



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2287/80

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 15/71

(22) Indleveringsdag: 27 maj 1980

C 12 N 15/66

(41) Alm. tilgængelig: 16 jan 1981

(44) Fremlagt: 07 jan 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 jun 1979 GB 7919245

(71) Ansøger: *G.D. Searle & Co.; Old Orchard Road; Skokie; Illinois 60077, US

(72) Opfinder: Norman Henry *Carey; GB, John Spencer *Ertage; GB, William Charles Albert *Tacon; GB, Robert Alexander

*Hallowell; US

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Plasmidvektorer, fremgangsmåde til fremstilling deraf, bakterieceller transformeret med plasmidvektorer samt udtrykkelser af protein i transformerede bakterieceller

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 4937/78

Andre publikationer. Science, vol 198 (1977) side 1056-63,
Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 73 (1976) side
3838-42, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.
vol 76 (1979) side 106-10, J. Backriol,
126 (1976) side 447-53

(57) Sammendrag:

2287-80

Plasmid med et indsættelsessted for et eukaryotisk DNA-fragment ved siden af en bakteriel promotor og nedstrøms fra et prokaryotisk ribosombindingssted og initiatorcodon, således at den bakterielle promotor regulerer transcription og oversættelse af et indsat DNA-fragment. Et sådant plasmid kan fremstilles enten ved cloning af en bakteriepromotor til et isoleret plasmid, bestemmelse af et tilsigtet indsættelsessted og tilvejebringelse af indsættelsesstedet, hvis det ikke allerede er tilstede, eller ved at digerere cellulært DNA med et specifikt restriktionsenzym, isolere et promotor-holdigt fragment og clone fragmentet til et egnet bakterielt plasmid. Det således dannede plasmid kan anvendes til fremstilling af andre plasmider, i hvilke der på indsættelsesstedet er indsat genetisk information i form af et passende modificeret DNA, der er tilpasset til at fremstille et ønsket polypeptid.

Et aspekt angår en række plasmidvektorer, der besidder de grundlæggende egenskaber for et Hind III-indsættelsessted, der ligger

ved siden af en tryptophan-promotor, samt et gen til tetracyclin-resistens. Plasmidvektorerne er på grund af deres struktur yderst velegnede til, på Hind III-stedet, at modtage et indsat eukaryotisk DNA-fragment, hvis transcription og oversættelse reguleres af tryptophan-promotoren. Et andet aspekt angår fremstillingen af nic⁻-derivater af plasmiderne, enten ved at fjerne nic-stedet ved partielle restriktioner eller ved substitution af den region som indeholder nic-stedet.

Den foreliggende opfindelse angår plasmidvektorer, der er egnet til at modtage og transcribere DNA-fragmenter og deres fremstilling, plasmidvektorer med et indsat eukaryotisk DNA-fragment og deres fremstilling, transformation af bakterieceller med sådanne plasmidvektorer samt fremgangsmåde til udtrykkelse af protein ved dyrkning af således transformerede bakterieceller.

De fleste organismers genetiske indhold er i form af DNA. Denne genetiske information udtrykkes ved en kompleks serie af reaktioner, der omfatter transcription af DNA til RNA og efterfølgende oversættelse af RNA til protein.

I bakterieceller er transcriptionen og oversættelsen tæt sammenknyttede. Mængden af et givet protein reguleres ved den mængde transcription, der forekommer. Tryptophanoperon (trp-operon) og reguleringen deraf er et godt eksempel på dette. Bakterier syntetiserer tryptophan ved en serie biokemiske reaktioner, der omfatter 5 enzymer. Den genetiske information til fremstilling af disse enzymer er således organiseret, at de individuelle gener følger efter hinanden i genomet, og at de alle reguleres fra et enkelt sted, operatoren.

Reguleringen af transcriptionen opererer efter et feed-back-princip, idet operonet blokeres eller undertrykkes ved tilstedeværelse af tryptophan, medens det i fravær af tryptophan "af-undertrykkes". I den af-undertrykte tilstand initieres transcriptionen ved promotoren (en region af DNA nær operatoren med høj affinitet for RNA-polymerase) og forløber gennem operatoren til operonens strukturelle gener.

Det er kendt at indsætte en fuldstændig trp-operon i Col E1-plasmider. Således beskriver Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73 (1976), side 3838-3843 indsættelsen af et ikke-fraktioneret Eco RI-fragment, der indeholder den fuldstændige trp-operon fra *E. coli* i plasmidet Col E1, og anfører, at det resulterende plasmid kan være anvendeligt til cloning og amplifikation af forskellige funktionelt definerede gener. Journal of Bacteriology, 126 (1976), side 447-453, beskriver et miniplasmid, der er dannet efter indsættelse af et Eco RI-trp-fragment, der er afledt fra plasmidet pSC105, og som indeholder den

fuldstændige trp-operon. Begge referencer beskriver anvendelsen af hele trp-operonen, og det er hverken nævnt eller antydnet, at et fragment, der kun indeholder en del af trp-operonen, f.eks. omfattende trp-promotoren, trp-E-genet og/eller trp-D-genet, kan opnås og/eller indsættes i et plasmid til udvikling af ekspression af et ønsket genprodukt.

Dansk patentansøgning nr. 4937/78 beskriver et plasmid, der indeholder plasmider til anvendelse ved fremstilling af syntetisk somatostatin og humant insulin. Plasmiderne indeholder en kontrolregion i læseramme med DNA-fragmenter, der koder for fusionsproteiner, der kan føre til fremstilling af syntetisk somatostatin og humant insulin. Kontrolregionen er eksemplificeret som lac-operonen, men det er nævnt, at trp-operonen kan anvendes. Det er imidlertid ikke nævnt, at en del af trp-operonen ville kunne anvendes, og det er hverken nævnt eller antydnet, hvorledes en sådan del ville kunne opnås. En nærmere beskrivelse af fremstillingen af det syntetiske somatostatin er anført i *Science*, 198 (1977), side 1056-1063, og fremstillingen af humant insulin er nærmere beskrevet i *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76 (1979), side 106-110. Ingen af de to sidstnævnte referencer nævner eller antyder anvendelsen af trp-operonen eller en del deraf som kontrolregion.

Også Roychoudhury, R., et al. (1976), *Nucleic Acids Research*, 3, 863-877; og Scheller, R.H., et al. (1977), *Science*, 196, 177-180) beskriver, at eukaryotiske DNA-fragmenter kan indsættes i bakterielle plasmider. Det er imidlertid klart, at indførte eukaryotiske promotorsekvenser erkendes dårligt af bakteriecellerne, f.eks. af *Escherichia coli*-RNA-polymerase in vivo. Selv om det er blevet rapporteret, at det har været muligt at komplementere bakteriemutationer ved DNA-fragmenter fra gær, var omfanget af udtrykkelse af det clonede gen således lavt, og der produceredes langsomt voksende bakterier (jfr. f.eks. Carbon, J., et al. (1977), *Recombinant Molecules: Impact on Science and Society*, Raven Press, New York, 355-378).

På tilsvarende måde skete transcriptionen af clonet mitochondrial DNA fra mus i *Escherichia coli* fra den forkerte streng (jfr. f.eks. Brown, W.M., et al. (1976), *Cell*, 7, 517-530).

Strukturen af plasmidvektorerne ifølge den foreliggende opfindelse er baseret på tilvejebringelsen af et indsættelsessted, især et *Hind* III-sted, for et valgt eukaryotisk DNA-fragment, hvilket indsættelsessted ligger ved siden af en bakteriel *trp*-promotor, således at transcriptionen og oversættelsen af DNA-fragmentet reguleres af promotoren. De omhandlede plasmider er almindeligvis også i regionen umiddelbart efter indsættelsesstedet forsynet med genet for tetracyclinresistens, således at man efter indsættelse af det valgte DNA på indsættelsesstedet bekvemt kan bekræfte den af promotoren kontrollerede transcription og oversættelse af det indsatte DNA, eftersom tetracyclinresistensen bevares, når transcriptionen og oversættelsen har fundet sted, og i de fleste tilfælde ødelægges, når transcriptionen og oversættelsen ikke har fundet sted.

En udførelsesform for den foreliggende opfindelse angår et plasmid, som har et indsættelsessted for et eukaryotisk DNA-fragment ved siden af en bakteriel *trp*-promotor og *trpE*-genet eller en del deraf og nedstrøms fra et prokaryotisk ribosombindingssted og en *trp*-initiator-kodon, således at den bakterielle *trp*-promotor regulerer transcriptionen og oversættelsen af et indsat DNA-fragment, hvilket plasmid har karakteristika som anført i et hvilket som helst af de følgende alternativer (A)-(G):

(A) et plasmid med en molekyllængde på 9866 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI; et *Hpa* I-sted 305 bp fra det andet *Hind* III; et andet *Hpa* I-sted 3250 bp fra det første *Hpa* I og 1950 bp fra det første *Hind* III, *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen på 1950 bp mellem det andet *Hpa* I-sted og det første *Hind* III-sted, et gen for tetracyclin-resistens, der følger umiddelbart efter det første *Hind* III-sted og et gen for ampicillin-resistens i delen på 3709 bp mellem *Sal* I- og *Eco* RI-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH3.

