectie met IKE en Ff werden de compatibele conjugatieve plasmiden N3 en F'tslac::Tn5 via conjugatie in deze stam geïntroduceerd. (Dennison & Baumberg, 1975). Voor het verpakken van de F-streng van het plasmide pKUN9 werd de van fl afgeleide bacteriofaag IRI gebruikt, omdat deze bestand is tegen negatieve interferentie door plasmiden die een functionele fl-oorsprong dragen (Dotto et al., 1981). Bacteriofaag

IKe-9 is een variant van wildtype IKe (Kathoon et al., 1972; Peeters et al., 1985) en werd voor het verpakken van de I-streng van plasmiden pKUN9 gebruikt, omdat infectie met deze faag veel hogere opbrengsten  
5 aan transducerende deeltjes geeft dan infectie met wildtype IKe.

Het plasmide pIKori-2b(1) bevat een IKe-DNA-fragment waarop zowel de replicatie-oorsprong van IKe als het morfogenetische signaal voor het verpakken  
10 van enkelstrengs DNA in faagachtige deeltjes gelegen zijn. De plasmiden pEMBL8, pUC9 en pUC19 zijn in de literatuur beschreven (Dente et al., 1983; Viera & Messing, 1982; Yanisch-Perron et al., 1985).

(b) Enzymen en biochemicaliën.

15 Alle restrictie-enzymen, T4 DNA-ligase en DNA-polymerase I (Klenow-fragment) werden verkregen van Bethesda Research Laboratories, New England Biolabs of Boehringer Mannheim en gebruikt met het door Maniatis et al. (1982) beschreven drie-buffers systeem, of met de door de fabrikant  
20 voorgestelde buffer.

Om stompe uiteinden te vormen werd 1/ug DNA gedurende 30 minuten bij 37°C behandeld met 1 eenheid Klenow DNA-polymerase I in 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 75 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT) en  
25 100 /uM van de vier deoxynucleosidetrifosfaten, door een Sephadex G-50 superfine kolom gecentrifugeerd en geprecipiteerd met ethanol.

De beide deoxyoligonucleotide-"primers" ten behoeve van de sequentiebepaling.

30 5' d G-T-A-A-A-A-C-G-A-C-G-G-C-C-A-G-T-G 3'

( (-) of "master primer") en

5' d A-A-C-A-G-C-T-A-T-G-A-C-C-A-T 3'

( (+) of "reverse primer")

werden gesynthetiseerd door en verkregen van dr. J. van  
35 Boom en medewerkers (Afdeling der Organische Chemie van de Rijks-Universiteit Leiden). De (-) of master

primer is complementair aan de codogene streng, terwijl de (+) of reverse primer complementair is aan de niet-codogene streng van het lacZ-gen (zie figuur 2).

De oorsprong van de andere biochemicalïën is eerder beschreven (Konings, 1980; Peeters et al., 1983, 1985).

(c) Transformatie en berekening van het aantal

fagen en transducerende deeltjes.

E. coli werd competent gemaakt en getransformeerd volgens de werkwijze van Mandel & Higa (1970), zoals beschreven door Maniatis et al. (1982). Indien noodzakelijk werden de cellen 10 minuten voor de CaCl<sub>2</sub>-behandeling met IKe of Ff geïnfecteerd.

De getransformeerde cellen werden uitgeplaat op 2 YT-agarplaten (Miller et al., 1972) die 100/ug/ml ampicilline en - indien gewenst - 0,004% Xgal bevatten.

Het aantal infectieve fagen en ampicilline-resistentie transducerende deeltjes werd bepaald door 100/ul van de culture gedurende 5 minuten te centrifugeren in een Eppendorf centrifuge. Vervolgens werd 50/ul van de bovenstaande vloeistof in een andere buis overgebracht en gedurende 2 minuten bij 65°C geïncubeerd om de overgebleven bacteriën te doden. Porties van 10 µl van geschikte verdunningen werden dan toegevoegd aan 100/ul exponentieel groeiende E. coli cellen en bij 37°C gedurende 10 minuten geïncubeerd. De mengsels werden uitgeplaat op 2 YT-agarplaten die 100/ug/ml ampicilline bevatten, en een nacht bij 37°C geïncubeerd. Het aantal gevormde ampicilline-resistente kolonies werd gebruikt om het aantal in de oorspronkelijke culture aanwezige transducerende deeltjes te berekenen. Op dezelfde manier werd het aantal infectieve fagen bepaald door seriegewijze verdunningen op een geschikte indicatorstam uit te platen.

(d) Isolatie van enkelstrengs DNA en sequentiebepaling.