(B) et plasmid med en molekyllængde på 9866 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et

- Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI; et *Hpa* I-sted 1950 bp fra det andet *Hind* III-sted; et andet *Hpa* I-sted 3250 bp fra det første *Hpa* I-sted og 305 bp fra det første *Hind* III-sted, *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen
5 på 1950 bp mellem det andet *Hind* III- og det første *Hpa* I-sted, et gen for tetracyclin-resistens, der følger umiddelbart efter det første *Hind* III-sted og et gen for ampicillin-resistens i delen på 3709 bp mellem *Sal* I- og *Eco* RI-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH4.
- 10 (C) et plasmid med en molekyllængde på 6750 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* HI-sted ved 346 bp fra *Hind* III-stedet; et *Sal* I-sted ved 275 bp fra *Bam* HI-stedet; et *Hpa* I-sted ved 4230 bp fra *Sal* I-stedet og 1950 bp fra *Hind* III-stedet; *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen på 1950 bp, der strækker sig mellem *Hpa* I-stedet og *Hind* III-
15 stedet og et gen for ampicillin-resistens i delen på 4800 bp mellem *Hind* III-stedet og *Hpa* I-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH5.
- (D) et plasmid med en molekyllængde på 4874 bp; et *Eco* RI-sted; et *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI-stedet; et *Hpa* I-sted 313 bp fra *Hind* III-stedet; et andet *Hind* III-sted 199 bp fra *Hpa* I; et
20 *Bam* I-sted 346 bp fra det andet *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 752 bp fra *Eco* RI; et gen for tetracyclin-resistens, der strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; et gen for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet, og den clonede del af *trp*-operonen
25 omfatter området mellem promotoren og den første del af *E*-genet i området mellem *Hpa* I-stedet og det andet *Hind* III-sted; hvilket plasmid betegnes pWT101.
- (E) et plasmid med en molekyllængde på 4823 bp; et *Hpa* I-sted; et *Hind* III-sted 199 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et
30 *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045 bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; et gen for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af *trp*-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af

E-genet i området mellem *Hpa* I- og *Hind* III-stedet; hvilket plasmid betegnes pWT111.

(F) et plasmid med en molekyllængde på 4837 bp; et *Hpa* I-sted; et *Hind* III-sted 206 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 353 bp fra *Hind* III; et
5 *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045
bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig
fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; genet for
ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af
trp-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af
10 E-genet mellem *Hpa* I- og *Hind* III-stedet; hvilket plasmid betegnes
pWT121, idet fasningen er ændret 1 bp fra pWT111.

(G) et plasmid med en molekyllængde på 4851 bp; et *Hpa* I-sted; et
Hind III-sted 213 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 360 bp fra *Hind* III; et
Sal I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045
15 bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig
fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; og genet for
ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af
trp-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af
E-genet mellem *Hpa* I-stedet og *Hind* III-stedet, hvilket plasmid
20 betegnes pWT131, idet fasningen er ændret 2 bp fra pWT111..

Et sådant plasmid kan fremstilles ved en fremgangsmåde, der er ejendommeligt ved at man

(a) til fremstilling af det i krav 1 (A) angivne pEH3 digererer en
vildtypestamme af *E. coli* med restriktionsendonuclease *Hind* III,
25 ligerer det således vundne fragment til det lineære molekyle, der fås
ved begrænsning af plasmidet pBR322 med restriktionsendonuclease
Hind III, transformerer *E. coli* W3110 trp^oEV1 med det resulterende
plasmid og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser tetracyclin-
resistens og trp-komplementering, til opnåelse af plasmidet pEH3.

30 (b) til fremstilling af det i krav 1 (B) angivne pEH4 digererer en
vildtypestamme af *E. coli* med restriktionsendonuclease *Hind* III,
ligerer det således vundne fragment til det lineære molekyle, der
vindes ved begrænsning af plasmidet pBR322 med restriktionsendonucle-

ase *Hind* III, transformerer *E. coli* W3110 *trp*^{EV1} med det resulterende plasmid og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser tetracyclin-følsomhed og *trp*-komplementering, til opnåelse af plasmidet pEH4.

5 (c) til fremstilling af det i krav 1 (C) angivne pEH5 begrænser pEH3 med restriktionsendonuclease *Eco* RI, digererer det lineære molekyle med exonuclease III og S1-nuclease, behandler med DNA polymerase I, ligerer det lineære molekyle med DNA ligase, transformerer *E. coli* W3110 *trp*^{EV1} med det resulterende plasmid og selekterer de kolonier,
10 der udviser *trp*-komplementering og ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pEH5.

(d) til fremstilling af det i krav 1 (D) angivne pWT101 begrænser pEH5 med restriktionsendonuclease *Hinf* I til dannelse af et fragment indeholdende den komplette *trp*-promotor og cloner fragmentet ind i
15 *Hind* III-stedet i plasmidet pBR322, idet man behandler *Hinf* I-enderne af fragmentet med DNA polymerase I, behandler fragmentet med *Hind* III-linkere i nærværelse af DNA ligase, behandler det ligerede molekyle med *Hind* III-restriktionsendonuclease til dannelse af et lineært molekyle med *Hind* III-klæbrige ender, ligerer dette lineære molekyle
20 til *Hind* III-stedet i plasmidet pBR322, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT101.

(e) til fremstilling af det i krav 1 (E) angivne pWT111 begrænser
25 pWT101 med restriktionsendonuclease *Eco* RI, digererer det lineære molekyle med exonuclease III og S1-nuclease, behandler med DNA polymerase I, religerer det lineære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet
30 pWT111.

(f) til fremstilling af det i krav 1 (F) angivne pWT121 begrænser pWT111 med restriktionsendonuclease *Hind* III, behandler det lineære molekyle med DNA polymerase I, ligerer med *Hind* III-linker DNA, begrænser med restriktionsendonuclease *Hind* III, religerer det line-

ære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT121.

(g) til fremstilling af pWT131 som angivet i krav 1 (G) begrænser
5 pWT121 med restriktionsendonuclease *Hind* III, behandler det lineære molekyle med DNA polymerase I, ligerer med *Hind* III-linker DNA, begrænser med restriktionsendonuclease *Hind* III, religerer det lineære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB 101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-
10 resistens, til opnåelse af plasmidet pWT131.

Nærmere bestemt kan plasmidet pEH5 fremstilles på følgende måde:

(a) Isolering af *Hind* III *trpE*-fragmentet

Dette fragment kan isoleres enten ved *Hind* III (EC3.1.23.21)-digerering af DNA fra de fleste stammer af *Escherichia coli*, f.eks.
15 *Escherichia coli* stamme W3110, eller ved *Hind* III-digerering af plasmid pRH1/*trpE*. pRH1 er i sig selv fremstillet ved *Eco* RI (EC3.1.4.32)-digerering af *Escherichia coli*-plasmider pDS1118 og pML2, ligation af de således fremstillede fragmenter og selektion for ampicillin- og kanamycinresistens. Ved *Hind* III-digerering af
20 pRH1 og ligation med *Hind* III-digereret DNA fra stamme *Escherichia coli* W3110 og efterfølgende transformation til stamme W3110 *trp* oEV1 og dyrkning i fravær af tryptophan blev vundet pRH1/*trpE*.

(b) Cloning af *Hind* III *trpE*-fragmentet

Det på den ovenfor beskrevne måde vundne *Hind* III *trpE*-fragment blev
25 covalent bundet til et fragment fremstillet ved *Hind* III-restriktion af plasmidet pBR322 (jfr. f.eks. Bolivar, F., et al. (1977), *Gene*, 2, 95-113). Det bundne DNA blev anvendt til transformering af *Escherichia coli* W3110 *trp* oEV1, og kolonier blev udvalgt for ampicillin-resistens og *trp*-komplementering. De vundne plasmider viste sig at
30 være af to typer, afhængig af orienteringen af fragmenterne under

ligationen; disse to plasmider, nemlig de ovenfor beskrevne plasmider pEH3 og pEH4, er vist i henholdsvis fig. 2 og 3. Plasmidet pEH3 blev selekteret på basis af dets tetracyclinresistens og anvendt til næste trin i produktionen af de her omhandlede plasmider. Plasmidet pEH3
5 har som omtalt ovenfor følgende karakteristika:

En molekyllængde på 9866 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III-stedet, et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I-stedet, og et *Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I-stedet; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI-stedet; et *Hpa* I-sted 305 bp fra det andet *Hind* III-stedet; et
10 andet *Hpa* I-sted 3250 bp fra det første *Hpa* I- og 1950 bp fra det første *Hind* III-sted, idet plasmidet har *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i portionen på 1950 bp mellem det andet *Hpa* I-sted og det første *Hind* III-sted; genet for tetracyclinresistens umiddelbart efter det første *Hind* III-sted og genet for ampicillinresistens
15 i portionen på 3709 bp mellem *Sal* I- og *Eco*-RI-stedet.

(c) Sletning af det *Hind* III-sted, der ligger nærmest *Eco* RI-stedet i pEH3

pEH3 digerereres med *Eco* RI til dannelse af lineære molekyler, som digerereres med exonuclease III (EC 3.1.4.27) og derefter med S1 nucle-
20 ase (EC 3.1.4.-) til fjernelse af de 5'-udragende haler og til dannelse af stumpe ender. Derefter liggeres de lineære molekyler med T4-induceret DNA ligase (EC 6.5.1.1), og det således vundne plasmid anvendes til transformering af *trp* oEV1-stamme og selekteres for *trp*-komplementering og ampicillinresistens til opnåelse af plasmidet
25 ifølge opfindelsen, som betegnes pEH5 (vist i fig. 1).

Plasmidet pEH4 har som ovenfor omtalt følgende egenskaber:

En molekyllængde på 9866 bp; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III-stedet, et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I-stedet, et *Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I-stedet; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI-stedet, et
30 *Hpa* I-sted 1950 bp fra det andet *Hind* III-sted, et andet *Hpa* I-sted 3250 bp fra det første *Hpa* I-sted og 305 bp fra det første *Hind* III-sted, hvor plasmidet har *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i portionen på 1950 bp mellem det andet *Hind* III-sted og det første

)*Hpa* I-sted; genet for tetracyclinresistens umiddelbart efter det første *Hind* III-sted og genet for ampicillinresistens i portionen på 3709 bp mellem *Sal* I-stedet og *Eco* RI-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH4. pEH4 kan fremstilles på lignende måde som pEH3 bortset
5 fra, at selektionen udføres på basis af dets tetracyclinsensitivitet.

Som ovenfor nævnt, er det et særligt nyttigt træk ved de her omhandlede plasmider, at de har et klart defineret sted, som er bekvemt for indføringen af et ønsket eukaryotisk DNA-fragment, og at plasmidernes struktur er en sådan, at transcriptionen af det indførte DNA kontrolleres af den *trp*-promotor, som er associeret med det definerede
10 indføeringssted, f.eks. *Hind* III-stedet i plasmidet pEH5 (illustreret i fig. 1). Dette plasmid udgør derfor et værdifuldt slutmellemprodukt, af hvilket der kan fremstilles plasmider, i hvilke der på indsættelsesstedet, f.eks. *Hind* III-stedet, er indsat genetisk information i form af passende modificeret DNA, der er tilpasset til at
15 fremstille et ønsket polypeptidprodukt.

I en anden udførelsesform angår opfindelsen et sådant plasmid, hvori der på indsættelsesstedet er indsat et eukaryotisk DNA-fragment. Det eukaryotiske DNA-fragment kan indsættes i det fremstillede plasmid
20 ved kendte metoder.

Fremgangsmåderne til fremstilling af det ønskede DNA, dets modifikation til indsætning og indsætningsfremgangsmåderne samt de efterfølgende fremgangsmåder til proteinfremstilling er generelt kendte og kan sammenfattes og eksemplificeres på følgende måde:

25 Fortegnelse over figurer

fig. 1 viser plasmid pEH5,

fig. 2 viser plasmid pEH3,

fig. 3 viser plasmid pEH4,

fig. 4 viser plasmid pWT101,

- fig. 5 viser fremstilling af plasmiderne pWT111, pWT121 og pWT131,
- fig. 6 viser pWT121 med indsat syntetisk hønsepestvirus (FPV)-gen (pWT121/FPB),
- fig. 7 viser agarosegel med restriktionsendonucleasestederne fra
5 *Hpa* I, *Hind* III og *Bam* HI i pEH3 og pEH4 og orientering af clonet *trpE*-DNA i disse plasmider,
- fig. 8 viser en 5% acrylamidgel med DNA-fragmenter fra pBR322, pEH3 og pEH4 efter digereret med *Hpa* I, *Bam* HI, *Hind* III og *Sal* I,
- fig. 9 viser overlevelse (%) på medium indeholdende stigende kon-
10 centrationer af tetracyclin for *E. coli* W3110 *trpE*^{V1}-stammer: -Δ- plasmidfrie celler; -□- med pEH4; -○- med pEH3, præinkuberet med tryptophan; -•- med pEH3,
- fig. 10 viser en 1% agarosegel, der viser fjernelse af *Hind* III- og *Hpa*-steder fra pEH3,
- 15 fig. 11 viser fremstilling og karakterisering af pWT101,
- fig. 12 viser ændringer under faseændring fra pWT111 til pWT131,
- fig. 13 viser *Hae* II-restriktionskort af pWT-plasmider,
- fig. 14 viser restriktion af faseændrede pWT-plasmider (111, 121, 131) og pAT153 med *Bam* HI og *Pst* I,
- 20 fig. 15 viser en 3,5% acrylamidgel med *Pst* I- og *Bam* HI-digererede *Nic*⁻-derivater af pWT131, 121 og 111 (b, c, d), pWT131 (a) og pAT153 (e),
- fig. 16 viser 3,5% acrylamidgel med *Hind* III-digereringer af henholdsvis pWT231 (a), 221 (b), 211 (c) og 131 (d),
- 25 fig. 17 viser 3,5% acrylamidgel med *Hae* II-digereringer af henholds-

vis pBR322 (a), pAT153 (b), pWT231 (c), pWT221 (d), pWT211 (e) og pWT131 (f).

(1) Kilde for det DNA, der skal indsættes

- 5 DNA til indsætning kan fås på mange forskellige måder. F.eks. kan oligonucleotider af forskellige længder syntetiseres ved kendte metoder (jfr. f.eks. Hsiung, et al. (1979), *Nucleic Acids Research*, 6, 1371-1385).

10 Mange oligonucleotider kan som følge af deres specifikke baseparingssegenskaber samles til længere dobbeltstrengede molekyler. Dette molekyles oligonucleotidkomponenter kan sammenknyttes (ligeres) ved hjælp af enzymet DNA-ligase.

Alternativt kan DNA-molekyler af ønsket genetisk specificitet syntetiseres ved anvendelse af enzymet "reverse transcriptase", idet der 15 som skabelon anvendes RNA af den ønskede specificitet. RNA'et kan isoleres fra celler ved kendte metoder.

(2) Fremstilling af DNA til indsætning

DNA kan modificeres til indsætning i plasmidet ved mange forskellige metoder. F.eks. kan DNA fremstilles som beskrevet ovenfor på 3'-terminalen på hver af dobbeltstrengene forlænges ved hjælp af enzymet 20 terminaltransferase (EC 2.7.7.31) til opnåelse af en homopolymer enkeltstrenget forlængelse. 3'-Terminalen på det *Hind* III-digererede plasmid kan ligeledes forlænges. Hvis forlængelsen af det fremstillede DNA er $(dA)_n$, og forlængelsen af plasmidet er $(dT)_n$ eller vice versa, eller hvis forlængelsen af det fremstillede DNA er $(dG)_n$ og 25 forlængelsen af plasmidet $(dC)_n$ eller vice versa, kan DNA'et til indsætning og plasmidet hybridiseres ved disse enkeltstrengede forlængelser på en sådan måde, at der dannes cirkulære molekyler, hvor det fremstillede DNA er indsat i plasmidets *Hind* III-sted. Sådanne 30 plasmider kan anvendes til transformering af *Escherichia coli*-celler og kolonier af transformanterne udvalgt ved kendte metoder (jfr. f.eks. Glover, D., *New Techniques in Biophysics og Cell Biology*,

(Eds. Pain, R.H., og Smith, B.J.), 8, 125-145, (Wiley, New York, 1976)). Alternativt kan enderne af det på den ovenfor beskrevne måde fremstillede DNA liggeres med enzymet DNA-ligase til korte dobbeltstrengede DNA-molekyler (*Hind* III-linkere, fås fra Collaborative Research, Waltham, Mass., U.S.A.), der indeholder den sekvens, som genkendes af restriktionsenzymet *Hind* III. Ved digererering af disse molekylere med dette enzym efter liggeringen vil der fås *Hind* III-terminaler ved enderne af det fremstillede DNA. Det fremstillede DNA kan derefter indsættes i plasmidet efter digerereringen med *Hind* III ved kendte metoder.

(3) Fremstilling af peptid

De kendte mekanismer for virkningen af bakteriepromotorer sammen med de ovenfor angivne data førte til den konklusion, at når operatoren er åben, vil transcriptionen fra promotoren forløbe fra *trpE* og *trpD* gennem *Hind* III-stedet og til regioner af genomet på den anden side af *Hind* III-stedet. Oversættelse af transcriptionsproduktet vil give et "read-through" polypeptid knyttet til *D*-genet (medmindre der i indsætningen er inkorporeret et termineringskodon). Det fremstillede polypeptid kan identificeres ved kendte metoder, f.eks. ved at overføre plasmidet til en stamme, som producerer miniceller (jfr. f.eks. Meagher, R.B., (1977), *Cell*, 10, 521-536), hvor polypeptidprodukterne af plasmidgenomer let erkendes, eller ved immunologiske metoder (jfr. f.eks. Broome, S., og Gilbert, W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 2746-2749).

Read through-polypeptidet kan renses ved kendte metoder, og det ønskede polypeptidprodukt kan genereres ved digererering af polypeptidet ved specifikke kemiske eller enzymatiske metoder.

Som nævnt ovenfor kan plasmidet pEH5 ifølge opfindelsen anvendes som kilde for DNA, af hvilket der kan konstrueres en yderligere serie plasmidvektorer, den såkaldte "pWT"-serie. Nærmere bestemt kan plasmidet pEH5 behandles med restriktionsendonuclease *Hinf* I (EC 3.1.23.22) til dannelselse af et fragment på ca. 497 bp indeholdende den komplette *trp*-promotor, ledersekvens og de første 7 aminosyrer af

trpE. Det på denne måde vundne *Hinf* I-fragment kan derefter clones i *Hind* III-stedet i det kendte plasmid pBR322. Denne cloning kan udføres ved behandling af *Hinf* I-enderne i fragmentet med DNA-polymerase I (EC.2.7.7.7) og udsætte de DNA-fyldte *Hinf* I-fragmenter for indvirkning af *Hind* III-linkere i nærværelse af DNA-ligase og *Hind* III-restriktionendonuclease efter hinanden til tilvejebringelse af fragmentet med *Hind* III-"klæbrige ender".

Derefter kan *Hinf* I-fragmentet clones ind i plasmidet pBR322 ved *Hind* III-restriktion af pBR322 og ligation af det restriktionsbehandlede plasmid med *Hinf* I-fragmentet.

Hinf I-fragmentet vil blive indsat i *Hind* III-stedet i pBR322 i én af to orienteringer som beskrevet ovenfor i forbindelse med pEH3 og 4. En af disse, hvor trp-promotoren transcriberes i retning af tet-generne, selekteres ved restriktionsenzym-analyse af individuelle cloner. (Sekvensen af pBR322 er kendt, jfr. f.eks. Sutcliffe, J.G., Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, (1978), XLII, 77-90. Sekvensen af trp-promotor/operatoren er også kendt, jfr. f.eks. Bennett, G.N., et al. (1978), J. Mol. Biol., 121, 113-137, og Lee, F., et al. J. Mol. Biol., (1978), 121, 193-217).

Det resulterende plasmid betegnes her som pWT101, der er beskrevet ovenfor, og hvis struktur er illustreret i fig. 4. På grund af den ovenfor beskrevne fremstilling deraf har plasmidet pWT101 to *Hind* III-steder, et i hver ende af det indsatte *Hinf* I-fragment fra det oprindelige pEH5.

Til sikring af at indsatte DNA vil blive anbragt ved siden af trp-promotoren, er det nødvendigt at slette *Hind* III-stedet opstrøms trp-promotoren, og dette kan udføres som beskrevet ovenfor ved restriktion af plasmidet pWT101 med restriktionsendonuclease *Eco* RI, digereret med exonuclease III og S1, behandling med DNA polymerase I (til at fylde eventuelle asymmetriske ender produceret ved S1 nuclease-digerering) og ligation af de frie ender i plasmidet til dannelse af det ovenfor beskrevne derivat af pWT101, der er betegnet pWT111, som kun har ét *Hind* III-sted og det nedstrøms trp-promotoren.