JM83/N3/F' met daarin het plasmide pKUN9 werd bij 37°C gekweekt tot de culture een dichtheid van  $5 \times 10^8$  cellen/ml bereikt had. Vervolgens werden de cellen met bacteriofaag IKe-9 of IRI geïnfecteerd bij een infectiemultipliciteit van 20. Na één nacht incubatie werd 1,5 ml van de culture gedurende 5 minuten in

6502001

een Eppendorf microfuge gecentrifugeerd en 1 ml bovenstaande vloeistof werd in een nieuwe buis overgebracht. Men voegde 250/ul van een oplossing van 2,5 M NaCl en 20% polyethyleenglycol-6000 toe, mengde en liet  
5 het mengsel gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur staan. Na centrifugeren gedurende 10 minuten in een Eppendorf microfuge werd de bovenstaande vloeistof verwijderd en het precipitaat werd opgelost in 100/ul TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA en éénmaal bij 65°C  
10 met 100/ul met TE verzadigde fenol, en éénmaal bij kamertemperatuur met 100/ul met TE verzadigde fenol/chloroform (1:1) geëxtraheerd. Het DNA in de waterlaag werd geprecipiteerd met 2,5 volumedelen ethanol en na centrifugering werd het precipitaat éénmaal gewassen met 70%  
15 ethanol, gedroogd en opgelost in 20/ul TE.

De sequentiebepaling van het DNA werd uitgevoerd volgens de door Sanger et al. (1977) beschreven dideoxymethode, gebruik makend van 5-10/ul matrijs-DNA. Bij verpakken onder regie van faag IRI werd sequentie  
20 van het enkelstrengs DNA (de F-streng) bepaald met behulp van de (+) of reverse primer, terwijl de (-) of master primer gebruikt werd voor het bepalen van de sequentie van de onder regie van IKe-9 verpakte DNA streng (de I-streng) (zie figuur 2). In de handel  
25 verkrijgbare primers kunnen overigens eveneens gebruikt worden.

B. Constructie van het plasmide pKUN9.  
Voor de constructie van pKUN9 werd gekozen voor pUC9 als uitgangsplasmide (Vieira & Messing, 1982), omdat  
30 dit een aantal aantrekkelijke eigenschappen bezit als kloneringsvector. Vreemd DNA kan geïnserteerd worden in een groot aantal endonuclease-restrictieplaatsen binnen een kort polylinker DNA in het gedeelte dat voor het  $\alpha$ -peptide van  $\beta$ -galactosidase codeert.  
35 Dit maakt een directe identificatie van recombinantklonen mogelijk zonder de noodzaak om gebruik te maken



van "replica-plating" op geschikte indicatorplaten (Messing, 1983).

Het plasmide pUC9 bevat unieke herkenningssequen-  
ties voor elk van de restrictie-enzymen NarI en NdeI.  
5 Deze plaatsen liggen dicht bij elkaar tussen het lacZ-gen  
(pUC9 bevat niet het volledige lacZ-gen, doch slechts  
het 5'-stuk met inbegrip van promotor en operator)  
en het gen dat voor ampicilline-resistentie codeert  
(zie figuur 1). Omdat de NarI plaats met succes gebruikt  
10 is voor de constructie van pEMBL-plasmiden (Dente  
et al., 1983), viel te verwachten dat beide plaatsen  
gebruikt zouden kunnen worden voor de insertie van  
vreemd DNA, zonder de eigenschappen van het plasmide  
pUC9 aan te tasten.

15 Het plasmide pIKori-2b(1) werd op de volgende  
manier geconstrueerd. In het plasmide pUR222 (Ruether  
et al., 1981) werd het kleine PvuII-fragment in het  
lacZ-gen, dat de meervoudige kloneringsplaatsen bevat,  
vervangen door het overeenkomstige fragment van het  
20 lacZ-gen van de faag M13mp9. Het verkregen pBP9 genaamde  
plasmide bevat daardoor naast de in pUR222 aanwezige  
kloneringsplaatsen unieke sequenties voor SmaI (XmaI)  
en Hind III.

Vervolgens werd het AluI-B fragment (807 n) van  
25 het intergenische gebied van IKE in de SmaI-plaats  
van plasmide pBP9 gekloneerd. Dit plasmide werd pIKori-2  
genoemd. Tenslotte werd een Bal-31 deletiemutant verkre-  
gen van het plasmide pIKori-2, waarbij het 3' uiteinde  
van de IKE insertie op positie 6621 ligt. Dit plasmide  
30 pIKori-2b(1) bevat zowel de functionele (+)-oorsprong  
van IKE als het morfogenetische signaal van deze bacterio-  
faag (zie figuur 1).