Plasmidet pWT111 ifølge opfindelsen er således beregnet til at modtage indsat DNA på *Hind* III-stedet, hvilket resulterer i, at DNA'et er under direkte indflydelse af *trp*-promotoren. Transcription af det indsatte DNA kan let bekræftes, da plasmidet nedstrøms det indsatte fragment indeholder genet for tetracyclinresistens, således at transcriptionen gennem det indsatte DNA forløber videre gennem *tet-r*-genet, der producerer tetracyclinresistens, som ikke produceres, hvis der ikke sker transcription gennem det indsatte DNA.

Afhængigt af arten af det DNA-fragment, som ønskes indsat, er det nødvendigt at sikre korrekt orientering i plasmidet tilpasset fasningen af det DNA, der skal indsættes. Dobbeltstrenget cDNA fremstillet ved omvendt transcription fra mRNA indeholder således, hvis det er komplet, normalt en længde nucleotider som lederregion før proteinsekvensen. Af denne grund bliver oversættelse af proteinet som en del af et sammensmeltet polypeptid i et plasmid såsom pWT111 (clonet ind ved *Hind* III-stedet) afhængig af antallet af nucleotider i lederen, dvs. ufuldstændig omvendt transcription kan reducere ledersekvensen og således ændre læserammen. Af denne grund vil det være essentielt, at expressionsplasmider konstrueres, så at de er i stand til at oversætte for alle tre læserammer.

Plasmid pWT111 tillader oversættelse af DNA indsat på *Hind* III-stedet som et sammensmeltet polypeptid i kun én læseramme (hvis det indsatte DNA har sit eget funktionelle ribosom bindested, gælder dette ikke). Oversættelsen starter med de første 7 aminosyrer af *trpE* efterfulgt af 2 aminosyrer fra *Hind* III-linker DNA og vil derefter forløbe ind i den indsatte sekvens. Hvis der ikke var nogen stopkodoner til stede i denne sekvens, ville oversættelsen slutte ved den første stopkodon i tetracyclinregionen.

Nucleotidsekvensen over *Hind* III-stedet i pBR322 viser, at den første stopkodon for pWT111 er 26 nucleotider nedstrøms fra *Hind* III-stedet.

Til ændring af fasningen fra *Hind* III-stedet i pWT111 kan plasmidet, som beskrevet ovenfor, underkastes restriktionsbehandling med *Hind* III, 5'-forlængelserne fyldes med DNA-polymerase I, og *Hind* III-linker DNA-ligeres. Restriktion med *Hind* III til fjernelse af over-

skud af linkere og tilvejebringelse af "klæbrige ender" og religation gav "pWT121". Denne procedure tilføjer 14 bp DNA og ændrer læserammen fra det nye *Hind* III-sted (det gamle sted er nu ukomplet) med plus ét nucleotid.

- 5 Den tredje læseramme, dvs. pWT111 plus to nucleotider, bliver som omtalt ovenfor opnået ved at gentage samme serie af reaktioner på pWT121, og det resulterende plasmid betegnes "pWT131".

Strukturen af plasmiderne pWT111, pWT121 og pWT131 fremgår af fig. 5.

- 10 Sekvenserne omkring *Hind* III-stedet i pWT111, pWT121 og pWT131 er som følger:

pWT111

Hind III-sted

5' ATG,CAA,ACA,CAA,AAA,CCG,ACT,CCA,AGC,TTT,AAT,CCG,-GT...3'

pWT121

Hind III-sted

- 15 5' ATG,CAA,ACA,CAA,AAA,CCG,ACT,CCA,AGC,TCC,AAG,CTT,-
GGA,GCT,TTA,ATG,C...3'

pWT131

Hind III-sted

- 20 5' ...AAA,CCG,ACT,CCA,AGC,TCC,AAG,CTG,CAA,GCT,TGG,AGC,-
TTG,GAG,CTT,TAA,TG...3'

For oversigtens skyld viser de ovenstående sekvenser kun én streng af DNA'et.

- 25 Som illustration kan effektiviteten af plasmiderne pWT111, pWT121 og pWT131 som vektorer for indsatte DNA ses af de resultater, der fås ved, at der i pWT121, det plasmid, der i dette tilfælde har den korrekte fase, indsættes et syntetisk hønsepestvirus (FPV-gen) (jfr.

f.eks. britisk patentansøgning nr. 80 10777 og J.S. Emtage et al. (1980), Nature, 283, 171-174).

Det ovennævnte syntetiske FPV-gen kan clones i pWT121 på følgende måde:

5 Plasmidet pWT121 underkastes restriktionsbehandlingen med *Hind* III og behandles med alkalisk phosphatase (EC 3.1.3.1) til fjernelse af 5'-phosphatgrupperne. *Hind* III-linkere liggeres til enderne af det syntetiske FPV-gen, som derefter behandles med *Hind* III-restriktionsendonuclease til dannelse af *Hind* III-klæbrige ender. Det således behand-

10 lede syntetiske FPV-gen og det *Hind* III-restriktionsbehandlede pWT121 liggeres derefter til dannelse af plasmidet pWT121/FPV. Alternativt kan det syntetiske FPV-gen clones i plasmidet pBR322 og derefter overføres til pWT121 på kendt måde.

Den generelle struktur af plasmidet pWT121/FPV fremgår af fig. 6.

15 Strukturen kan yderligere defineres som følger:

En molekyllængde på 6532 bp; et *Hind* III-sted; et *Sma* I-sted 365 bp fra *Hind* III-stedet; et *Eco* RI-sted 910 bp fra *Sma* I-stedet; et andet *Hind* III-sted 460 bp fra *Eco* RI-stedet; et *Bam* HI-sted 353 bp fra det andet *Hind* III-sted; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* HI-stedet; et *Pst*

20 I-sted 2958 bp fra *Sal* I-stedet; et *Hpa* I-sted 1045 bp fra *Pst* I-stedet og 206 bp fra det første *Hind* III-sted; det syntetiske FPV-gen i delen på 1735 bp mellem det første og det andet *Hind* III-sted; genet for tetracyclinresistens strækkende sig fra det andet *Hind* III-sted til på den anden side af *Bam* HI-stedet og genet for ampicillinresistens i området for *Pst* I-stedet.

25

Afhængigt af orienteringen af FPV-genet findes plasmidet at være tetracyclinresistent (som illustreret i fig. 6) eller tetracyclinfølsomt med FPV-genet i omvendt orientering.

30 Transformerede *Escherichia coli*-kolonier indeholdende pWT121/FPV-plasmiderne med hæmagglutinin(HA)-genet i hver orientering screenes for FPV-HA-antigen. Det viser sig, at tetracyclinresistente kolonier udtrykker et FPV-HA-antigen, hvilket bekræfter korrekt indsætning af

det syntetiske FPV-gen. De kolonier, i hvilke FPV-genet er orienteret som vist i fig. 6, viser tetracyclinresistens, og de kolonier, der har omvendt orientering, er tetracyclinfølsomme. I førstnævnte tilfælde er udtrykkelsen af HA-antigenet under trp-kontrol.

- 5 FPV-HA-antigenudtrykkelse kan bekræftes på følgende måde:

Escherichia coli-kolonier indeholdende det ovenfor beskrevne tetracyclinresistente pWT121/FPV-plasmid screenes for FPV-HA-antigen under anvendelse af en fast-fase-immunologisk metode (jfr. f.eks. S. Broome og W. Gilbert (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 2746-2749).

- 10 Kort fortalt dyrker man små kulturer af individuelle kolonier, som høstes og lyseres under anvendelse af lysozym og "Triton" X-100 (Triton er et varemærke). ("Triton X-100" er isooctylphenoxypolyethoxyethanol, et ikke-ionisk detergent).

- 15 Tilstedeværende HA-sekvenser bindes til et polystyrenrør, der er overtrukket med FPV-HA-specifikt IgG. Bundet antigen mærkes derefter specifikt med ^{125}I -IgG med høj specifik aktivitet.

Immunreaktiviteten påvises i alle kolonier indeholdende et FPV-HA-gen indsat; de kolonier, der kun indeholder det tilgrundliggende pWT121-plasmid, viser ikke nogen aktivitet (jfr. den nedenstående tabel):

20

Radioimmunoassay af FPV-HA i lysater af bakterier indeholdende pWT121/FPV-plasmider

		HA-indhold		
25	Koloni nr.	(ng/50 μ l)	Phenotype	Indsætning
	2	>20	Tc ^r	A
	5	0	Tc ^r	-
	6	>20	Tc ^r	A
	8	0	Tc ^r	-
30	11	>20	Tc ^r	A
	13	0	Tc ^r	-
	14	0	Tc ^r	-

15	>20	Tc ^r	A
16	>20	Tc ^r	A

Som anført ovenfor påvises der immunreaktivitet i alle kolonier indeholdende et indsat FPV-HA-gen (A); de kolonier, som kun indeholder det tilgrundliggende pWT121-plasmid, viser ingen aktivitet.

I tilfælde af den såkaldte pWT-serie af udtrykkelsesplasmider er der ligesom med pBR322 den mulighed, at disse normalt mobiliseringsminus-plasmider (mob^-) under passende betingelser kan mobiliseres (dvs. overføres fra en bakterie til en anden). Det er for nylig blevet vist (jfr. f.eks. A.J. Twigg og D.J. Sherratt (1980), Nature 283, 216-218), at selv om DNA, der koder for Col E1-mobilitetsprotein eller -proteiner, ikke er til stede i pBR322, kan dette protein alligevel inducere mobilitet ved transkomplementeringen, når det er til stede i samme celle på et kompatibelt plasmid, såsom Col K.

Stedet for bindingen til mobilitetsproteinets eller mobilitetsproteinernes plasmid DNA er blevet vist at være det såkaldte "nic-sted" eller "overføringsudgangssted", (jfr. f.eks. G.J. Warren, et al. (1978), Nature, 274, 259-261). Dette sted sidder f.eks. i pBR322 i 622 bp *Hae* IIB-fragmentet. Mutationer i mobilitetsgenet er mob^- . De kan imidlertid komplementeres med mob^+ Col E1-derivater eller relaterede plasmider, hvilket antyder et trans-virkende protein.

Plasmider af Col E1-typen er ikke-konjugative, men mobiliseres, når der i cellen indføres en kønsfaktor, f.eks. en F'- eller R-faktor. Mobiliseringen af et nic^+ -, men mob^- -plasmid såsom pBR322 kræver derfor tilstedeværelsen af to andre plasmider, nemlig en kønsfaktor og et kompatibelt mob^+ -plasmid af Col E1-type.

Nic-stedet er specifikt nødvendigt for mobiliseringen, og plasmider, som ikke har dette sted, kan ikke komplementeres.

Selv om således pBR322 og plasmiderne af pWT-serien ikke indeholder alle mobilitetsgenerne, indeholder de alle nic-stedet og kan derfor

komplementeres for mobilitet. Til fremstilling af sikrere, ikke-mobile vektorer er det ønskeligt at fjerne *nic*-stedet. Dette kan f.eks. ske ved at slette et *Hae* II-fragment.

Nic-stedet kan fjernes fra plasmiderne pWT111, pWT121 og pWT131 på
5 følgende måde:

En betragtning af *Hae* II-restriktionskortene i de ovennævnte plasmider viser, at kun to fragmenter (B og H) kan fjernes og stadig efterlade ampicillin- og tetracyclin-generne, *trp*-promotoren og replikationsudgangsstedet. Der henvises i denne sammenhæng til fig.
10 13. Fragment B er 622 bp, og fragment H er 83 bp. *Nic*⁻-plasmider (minus B og H) mangler derfor 705 bp. Dette må naturligvis tages i betragtning ved karakteriseringen af *nic*⁻-derivaterne af de ovennævnte plasmider. Således er f.eks. i pWT111 (*nic*⁻) *Pst* I-stedet 2253 bp fra *Sal* I-stedet.

15 *Nic*⁻-derivaterne af pWT111, pWT121 og pWT131 betegnes henholdsvis pWT211, pWT221 og pWT231.

Det første trin i dette eksempel på en fjernelsesprocedure er partielt at digere plasmidet, således at hvert molekyle gennemsnitligt spaltes to eller tre gange. Digereringsprodukterne religeres derpå
20 under anvendelse af T₄ DNA-ligase, og det ligerede DNA transformeres til *Escherichia coli* K12, f.eks. HB101. Transformanter selekteres på ampicillin og tetracyclin under anvendelse af minimale agarplader til inducering af *trp*-transcription og sikring af tetracyclinresistens.

De resulterende kolonier vil indeholde de igen ringsluttede udgangs-
25 plasmider samt eksempler, der mangler et af eller begge *Hae* II-fragmenterne. De sidstnævnte kan identificeres ved screening af enkeltkolonier og observation for plasmider, som er mindre end udgangsplasmidet. Potentielle *nic*⁻-derivater kan bekræftes ved restriktions-
enzymanalyse af rensset plasmid DNA.

30 I stedet for at anvende den ovenfor som et illustrerende eksempel angivne fremgangsmåde omfattende partielle restriktioner, der nødvendiggør screeningen af måske hundredevis af kolonier, er det al-

mindeligvis mere bekvemt at konstruere *nic*⁻-derivaterne på den måde, som fremgår af fig. 14.

Kort fortalt underkastes pWT-plasmiderne restriktionsbehandling med *Pst* I og *Bam* HI, og bånd, der indeholder *trp* p/o-regionen, isoleres
 5 fra polyacrylamidgeler. Plasmid pAT153 (*nic*⁻) underkastes restriktionsbehandling med *Pst* I og *Bam* HI, og båndet på 2531 bp isoleres fra en polyacrylamidgel. De førstnævnte bånd ligeres individuelt med det sidstnævnte bånd under anvendelse af T₄ DNA-ligase, og det lige-
 10 rede materiale anvendes til transformation af *Escherichia coli* HB 101. DNA fra enkeltkolonier kan isoleres og dets struktur bekræftes ved restriktionszymanalyse, f.eks. *Hae* II-digereringsprodukter af pAT153, pWT-serien og pWT (*nic*⁻)-serien.

Nic⁻-derivaterne kan med andre ord konstrueres ved substitution af den region i pWT-plasmiderne, som grænser op til *Pst* I- og *Bam* HI-
 15 stederne indeholdende replikationsudgangsstedet og *nic*-stedet med den tilsvarende region fra pAT153, som er et sletningsderivat af pBR322 og mangler 622 bp *Hae* IIB-fragmentet og det nabostillede 83 bp *Hae* IIH-fragment.

Opfindelsen belyses nærmere ved følgende detaljerede eksempler:

20 Fremstilling af pEH3, pEH4 og pEH5:

Kulturer af *Escherichia coli*, stamme K12 HB101 (jfr. f.eks. Boyer, H., et al, (1969), *J. Mol. Biol.*, 41, 459-472) indeholdende plasmidet pBR322 dyrkes enten i L-bouillon eller i M9-salte, glucose, casamino-
 25 syrer medium (jfr. f.eks. Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, Appendix 1, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., (1972), 431-435). Ved en A₆₀₀ på 0,6 sættes der chloramphenicol til plasmidkulturerne til en slutkoncentration på 150 µg/ml, og inkuberingen fortsættes i 16 timer ved 37°C. DNA isoleres fra cellelysater ved centrifugering i CsCl/ethidumbromid-gradienter (jfr. f.eks. Katz,
 30 L., et al, (1975), *J. Bacteriol.*, 114, 577-591; og Wensink, P.C., et al, (1974), *Cell*, 3, 315-325). DNA-bånd fjernes ved sidepunktur med en 1 ml sprøjte og en 16 G nål under belysning fra 366 nm UV-lys, og

ethidiumbromid fjernes ved passage gennem "Dowex AG50" (Dowex er varemærke) (sur kationbytterharpiks).

Alle DNA-opløsninger dialyseres mod TE-puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH-værdi 7,5) til fjernelse af overskud af CsCl, koncentrerer ved
5 ethanoludfældning og opbevares ved -70°C . Den vundne DNA-blanding digererer med *Hind* III på følgende måde:

2 μg pBR322 inkuberes med 5 enheder *Hind* III i en puffer indeholdende 50 mM Tris-HCl pH-værdi 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 5mM β -mercapto-ethanol og 2mM dithiothreitol. Inkuberingen foretages ved 37°C i 90
10 minutter i et rumfang på 40 μl . Reaktionen afsluttes derefter ved 5 minutters inkubation ved 65°C .

Isolering af *Hind* III trp-E-fragmentet:

20 μg pRH1/trpE grænsedigerer med *Hind* III og underkastes elektrophorese på 1% agarosegeler, og båndet indeholdende lineært trpE
15 fjernes. trpE-Fragmentet fjernes fra gelskiven ved elektrophorese over i en dialysepose og efterfølgende phenolekstraktion og ethanoludfældning.

Ligation

Ligaseinkubationerne indeholder 0,2 μg af trpE-fragmentet, 0,4 μg af
20 *Hind* III-restriktionsbehandlet pBR322 og 0,1 enhed T_4 -polynucleotidligase pr. 20 μl reaktionspuffer. Reaktionsblandingen inkuberes i 4 timer ved 16°C .

Transformation

0,01 μg af det ligerede DNA anvendes til transformering af *Escheri-*
25 *chia coli* W3110 trp-o-E ∇ 1-stamme.

Der udvælges ampicillin-resistente recombinanter, der er i stand til at komplementere disse $trpE^-$ -celler. Pr. μg plasmid DNA fås $1,2 \times 10^4$ amp-r-kolonier, der kan gro i fravær af tryptophan.

5 50 af disse kolonier udvælges tilfældigt og overføres ved hjælp af tandstikker på minimale agarplader (jvf. f.eks. Miller, J.H., *loc. cit.*), der indeholder $100 \mu\text{g/ml}$ ampicillin og $12,5 \mu\text{g/ml}$ tetracyclin.

31 af de 50 kolonier voksede efter inkubation natten over, hvilket angiver tilstedeværelse af et tetracyclin-resistent protein i denne population.

10 Plasmid-DNA isoleres fra repræsentative kolonier af de tetracyclin-følsomme og -resistente grupper, og *Hind* III-fragmentmønstrene analyseres ved gelelectrophorese på 1% agarosegeler. Plasmid-DNA fra alle de ampicillin-resistente, trp^+ -cloner indeholder moder-pBR322 DNA med Mr $2,8 \times 10^6$ (4,361 kb) og *E. coli* *Hind* III *trpE*-fragmentet med Mr $3,5$
15 $\times 10^6$ (5,350 kb). De resulterende plasmider underkastes følgende yderligere procedurer til bekræftelse af deres struktur.

Orientering af *trpE*-fragmentet

En konsekvens af religatering af *Hind* III digereringer af pBR322 med *trpE*-fragmentet er, at *trpE*-fragmentet kan indsættes i én af to
20 forskellige orienteringer. Transcription fra *trp*-promoteren kan forløbe enten gennem plasmidets tet-gen eller bort fra tet-genet. Orienteringen af det tet-resistente plasmid (pEH3) og det tet-følsomme plasmid (pEH4) bestemmes (jvf. f.eks. Bennett, M. E., et al. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2351 - 2355) i lyset af
25 eksisterende *Hpa* I-steder i *trpE*-fragmentet og *Bam* HI-steder i pBR322 (jvf. f.eks. Bolivar, F., et al., *loc. cit.*). Fig. 7 viser resultaterne af begrænset digerering af plasmiderne pBR322, pEH3 og pEH4 med enten *Hind* III, *Hpa* I (EC 3.1.23.23), *Bam* HI (EC 3.1.23.6) eller en kombination af disse enzymer.

30 Fig. 7 viser en agarosegel med restriktionsendonucleasestederne for

Hpa I, *Hind* III og *Bam* HI i pEH3 og pEH4 og orienteringen af det clonede *trpE*-DNA i disse plasmider.