De IKE-insertie werd uit dit plasmide verwijderd  
door digestie met EcoRI en BamHI, het werd met Klenow  
35 DNA-polymerase I behandeld om stompe uiteinden te  
verkrijgen en vervolgens werd het in de NdeI-plaats  
gekloneerd van eveneens met Klenow DNA-polymerase I  
behandelde pUC9. Omdat de insertie van het IKE-fragment

in de NdeI-plaats van pUC9 niet tot een selecteerbare fenotypische verandering leidt werden recombinant plasmiden geselecteerd door gebruik te maken van het feit dat de ColEI-oorsprong van pUC9 niet functioneel is in cellen, die DNA-polymerase I missen (Bolivar et al., 1977). In cellen waarin dit enzym afwezig is (polA mutanten) kunnen van pUC9 afgeleide recombinant plasmiden niet repliceren, tenzij een andere functionele oorsprong aanwezig is. Het ligatiemengsel werd daarom gebruikt om polA cellen te transformeren die met IKE geïnfecteerd waren om in trans een bron voor gen-II eiwit te verschaffen. Er werden ampicilline-resistente kolonies verkregen, waaruit blijkt dat de IKE (+)-oorsprong met succes gekloneerd was. Het plasmide-DNA van verscheidene kolonies werd geïsoleerd en gebruikt om stam JM83 te transformeren. Na selectie op ampicilline en X-gal bevattende platen werd het plasmide-DNA van verscheidene blauwe kolonies geïsoleerd en geanalyseerd door digestie met restrictie-enzymen. De resultaten gaven aan, dat het IKE-fragment in beide oriëntaties gekloneerd was. Het plasmide dat de (+)-oorsprong van IKE in dezelfde oriëntatie bevatte als het lacZ-gen van pUC9 werd pUCI-2e genoemd (zie figuur 1).

De functionele (+)-oorsprong en het morfogenetische signaal van de Ff-faag fl is gelegen op een RsaI-fragment, dat vrijwel het gehele intergenische gebied van de faag omvat. (Hill & Petersen, 1982). Hetzelfde fragment is ook aanwezig in de in de pEMBL-plasmiden aanwezige fl-DNA sequentie. (Dente et al., 1983). Na digestie van het plasmide pEMBL8(-) met RsaI werd het 514 baseparen omvattende fragment geïsoleerd, dat de (+)-oorsprong en het morfogenetische signaal van fl bevatte. Vervolgens werd dit fragment in de NarI-plaats geligeerd van pUCI-2e dat tezamen met Klenow DNA-polymerase I behandeld was om stompe uiteinden te vormen. Na transformatie van met IRI geïnfecteerd

de polA cellen werden ampicilline-resistente kolonies  
verkregen en het plasmide DNA hieruit werd geïsoleerd  
en gebruikt om stam JM83 te transformeren. Analyse  
van het plasmide DNA van verscheidene blauwe ampicilline-  
5 resistente kolonies door digestie met restrictie-  
enzymen toonde aan, dat alle plasmiden een identieke  
structuur hadden en de fl (+)-oorsprong bevatten in  
een oriëntatie, tegengesteld aan die van IKe en het  
lacZ-gen. De constructie en structuur van dit plasmide,  
10 pKUN9 genaamd, wordt schematisch weergegeven in Figuur 1.

#### C. Constructie van het plasmide pKUN19.

Als uitgangsplasmide diende pUC19 (Yanisch-  
Perron et al., 1985). Na isolatie werd het plasmide  
geknipt met behulp van de restrictie-enzymen EcoRI  
15 en HindIII die in de polylinkersequentie in het lacZ-gen  
knippen, en vervolgens met het restrictie-enzym HaeII  
dat op diverse plaatsen in het pUC19 plasmide knipt,  
waardoor het wordt geïnactiveerd (zie figuur 2). Na  
de digestie werden de DNA-fragmenten gevoegd bij de  
20 fragmenten, verkregen door digestie van het plasmide  
pKUN9 met de restrictie-enzymen EcoRI, HindIII en PstI.  
Deze enzymen knippen in de polylinkersequentie van  
pKUN9, waardoor deze wordt geïnactiveerd. Aan het  
verkregen mengsel werd ligase toegevoegd. De gevormde  
25 recombinant DNA-moleculen werden vervolgens getransformeerd  
naar E. coli JM83 of JM101 (Yanisch-Perron et al.,  
1985). Na de transformatie werden de bacteriën uitgeplaat  
op 2YT agar die als selectiemarkers ampicilline en  
X-gal bevatte. De plasmiden uit een aantal verkregen  
30 blauwe kolonies werden onderzocht op hun restrictie-enzym  
splitsingspatronen en het bleek onomstotelijk, dat  
de oorspronkelijk van het pUC9 afkomstige polylinkersequentie  
vervangen was door die van het plasmide pUC19. Door  
deze uitwisseling heeft het vectorplasmide pKUN19  
35 er nu vier unieke restrictie-enzym knipplaatsen bijgekregen  
ten opzichte van het plasmide pKUN9 (voor de enzymen

SphI, XbaI, KpnI en SstI), zodat de bruikbaarheid als kloneringsvector verder vergroot is.