Sporene a til j indeholder følgende DNA med størrelser i kilobasepar (kb):

- 5 a) PM2 DNA digereret med *Hind* III som størrelsesmarkører. Synlige bånd er 1 til 6 af størrelse henholdsvis 5,4, 2,35, 1,05, 0,475, 0,45 og 0,27 kb.
- j) λ c.I857,S7 DNA digereret med *Hind* III som størrelsesmarkør. Synlige bånd er A til G af størrelse henholdsvis 21,79, 9,38, 6,30, 4,20, 2,38, 2,11 og 0,47 kb.
- 10 b) Super-coiled pBR322 DNA.
- c) pBR322 inkuberet med *Hpa* I.
- d) pEH3 digereret med *Hind* III.
- e) pEH3 digereret med *Hind* III og *Hpa* I. Båndene måler 4,3, 3,25, 15 1,95 og 0,30 kb.
- f) pBR322 digereret med *Bam* HI.
- g) pEH3 digereret med *Bam* HI.
- h) pEH4 digereret med *Bam* HI og *Hpa* I. De komplette digereringsfragmenter måler 5,7, 3,25 og 0,67 kb.
- 20 i) pEH3 digereret med *Bam* HI og *Hpa* I. De komplette digereringsfragmenter måler 4,3, 3,25 og 2,4 kb.)

Der er ingen *Hpa* I-steder i pBR322 (jfr. banerne b og c) og ingen *Bam* HI-steder i *trpE* (jfr. banerne f og g). Både pEH3 og pEH4 giver lineære pBR322- og *trpE*-fragmenter, når de begrænses med *Hind* III alene (bane d). Dobbelt digereringer af pEH3 og pEH4 med *Hind* III og *Hpa* I giver også identiske profiler (bane e). I dette tilfælde regenereres lineær pBR322 (4,360 kb) sammen med tre andre fragmenter på

3250, 1950 og 305 bp. Eftersom pBR322 ikke har nogen *Hpa* I-mål (jvf. f.eks. Bolivar, F., et al., *loc. cit.*), må det konkluderes, at der er to *Hpa* I-mål i *trpE*-fragmentet. Det ene er allerede rapporteret og ligger i promotor-området (jvf. f.eks. Bennett, M. E., et al., *loc. cit.*), det andet sted ligger ca. 300 bp fra et af *Hind* III-stederne.

Der anvendes dobbeltdigereringer med *Bam* HI og *Hpa* I til bestemmelse af *trpE*-fragmentets orientering og positionen for det andet *Hpa* I-sted. De resulterende fragmenter er vist i bane h for pEH4 og i bane i for pEH3. Det er klart, at disse plasmider indeholder *trpE*-fragmenter i forskellige orienteringer. Størrelsen af det mindste fragment afledt af pEH4 vurderes lettere ud fra de resultater, der er vist i fig. 8 på tegningen. Fig. 8 viser de små fragmenter, der stammer fra restriktionsdigereringer af pEH3, pEH4 og pBR322 med *Sal* I (EC 3.1.23.27), *Bam* HI, *Hpa* I, *Eco* RI og *Hind* III.

(Fig. 8 viser en 5% acrylamidgel med DNA-fragmenter af lav molekylvægt fra pBR322, pEH3 og pEH4 efter digerering med *Hpa* I, *Bam* HI, *Hind* III og *Sal* I restriktionsendonuclease. Sporene a til i indeholder følgende DNA med størrelser i basepar (bp):

a, i) PM2 DNA digereret med *Hind* III som størrelsesmarkør. Størrelsen af båndene 1 til 7 er henholdsvis 5400, 2350, 1050, 475, 450, 270 og 110 bp.

b) pEH3 digereret med *Bam* HI og *Hpa* I.

c) pEH4 digereret med *Bam* HI og *Hpa* I. Det mindste bånd vurderes til 640 bp.

d) pEH3 digereret med *Hind* III og *Hpa* I. Det mindste bånd vurderes til 295 bp.

e) pBR322 digereret med *Bam* HI og *Sal* I. Det mindste bånd vurderes til 275 bp.

f) pBR322 digereret med *Hind* III og *Sal* I. Det mindste bånd vurderes til 620 bp.

g) pBR322 digereret med *Bam* HI og *Hind* III. Det mindste bånd vurderes til 350 bp.

h) pBR322 digereret med *Eco* RI og *Hind* III. Det mindste bånd vurderes til 25 bp.)

- 5 Ud fra de ovennævnte resultater er restriktionskortene for pEH3 og pEH4 konstrueret, som vist i fig. 2 og fig. 3. At det andet *Hpa* I-sted ligger "opstrøms" i forhold til *trp*-promotoren, er baseret på kendt størrelse af *trpE*-proteinet, anthranilat synthetase og det *trpD*-fragment, der er indeholdt i *Hind* III *trpE*-fragmentet. An-
- 10 thranilat-synthetase er et protein på 60.000 Daltons (jvf. f.eks. Ito, J., et al., (1969), *J. Bacteriol.*, 97, 725 - 733) (ca. 500 aminosyrer), medens kun ca. 1/6 af *trpD*-proteingenet (svarende til 275 bp) er specificeret af dette *Hind* III-fragment (jvf. f.eks. Hopkins, A.S., et al., (1976), *J. Mol. Biol.*, 107, 549 - 569). Der kræves
- 15 således en DNA-længde på ca. 1800 bp til specifikation af disse polypeptider. Der er desuden 162 baser i ledersekvensen ved 5'-enden af *trp* mRNA og yderligere 11 baser fra begyndelsen af *trp* mRNA til *Hpa* I-målet i *trp*-promotoren (jvf. f.eks. Lee, F., et al., (1978), *J. Mol. Biol.*, 121, 193 - 217). Denne samlede størrelse på 1948 bp
- 20 mellem *Hpa* I og *Hind* III er i overensstemmelse med *Hpa* I -*Hind* III-afstanden på 1950 bp, der er bestemt ved gelanalyser, og stemmer overens med den konklusion, at det andet *Hpa*-sted ligger "opstrøms" i forhold til *trp*-promotoren.

Regulering af tetracyclin-følsomhed fra *trp*-promotoren

- 25 Ved at anbringe det lille *Hpa* I-*Hind* III-fragment "opstrøms" i forhold til *trp*-promotoren angives utvetydigt, at transcription fra *trp*-promotoren i den tetracyclin-resistente gruppe af plasmider (pEH3) styres mod tetracyclingenet, medens det modsatte gælder det tetracyclin-følsomme plasmid (pEH4). På grundlag heraf må det forventes, at
- 30 udtrykkelse af tetracyclingenet i pEH3 reguleres fra *trp*-promotoren, og at enhver indsættelse i *Hind* III-stedet hos pBR322 ødelægger tetracyclinpromotoren.

5 Dette er blevet testet ved undersøgelse af tetracyclin-resistensen hos pEH3-indeholdende *E. coli* dyrket i nærværelse og fravær af tryptophan, bl.a. under betingelser, hvor trp-generne enten burde undertrykkes eller af-undertrykkes. Plasmid pEH3 i stammen W3110 trp^o E ∇ 1
10 dyrkes på et medium indeholdende M9-salte, glucose, casaminsyrer og 5 μ g/ml tetracyclin. Ved et A₆₀₀ på 0,05 deles kulturen, og 200 μ g/ml tryptophan sættes til den ene halvdel. Efter inkubation i yderligere 1 time fortyndes cellerne og udsås på agarplader indeholdende stigende koncentrationer af tetracyclin. De celler, der dyrkes i 1 time på
15 200 μ g/ml tryptophan, dyrkes på minimale agarplader suppleret med tryptophan.

Resultaterne af disse forsøgsrækker er vist i fig. 9.

(Fig. 9 viser effektiviteten af at udså trp^o E ∇ 1-stammen og dens derivater på stigende koncentrationer af tetracyclin. Kulturer af trp
15 o E ∇ 1-stammen indeholdende de angivne plasmider dyrkes i nærmere bestemte medier og behandles som beskrevet nedenfor. Overlevelsesprocenten bestemmes i forhold til den pågældende plade, der ikke indeholder tetracyclin. Der anvendes plader med 80 - 400 kolonier til bestemmelse af overlevelsesprocenten. Følgende tetracyclinkoncentrationer, der er i stand til at dræbe 50% af celler, bestemt ved koloni-assay (EOP 50%), måles ud fra figuren: 12 μ g/ml for plasmid-frie celler; 4,5 μ g/ml for pEH4-holdige celler; 23 μ g/ml for pEH3-holdige celler, der er præ-inkuberet med 200 μ g/ml tryptophan; 56 μ g/ml for pEH3-holdige celler, der dyrkes uden tryptophan).

25 Tilstedeværelsen af tryptophan i mediet forårsager en 2,5-dobbelt stigning i tetracyclin-resistensen forårsaget af pEH3. Lignende forsøg med pEH4 og plasmid-fri W3110 trp^o E ∇ 1 (hvor det første initialvækstmedium ikke indeholder tetracyclin) viser, at disse bakterier er følsomme over for meget lave koncentrationer af tetracyclin.

30 Det *Hind* III-sted, der er nabostillet til *Eco* RI af pEH3, fjernes på følgende måde til fremstilling af plasmid pEH5:

20 μg pEH3 fremstillet som beskrevet ovenfor digereret med *Eco* RI, gelfiltreres på "Sephadex[®] G-50" (perleformet tværbundet dextransgel) i 50 mM natriumchlorid med 0,1% v/w SDS, og det udelukkede DNA-maksimum koncentreret ved hjælp af ethanoludfældning og opløses i vand.

5 Det lineære *Eco* RI-digererede pEH3 digereret med exonuclease III ved 20°C. Blandingen indeholder 10 μg lineært plasmid, 60 mM Tris med pH-værdi 8, 0,66 mM magnesiumchlorid, 4mM dithiothreitol og 40 enheder exonuclease III i et totalvolumen på 200 μl . 100 μl aliquoter (5 μg) fjernes efter 5 og 10 minutter, ekstraheres med phenol og chloroform og fældes med ethanol.

5 μg exonuclease III-behandlet plasmid behandles med S1-nuclease i 15 minutter ved 30°C i et volumen på 100 μl , hvorved der fås stumpe ender. Reaktionsblandingen indeholder 150 mM natriumchlorid, 25 mM natriumacetat med pH-værdi 4,6, 0,1 mM zinksulfat, DNA og 2,5 enheder S1-nuclease. Efter inkubation ekstraheres blandingen med phenol og chloroform og fældes derefter med ethanol. 3 μg S1-digereret DNA liggeres i et slutvolumen på 10 μl med 1 μl T₄ DNA-ligase (0,8 enheder) ved 15°C i 16 timer og dernæst ved 4°C i 24 timer.

(Fig. 10 viser en 1% agarosegel, der viser fjernelse af *Hind* III- og *Hpa* I-steder fra pEH3.

Sporene a til i indeholder følgende DNA med størrelser i kilobasepar (kb):

a, i) λ cI857,S7 digereret med *Hind* III som størrelsesmarkør. Synlige bånd i agarose er A til F af størrelsen henholdsvis 21,79, 9,38, 6,30 og 4,20 kb;

b) pEH3 digereret med *Hind* III;

c) pEH3 digereret med *Sal* I;

d) forenede kolonier digereret med *Hind* III;

e) pEH5 digereret med *Hind* III;

f) pEH505 digereret med *Hind* III (pEH505 er et laboratorieplasmid i familie med plasmidet pEH5);

g) pEH5 digereret med *Hpa* I;

Fremstilling af plasmider af pWT-serien

5 Bakterier og plasmider

De anvendte bakteriestammer er begge *Escherichia coli* K12-derivater; HB101 F^- *pro leu thi lac Y str^r rk⁻ mk⁻ Endo 1⁻ rec A⁻* & ED8689 *trpR⁻ rk⁻ mk⁺*.

Medier og transformation

10 Kulturer dyrkes i M9-salte, glucose, casaminosyrermedium (jvf. f.eks. Miller, J. H., *loc. cit.*) til plasmid-DNA-præparationer og tetracyclin-følsomhedstestning. Til plasmid-holdige stammer sættes antibiotika i passende koncentration. Celler til brug ved transformation dyrkes i L-medium.

15 Under hele tetracyclin-følsomhedstesten udplades celler på M9, glucose, casaminosyrer-minimum agar, der er suppleret med 0 til 80 $\mu\text{g/ml}$ tetracyclin, 20 $\mu\text{g/ml}$ 3 β -indolacrylsyre eller 100 $\mu\text{g/ml}$ tryptophan, hvor det er angivet.

20 Glovers (*loc. cit.*) transformationsprotokol følges. Cellerne udplantes enten på næringsagar nr. 2 suppleret med 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin eller på M9, glucose, casaminosyrer-minimum agar 2 suppleret med 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin eller 10 $\mu\text{g/ml}$ tetracyclin.

Fremstilling af plasmid DNA

Plasmid DNA fremstilles enten som beskrevet ovenfor for pEH5 eller ved phenol/chloroform-ekstraktioner af klarede lysater efterfulgt af isopropanolfældning af DNA og endelig gensuspension i TE-puffer (10 mM Tris-HCl, pH-værdi 7,5, 1 mM EDTA).

5 Enzymreaktioner

Restriktions-endonuclease-digereringer:

DNA-restriktions-digereringer udføres i et enten højt eller lavt saltpuffer-system ved 37°C i 2 timer, idet reaktionsvolumenet varierer fra 10 til 200 µl og mængden af tilsat enzym fra 1 til 20 enheder pr. µg plasmid DNA. *Bam* HI-, *Eco* RI-, *Hha* I- (EC 3.1.23.19), *Hind* III- og *Pst* I- (EC 3,1,23.31) digereringer udføres i 10 mM Tris-HCl med pH-værdi 7,5, 10 mM magnesiumchlorid, 50 mM natriumchlorid, 1 mM dithiothreitol og 100 µg/ml gelatine. Hvad angår *Hpa* I-digereringer, afviger reaktionsblandingen kun derved, at 50 mM natriumchlorid erstattes af 5 mM natriumchlorid. *Hinf* I virker lige godt i begge reaktionsblandinger.

Hvor plasmid DNA, der ikke er fremstillet ved cæsiumchlorid/ethidiumbromidmetoden, digerereres, indeholder reaktionsblandingen også ribonuclease af typen I-A (varmebehandlet i 10 minutter ved 95°C til fjernelse af eventuel DNA-aseaktivitet) ved 50 µg/ml til fjernelse af RNA, der udfælder sammen med DNA ved rensning.

Alle reaktioner afsluttes med opvarmning til 65°C i 5 minutter.

Ligation

Ligationer med sammenhængende ender udføres ved volumener på fra 10 til 20 µl i 50 mM Tris-HCl ved pH-værdi 7,8, 10 mM magnesiumchlorid, 20 mM dithiothreitol, 1 mM ATP under anvendelse af 0,01 - 0,02 enheder ligase for 0,5 - 3µg DNA. Reaktionerne inkuberes natten over ved 15°C. Til ligationer med stumpe ender anvendes samme reaktions-

blanding, men ligasen øges til fra 0,2 til 0,6 enheder for 1 - 3 μ g DNA og inkubationstemperaturen hæves til 25°C.

DNA-polymerase I-opfyldning af 5'-forlængelser:

0,5 - 3,5 μ g DNA polymerasefyldes i 50 mM Tris-HCl ved pH-værdi 7,8,
5 10 mM magnesiumchlorid, 1mM β -mercaptoethanol, 0,1 mM af hver af
dATP, dCTP, dGTP og dTTP i et volumen på 50 μ l under anvendelse af
0,25 - 1,5 enheder polymerase. Blandingen inkuberes i 10 minutter ved
10°C, hvorefter en aliquot kan anvendes direkte til ligation med
stumpe ender, eller det hele phenol/chloroformen ekstraheres, hvor-
10 efter der udfældes med ethanol.

Polynucleotidkinasering af *Hind* III-linker-DNA

2,5 μ g decamer *Hind* III-linker kinaseres i 60 minutter ved 37°C med
10 enheder kinase i 25 mM Tris-HCl ved pH-værdi 7,8, 5 mM magnesium-
chlorid, 0,125 mM ATP, 25 μ g/ml bovint serumalbumin. 5'-endepunkterne
15 mærkes ved tilsætning af 100 μ Ci (γ -³²P) ATP (3000 Ci/millimol) til
reaktionen. Reaktionen afsluttes ved tilsætning af SDS til 0,1% w/v
og EDTA til 10 mM, og det hele chromatograferes på en søjle på 30 x
0,7 cm af "Sephadex G-50"[®] (SF) ekvilibreret i 50 mM natriumchlorid
pr. 0,1% w/v SDS. De ekskluderes fraktioner samles, ethanolfældes og
20 resuspenderes i vand til 50 μ g/ml.

Bakteriel alkalifosphatase-behandling af *Hind* III begrænset pBR322:
5 - 10 μ g lineæriseret pBR322 i 20 mM Tris-HCl med pH-værdi 7,5 og
0,1% w/v SDS behandles med 5 μ g bakteriel alkalifosphatase i 60
minutter ved 37°C. Dette ekstraheres derefter med phenol/chloroform,
25 og DNA ethanolfældes.

Exonuclease III og S1-nucleasedigerering af *Eco* RI begrænset pWT101:

Fremgangsmåden er den samme som beskrevet for fjernelsen af *Hind* III-

stedet i pEH3, bortset fra, at 3,3 μg - aliquoterne fjernes efter 1, 3 og 5 minutter exonuclease III-digerering.

Fremstilling af gelprøver fra helcellelysater

Til fremstilling "helcellelyse"-agarosegeler samles en repræsentativ
5 prøve af plasmid-holdige celler fra en kulturplade ved hjælp af en
steril plastløkke og resuspenderes i 200 μl agaroseelectrophorese-
puffer. Hertil sættes 50 μl "Ficoll"-puffer (5% w/v SDS, 10% w/v
Ficoll (copolymer af saccharose og epichlorhydrin) og 0,06% w/v
10 bromphenolblåt), og blandingen inkuberes ved 65°C i 30 minutter,
hvorved cellerne lyses og derefter hvirvles rundt i 1 minut. Ca.
40 μl af en sådan prøve var tilstrækkelig til plasmididentifikation.
RNA, der er til stede sammen med DNA, kan fjernes enten ved at sætte
op til 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ribonuclease til prøven, efterfulgt af inkubation i
30 minutter ved 37°C, eller ved at sætte det direkte til agarosegel-
15 matrixen op til 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Begge metoder fjerner RNA-pletten, som
ellers vil være til stede på gelen.

Gelelektroforese

20 x 15 x 0,5 cm agarosegeler af sammensætning fra 0,8 til 1,4% køres
under konventionelle betingelser. Gelerne udsættes enten for elektro-
20 forese ved 40 volt natten over eller i 3 timer ved 120 volt, hvor-
efter de farves og fotograferes.

20 x 15 x 0,15 cm acrylamidgeler med sammensætning fra 5 til 10%
anvendes til at identificere små restriktionsfragmenter. Der farves
og fotograferes som nævnt ovenfor.

25 Isolering af trp-promotor-operator-*Hinf* I-fragment og fæstelse af
Hind III-linker.

6 μg pEH5 *Hinf* I-begrænses og elektroforeres på en acrylamidgel (5%
w/v), hvorefter 497 bp *Hinf* I-trp-promotor-operatoren og co-migre-

rende pBR322-bånd udkæres fra gelen, og DNA ekstraheres på kendt måde.

Hinf I-enderne fyldes derefter med DNA-polymerase I, og *Hind* III-linker tilknyttedes ved stump-ende-ligation i et forhold på 50 linker-fragmenter pr. *Hinf* I-fragment (dette reducerer muligheden for, at *Hinf* I-fragmenterne selvligerer). Der fremstilles klæbrige ender ved at begrænse blandingen med *Hind* III, DNA ethanol-fældes, resuspenderes i 50 μ l 50 mM natriumchlorid, 0,1% w/v SDS, hvorefter det hele chromatograferes på en søjle på 50 x 0,7 cm "G150 Sephadex" (forækvilibreret med 50 mM natriumchlorid og 0,1% w/v SDS). Den ekskluderede top samles, og DNA ethanol-fældes.