D. Selectieve en efficiënte verpakking van de DNA-strengen van pKUN9.

5 Om aan te tonen dat zowel onder regie van IKE-9 als van IRI enkelstrengs DNA van pKUN9 efficiënt verpakt wordt in ampicilline-resistente transducerende deeltjes, werden JM83(N3/F') cellen met daarin pKUN9 gekweekt tot een dichtheid van  $5 \times 10^8$  cellen/ml en vervolgens  
10 geïnfecteerd met IKE-9 of IRI (bij een infectiemultipliteit van 20). 12 Uur na de infectie werd het aantal infectieve fagen en transducerende deeltjes bepaald. Het bleek, dat het aantal in de bovenstaande vloeistof van zowel de met IKE-9 als de met IRI geïnfecteerde  
15 cellen aanwezige transducerende deeltjes vrijwel gelijk is aan het aantal infectieve faagdeeltjes. Vrijwel hetzelfde werd waargenomen na isolatie van het enkelstrengs DNA uit de bovenstaande vloeistof van de culture en daaropvolgende fractionering op agarosegels. In  
20 elk DNA-preparaat waren twee soorten enkelstrengs DNA-moleculen in ongeveer gelijke hoeveelheden aanwezig, waarvan er een overeenkwam met faag-DNA en de ander met plasmide-DNA. Uit deze gegevens werd daarom geconcludeerd, dat zowel onder regie van IKE-9 als onder regie  
25 van IRI efficiënt enkelstrengs DNA van pKUN9 in faagachtige deeltjes wordt verpakt.

Het feit, dat het gen-II eiwit van IKE niet in staat is DNA moleculen te repliceren die slechts

de (+)-oorsprong van Ff bevatten en omgekeerd suggereert dat in met IKE-9 geïnfekteerde cellen de I-streng en in met IRI geïnfekteerde cellen de F-streng van het plasmide pKUN9 selectief verpakt wordt in transduce-  
5 rende faagachtige deeltjes. Om aan te tonen dat deze veronderstelling juist is, werd met behulp van de master- en reverse- primers de nucleotidevolgorde bepaald van het lacZ-gen in het uit de bovenstaande vloeistof van met IKE-9 of IRI geïnfekteerde, pKUN9  
10 bevattende cellen geïsoleerde enkelstrengs DNA (zie: (A)(a)). Omdat deze primers slechts complementair zijn aan één streng van het lacZ-gen (dat zowel in de I-als de F-streng van pKUN9 aanwezig is, maar niet in het faag-DNA), bepaalt sequentieanalyse met behulp  
15 van deze primers of één van beide of beide strengen van pKUN9 in de enkelstrengs DNA preparaten aanwezig zijn. Zoals aangegeven in Figuur 3, kan de nucleotidevolgorde van het lacZ-gen, aanwezig in het uit de door met IKE-9 geïnfekteerde cellen geproduceerde transduce-  
20 rende deeltjes geïsoleerde enkelstrengs DNA, slechts bepaald worden met behulp van de master primer, terwijl voor de analyse van de nucleotidevolgorde van het lacZ-gen, aanwezig in het uit de door met IRI geïnfec-  
teerde cellen geproduceerde transducerende deeltjes  
25 geïsoleerde enkelstrengs DNA, de reverse primer gebruikt moet worden. Dezelfde conclusies werden getrokken na "dot-blot"-hybridisatie van de enkelstrengs DNA preparaten onder gebruikmaking van dezelfde primers als probe. De master primer hybriseerde alleen met  
30 enkelstrengs DNA verpakt door IKE-9, terwijl de reverse primer alleen hybridiseerde met door IRI verpakt DNA.

Deze waarnemingen bewijzen onomstotelijk dat na infectie van pKUN9 bevattende cellen met IKE-9 de I-streng, en na infectie met IRI de complementaire  
35 F-streng efficiënt en selectief verpakt wordt in faag-achtige transducerende deeltjes. Bovendien tonen de

resultaten aan, dat het uit deze deeltjes geïsoleerde enkelstrengs DNA gemakkelijk gebruikt kan worden voor analyse van nucleotide-sequenties.

5 Literatuur:

- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlatch, M.C., Heynecker, H.L. & Boyer, H.W. (1977) *Gene* 2, 95-113.
- 10 Ciliberto, G., Raugei, G. Costanzo, F., Dente, L. & Cortese, R. (1983) *Cell* 32, 725-733.  
Deininger, P.L. (1983) *Anal. Biochem.* 135, 247-263.  
Denhardt, D.T., Dressler, D. & Ray, D.S. eds (1978) *The Single-Stranded DNA Phages*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 15 Dennison, S. & Baumberg, S. (1975), *Mol. gen. Genet.* 138, 321-331.  
Dente, L., Cesareni, G. & Cortese, R. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 1645-1655.
- 20 Dotto, G.P. & Zinder, N.D. (1983) *Virology* 130, 252-256  
Dotto, G.P. Horiuchi, K. & Zinder, N.D. (1981) *Virology* 114, 463-473.  
Gellert et al. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4772-4776.
- 25 Guo, L-H., & Wu, R. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10, 2065-2084  
Heidecker, G. & Messing, J. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 4891-4906.  
Hill, D.F. & Petersen, G.B. (1982) *J. Virol.* 44, 32-46.  
Hu, N. & Messing, J. (1982) *Gene* 17, 271-277
- 30 Kathoon, H. Iyer, R.V. & Iyer, V. (1972) *Virology* 48, 145-155.  
Konings, R.N.H. (1980) *Meth. Enzymol.* 65, 795-811.  
Mandel, M. & Higa, A. (1970), *J. Mol. Biol.* 53, 154-161.  
Maniatis, T., Fritsch, E.F. Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, New York.
- 35 Messing, J. (1979) *Recombinant Technical Bulletin*

- 2, 43-48.
- Messing, J., Crea, R. & Seeburg, P.H. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 309-321.
- Messing, J. (1983) Meth. Enzymol. 101, 20-78.
- 5 Meyer, T.F., Geider, K., Kurz, C. & Schaller, H. (1979) Nature 278, 365-367.
- Meyer, T.F. & Geider, K. (1982) Nature 296, 828-832.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York.
- 10 Old, R.W. & Primrose, S.B. (1982) Principles of Gene Manipulation, 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, London.
- Peeters, B.P.H., Konings, R.N.H. & Schoenmakers, J.G.G. (1983), J. Mol. Biol. 169, 197-215.
- 15 Peeters, B.P.H., Peters, R.M., Schoenmakers, J.G.G. & Konings, R.N.H. (1985) J. Mol. Biol. 181, 27-39.
- Ruether, U., Koenen, M., Otto, K. & Mueller-Hill, B. (1981) Nucl. Acids Res. 9, 4087-4098.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- 20 Sanger, F., Coulson, A.R., Barrel, B.G., Smith, A.J.H. & Roe, B.A. (1980) J. Mol. Biol. 143, 161-178.
- Slocombe, P., Easton, A., Boseley, P. & Burke, D.C. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5455-5459.
- 25 Vieira, J. & Messing, J.M. (1982) Gene 19, 269-276.
- Wallace, R.B., Johnson, M.J., Suggs, S.V., Miyoshi, K., Bhatt, R. & Itakura, K. (1981) Gene 16, 21-26.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985), Gene 33, 103-119.
- 30 Zoller, M.J. & Smith, M. (1982), Nucl. Acids Res. 10, 6487-6500.

Conclusies

1. Vectorplasmide, opgebouwd uit een uitgangsvector waarin in tegengestelde oriëntatie ten opzichte van elkaar
  - 5 (a) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van een filamenteuze bacteriofaag van E. coli bacteriën met F-pili, en
  - (b) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van een filamenteuze bacteriofaag van E. coli bacteriën met N-pili, 10 zijn opgenomen.
2. Vectorplasmide volgens conclusie 1, dat
  - 15 (a) de replicatie-oorsprong + morfogenisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van de filamenteuze bacteriofaag Ff (M13, fd en fl) of een mutant daarvan, en
  - (b) de replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal, of een werkzame mutant daarvan, van de filamenteuze bacteriofaag IKE of een mutant daarvan bevat.
- 20 3. Vectorplasmide volgens conclusie 1 of 2, gebaseerd op een pUC plasmide als uitgangsvector.
4. Vectorplasmide volgens conclusie 3, gebaseerd op het plasmide pUC9 als uitgangsvector.
5. Vectorplasmide volgens conclusie 4, waarbij
  - 25 (a) is ingevoegd in de unieke herkenningssequentie voor het restrictie-enzym NarI en (b) is ingevoegd in de unieke herkenningssequentie voor het restrictie-enzym NdeI, of omgekeerd.
6. Vectorplasmide pKUN9 met de in fig. 1 getoonde 30 opbouw.
7. Vectorplasmide pKUN19 met de in fig. 2 getoonde opbouw.
8. Vectorplasmide volgens een of meer van de conclusies 1-7, waarin op een geschikte plaats een stuk



dubbelstrengs DNA is ingevoegd.

9. Micro-organismen, in het bijzonder E. coli bacteriën, welke een vectorplasmide volgens een of meer van de conclusies 1-8 bevatten.

5 10. Voor infectie door F-specifieke en/of N-specifieke filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, welke een vectorplasmide volgens een of meer van de conclusies 1-8 bevatten.

10 11. Werkwijze voor het selectief verpakken van één van de strengen of van elk van beide strengen van een stuk dubbelstrengs DNA in enkelstrengs DNA bevattende faag-achtige deeltjes, waarbij men voor infectie door F-specifieke filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, die een vector plasmide volgens  
15 conclusie 8 bevatten, met F-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige transducerende deeltjes isoleert, en/of voor infectie door N-specifieke filamenteuze bacteriofagen gevoelige E. coli bacteriën, die een vectorplasmide  
20 volgens conclusie 8 bevatten, met N-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige transducerende deeltjes isoleert, of een deel van een populatie van zowel voor F-specifieke als voor N-specifieke filamenteuze bacteriofagen  
25 gevoelige E. coli bacteriën, die een vectorplasmide volgens conclusie 8 bevatten, met F-specifieke filamenteuze bacteriofagen en een ander deel van genoemde populatie met N-specifieke filamenteuze bacteriofagen infecteert en na incubatie de gevormde faag-achtige  
30 transducerende deeltjes isoleert.

12. Werkwijze voor het bepalen van de nucleotidensequentie van een stuk dubbelstrengs DNA, waarbij men op een op zichzelf bekende wijze de nucleotidensequentie bepaalt van elk van beide strengen van het  
35 desbetreffende stuk DNA nadat deze strengen afzonderlijk zijn verkregen met behulp van de werkwijze volgens

conclusie 11.

13. Gebruik van een vectorplasmide volgens conclusie 8 voor klonering van DNA of boodschapper RNA, DNA sequentiebepaling, plaatsgerichte mutagenese, S1-mapping, tot expressie  
5 brengen van gekloneerd DNA en voor het bereiden van een enkelstrengs hybridizatie-probe.

14. Werkwijze voor het construeren van een vector plasmide volgens conclusie 1, waarbij men (a) resp. (b) kloonert in een restrictie-enzym herkenningssequen-  
10 tie van een uitgangsvector, transformanten selecteert, hierin (b) resp. (a) kloonert in een andere restrictie-enzym herkenningssequentie van de uitgangsvector, en transformanten selecteert.

15. Werkwijze voor het construeren van een vector plasmide volgens conclusie 5, waarbij men zo te werk, dat men (a) resp. (b) kloonert in de unieke herkennings-  
sequentie voor het restrictie-enzym NarI of die voor het restrictie-enzym NdeI van pUC9, transformanten selecteert met behulp van een polA mutant van E. coli  
20 welke met F-specifieke resp. N-specifieke filamenteuze bacteriofagen is geïnfecteerd, vervolgens in één van de verkregen recombinant plasmiden (b) resp. (a) kloonert in de nog niet gebruikte unieke herkenningssequentie en transformanten selecteert met behulp van een polA  
25 mutant van E. coli welke met N-specifieke resp. F-specifieke filamenteuze bacteriofagen is geïnfecteerd.

16. Werkwijze voor het construeren van het vectorplasmide pKUN9, waarbij men het plasmide pUC9 behandelt met het restrictie-enzym NdeI en Klenow DNA-polymerase I  
30 onder vorming van een lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, dit lineaire DNA ligeert met een lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, verkregen door het plasmide pIKori 2b (1) te behandelen met de restrictie-enzymen EcoRI en BamHI, het fragment  
35 met de (+)oorsprong + morfogenetisch signaal van IKE te isoleren en met Klenow DNA-polymerase I te behande-

len, transformanten met de in de NdeI plaats van pUC9  
ingevoegde replicatieoorsprong + morfogenetisch signaal  
van IKE selecteert door transformatie van een polA  
mutant van E. coli welke met IKE of een mutant daarvan  
5 is geïnfecteerd en selectie van ampicilline-resistente  
kolonies, het recombinante plasmide, dat de (+)-oor-  
sprong van IKE in dezelfde oriëntatie als het lacZ-gen  
van pUC9 bevat, isoleert, dit plasmide behandelt met  
het restrictie-enzym NarI en Klenow DNA-polymerase I,  
10 onder vorming van een lineair dubbelstrengs DNA met  
stompe uiteinden, dit lineaire DNA ligeert met een  
lineair dubbelstrengs DNA met stompe uiteinden, verkre-  
gen door het plasmide pEMBL8 te behandelen met het  
restrictie-enzym RsaI, het fragment met de (+)-oor-  
15 sprong + morfogenetisch signaal van fl te isoleren  
en met Klenow DNA-polymerase I te behandelen, en transfor-  
manten met de in de NarI plaats van pUC9 ingevoegde  
replicatie-oorsprong + morfogenetisch signaal van fl  
selecteert door transformatie van een polA mutant  
20 van E. coli welke met Ff of een mutant daarvan is  
geïnfecteerd en selectie van ampicilline-resistente  
kolonies.

17. Werkwijze voor het construeren van het vector-  
plasmide pKUN19, waarbij men het plasmide pUC19 behandelt  
25 met de restrictie-enzym EcoRI, HindIII en vervolgens  
met HaeI, de produkten van de digestie isoleert en  
toevoegt aan de fragmenten, welke verkregen worden  
bij digestie van het plasmide volgens conclusie 6  
met de restrictie-enzymen EcoRI, HindIII en PstI, aan  
30 dit mengsel ligase toevoegt en de gevormde DNA-moleculen  
naar geschikte E. coli transformeert en selecteert  
op agarplaten die ampicilline en X-gal bevatten.

8502051

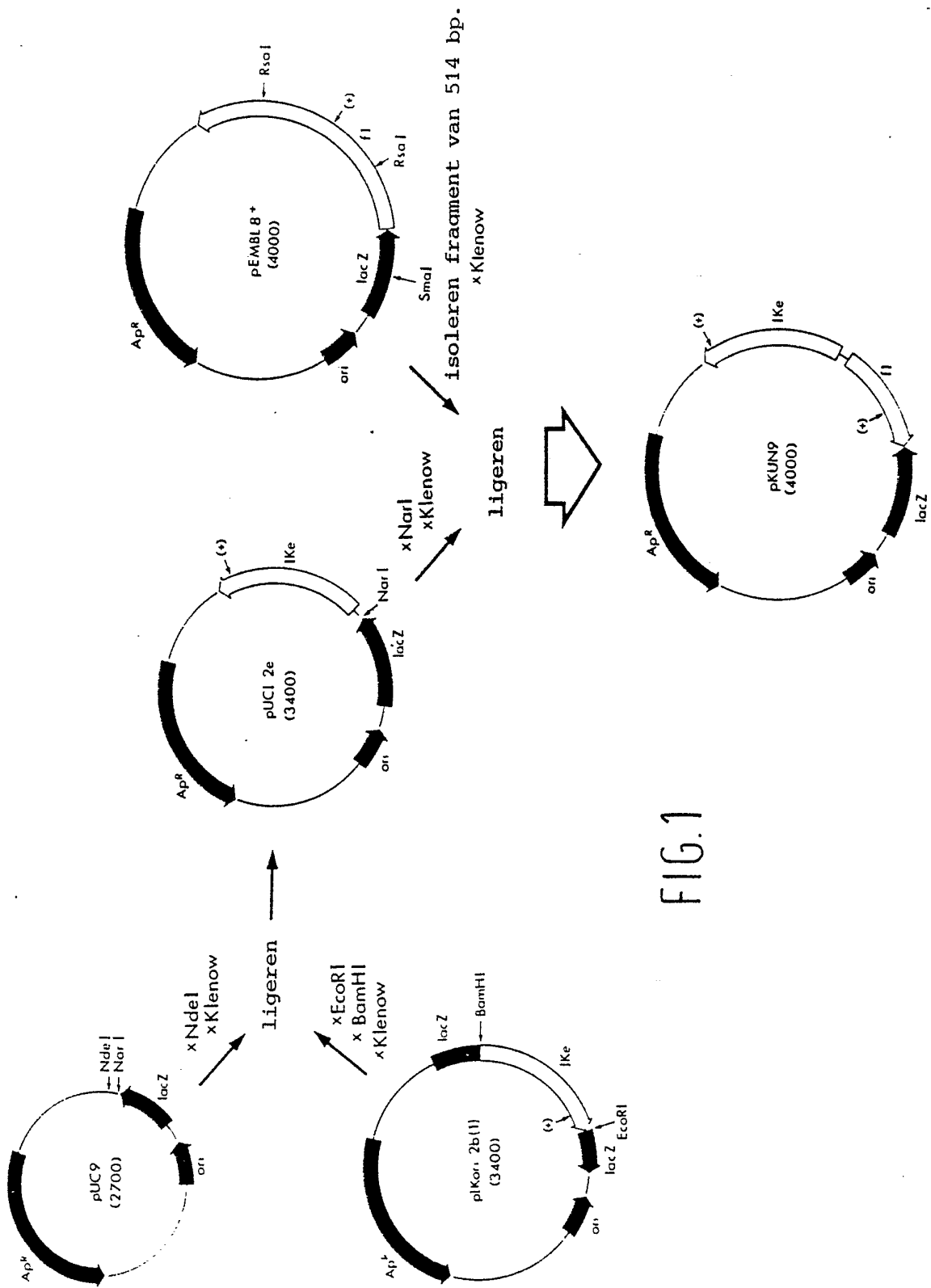
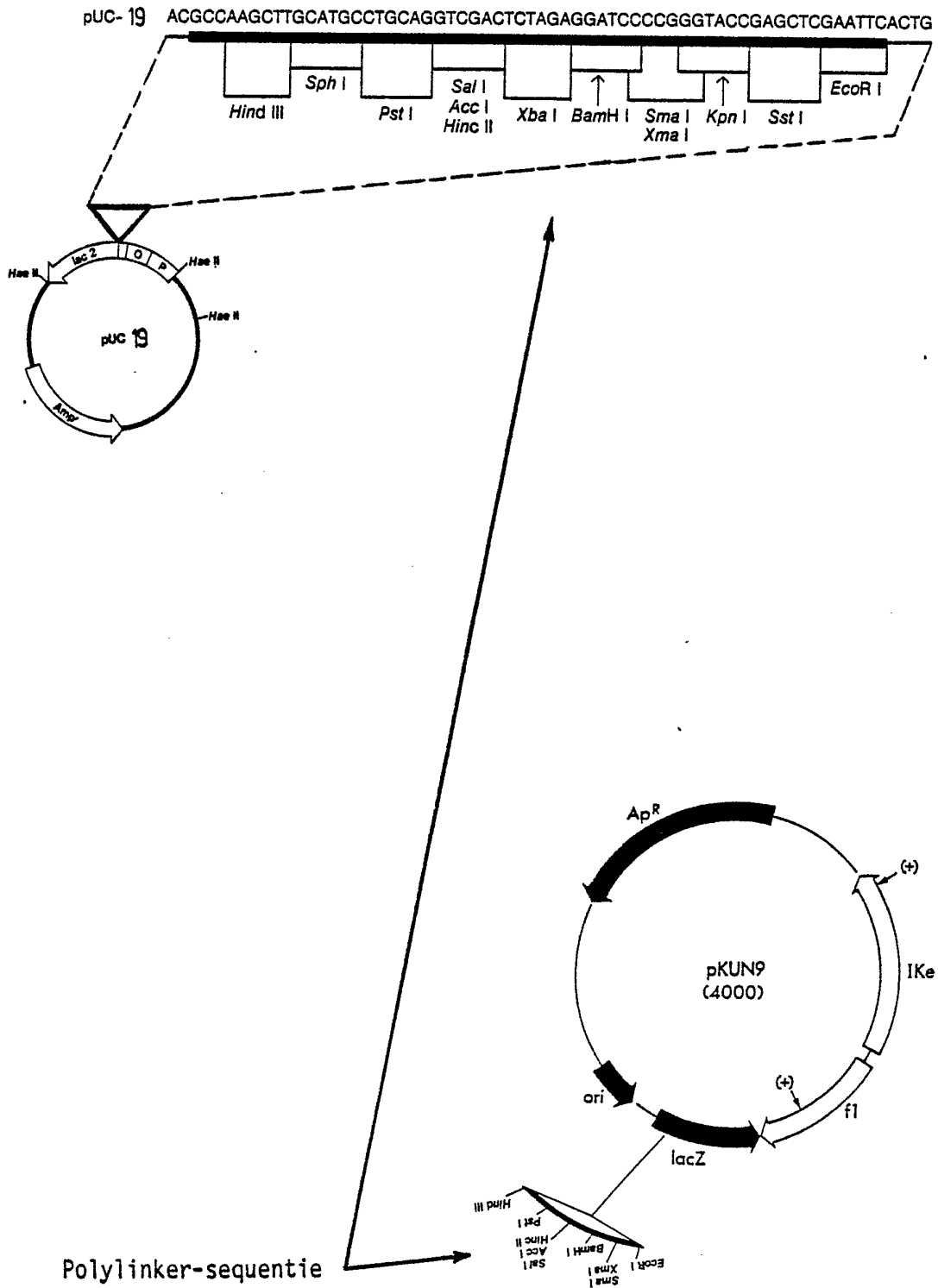


FIG.1

0050203

FIG. 2



2502031

## FIG.3

*lacZ* *HindIII* *PstI* *HincII* *SalI* *BamHI* *SmaI* *EcoRI*  
 5'-AAACAGCTATGACCATGATTACGGCAAGCTTGGCTGCAGGTCCGACGGATCCCCGGGAATTCACTGGCCGTCGTTTACAA-3' I-streng (door IKe-9 verpakt)  
 \*\*\*\*\*  
 reverse/(+)-primer 3'-GTGACCGGCAGCAAAATG-5'  
 5'-AACAGCTATGACCAT-3' master/(-)-primer  
 \*\*\*\*\*  
 3'-TTTGTGGATACGTGGTACTAAATGGGTTTCGAACCGACCTCCAGCTGCCTAGGGGCCCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTT-5' F-streng (door IRI verpakt)