Konstruktion af pWT101

Den fuldstændige *E. coli*-trp-promotor-, operator-, ledersekvens og de første syv aminosyrer af *trpE* er indeholdt i et *Hinf* I-fragment på ca. 497 bp i pEH5. 497 bp *Hinf* I-fragmentet clones til *Hind* III-stedet af pBR322 ved hjælp af decamer *Hind* III-linker-DNA. For at opnå dette, må *Hinf* I-enderne først fyldes med DNA-polymerase I for at muliggøre vedhæftning af linker-DNA. Fragmentet ligeres derpå til bakteriel alkalisk phosphatase-behandlet *Hind* III-skåret pBR322, og blandingen anvendes til at transformere *E. coli* HB101 under udnyttelse af en næringsagarampicillinselektion. Der fås en samlet mængde på 582 kolonier fra transformationen.

Cloning til *Hind* III-stedet af pBR322 inaktiverer tetracyclin-promotoren, hvorved enhver transformant bliver tetracyclin-følsom, medmindre det clonede stykke har sin egen promotor, der transkriberer over i tetracyclingenerne. Da *Hinf* I-fragmentet indeholder *trp*-promoter-operator-området, bør de transformanter, der indeholder et plasmid med fragmentet clonet i den korrekte orientering, dvs. transkriberende mod tetracyclin-promoteren, være tetracyclin-resistente. For at afprøve dette, påføres 48 tilfældigt valgte kolonier fra ampicillin-transformationspladerne på minimale agarplader med M9 casamino-syrer suppleret med 10 μ g/ml tetracyclin. Heraf var 11 tetracyclin-resistente, hvilket var det forventede antal, idet der

ved tilstedeværelse af to fragmenter var en mulighed på 1:4 for at få den korrekte orientering.

Tilstedeværelse af indsat DNA kan også bekræftes ved at tage kolonier fra begge sat plader og afprøve dem mod en pBR322-kontrol ved hjælp af helcelleagarosegeler. Ved disse metoder isoleres ampicillin-resistente, og ampicillin- og tetracyclin-resistente kolonier, der indeholder plasmider med indsat DNA. Plasmid-DNA'er fremstilles fra et antal af disse kolonier til restriktionsendonucleaseanalyse.

Fig. 11 viser fremstillingen og karakteriseringen af pWT101 og kan fortolkes på følgende måde:

a) pEH5 digereret med *Hinf* I og *Hpa* I; b) pEH5 digereret med *Hinf* I alene; c) pWT101 digereret med *Hind* III; d) pWT101 digereret med *Hind* III og *Hpa* I.

Konstruktion af pWT101

Fjernelse af *Hind* III-stedet distalt i forhold til *trp*-promotoren.

Det distale *Hind* III-sted fjernes ved hjælp af *Eco* RI-spaltning efterfulgt af fjernelse af DNA ved exonuclease III- og S1-nuclease digereret. Der medtages også et DNA-polymerase I-trin forud for liggering for at udfylde alle asymmetriske ender, der er tilbage efter S1-nucleasedigeret.

Der vælges digereretstider på 1, 3 og 5 minutter.

De tre DNA-blandinger efter *Eco* RI-restriktion, exonuclease III-digeret (1, 3 og 5 minutter), DNA-polymerase I-udfyldning og stump-ende-liggering anvendes til at transformere HB101-celler. En dobbelt antibiotikumselektion anvendes ved udsåning på M9, casamino-syrerminimalagar suppleret med ampicillin og tetracyclin; den dobbelte selektion sikrer, at β -lactamase- og tetracyclingerne forbliver intakte.

Til yderligere karakterisering af de mulige deletanter udvælges to transformanter både fra 1-minuts- og 5-minutsfraktionen samt fire fra 3-minutsfraktionen.

Karakterisering af deletantplasmiderne

5 Ingen af de 8 plasmider producerer et 512 bp-fragment, når de skæres med *Hind* III, og alle vandrer til en position over 4,36 kb-fragmentet af *Hind* III-begrænset pWT101. Alle plasmider dobbeltdigeres med *Hpa* I og *Pst* I, hvorved der produceres to fragmenter, hvoraf det mindste strækker sig over det pågældende område (området omkring *Eco* RI-
10 stedet i pWT101). Størrelserne af de fragmenter, der genereres i pWT101, er 3777 og 1096 bp. Nærmere undersøgelser viser klart, at sidstnævnte fragment er fjernet i alle tilfælde, medens det førstnævnte, som ventet, er forblevet uændret. Mængderne af fjernet DNA ligger fra 51 bp i pWT111 (1 minuts exonuclease III-digerering) til
15 361 bp i pWT118 (5 minutters exonuclease III-digerering).

Da det har vist sig, at pWT111 fik fjernet den mindste mængde DNA, og tetracyclin-effektiviteten af udsåningsresultaterne viser, at det er lige så effektivt som pWT101 til transcription fra *trp*-promotoren, er det valgt som *Hind* III-cloningsmiddel til anvendelse ved oversættelsesfaseændring.
20

Konstruktion af pWT121

For at ændre fasingen fra *Hind*-stedet af pWT111 fyldes 5'-extensionen med DNA-polymerase I og liggeres på *Hind* III-linker DNA, begrænses med *Hind* III til fjernelse af overskud af linker og til dannelse af
25 klæbrige ender, hvorefter der liggeres endnu en gang. Herved tilføjes 14 bp DNA, og laserammen ændres fra det nye *Hind* III-sted (det gamle sted er nu ufuldstændigt) med plus ét nucleotid.

Konstruktion af pWT131

Den tredje læseramme dvs. pWT111 plus 2 nucleotider, fås ved at gentage de samme serier reaktioner på dette faseændrede plasmid. Disse plasmider producerer, ligesom pWT111, små polypeptider, der
5 initieres ved begyndelsen af *trpE* og afsluttes ved stopkodoner (forskellige i hvert tilfælde) foran tetracyclingenene. På grund af ændringerne i "læserammen" har imidlertid alle polypeptiderne imidlertid forskellige C-terminal-aminosyresekvenser, skønt N-terminal-sekvenserne er de samme.

10 Fig. 12 viser de ændringer, der sker under faseændringen fra pWT111 pWT131. Figuren kan fortolkes på følgende måde:

- a) pWT111 digereret med *Hha* I;
- b) pWT121 digereret med *Hha* I;
- c) pWT131 digereret med *Hha* I.

15 Fremstilling af pWT121/FPV samt assay af genudtrykkelse af FPV-HA-antigen til illustration af, at der kan indsættes DNA i plasmidet pWT121.

10 μg pWT121 grænsedigereres med *Hind* III. De resulterende 5'-terminalphosphater i vektorerne fjernes ved behandling med 20 μg bakteriel alkalisk phosphatase i 30 minutter ved 37°C i en 25 μl 's
20 inkubation indeholdende 20 mM Tris HCl med pH-værdi 7,5 og 0,1% w/v SDS. Efter phenolekstraktion og ethanoludfældning ligeres 0,2 μg DNA til ca. 40 ng FPV-HA-gen i en 20 μl 's inkubation indeholdende 50 mM Tris-HCl med pH-værdi 7,5, 10 mM magnesiumchlorid, 20 mM dithio-
25 threitol (DTT), 1 mM ATP og 0,02 enheder t_4 DNA-ligase (New England Biolabs). Efter inkubation natten over ved 15°C fortyndes blandingen til 100 μl med TCM (10 mM Tris-HCl med pH-værdi 7,5, 10 mM calciumchlorid og 10 mM magnesiumchlorid) og anvendes til at transficere 200
30 μl calciumchlorid-behandlet *E. coli* K12 HB101 ved en kendt fremgangsmåde. De transformanter, der er til stede efter vækst i 16 timer ved 37°C på L-agar plus 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ carbenicillin (Pyopen, α -carboxy-benzylpenicillin), testes for tetracyclin-resistens ved at sætte dem på

agar-plader indeholdende M9-salte, glucose og casaminsyrer plus carbenicillin og tetracyclin (10 µg/ml).

Assay for genudtryk

5 ml flydende kulturer af individuelle kolonier dyrkes i M9-medium
5 suppleret med 20 µg/ml β-indolacrylsyre og 100 µg/ml tryptophan, hvor
det er angivet. Cellerne høstes ved centrifugering, suspenderes i 0,3
ml 25% w/v kold saccharose/50 mM Tris med pH-værdi 8 og inkuberes med
0,1 ml lysozym (10 mg/ml). 0,1 ml 0,5M EDTA og dernæst 0,5 ml isaf-
kølet "Triton"-opløsning tilsættes med 5 minutters intervaller (Tri-
10 ton-opløsning er 60 mM EDTA, 50 mM Tris med pH-værdi 8 og 0,1% w/v
"Triton X-100"). Dette lysat anvendes til antigen-assay uden yderli-
gere behandling.

HA-antigen-assays udføres i polystyrenkulturrør (Nunc No. 1410) under
anvendelse af en antistofsandwichteknik. Kanin-anti-FPV HA renses ved
15 ammoniumsulfatudfældning og DEAE-cellulose-chromatografi før an-
vendelse og mærkes med ¹²⁵I. Rørene dækkes med 50 µl 0,2M NaHCO₃ med
pH-værdi 9 indeholdende 60 µg/ml rensed, umærket IgG i 10 minutter
ved stuetemperatur, vaskes med 3 x 1 ml aliquoter af vaskepuffer og
inkuberes derefter ved stuetemperatur enten med kendte mængder (0,5 -
20 5 ng) sprængt FPV eller med bakterielysater. Efter 2 timer vaskes
rørene med 4 x 1 ml aliquoter af vaskepuffer, og inkuberes endelig
ved 4°C i 16 timer med 50 µl vaskepuffer indeholdende 200.000 cpm
¹²⁵I-anti HA. Rørene vaskes igen og tælles i en Packard γ-tæller. Det
tilstedeværende antigen mængde bestemmes fra standardkurver, idet den
25 bundne radioaktivitet relateres til mængden af tilstedeværende FPV.

Fremstilling af *nic*⁻-derivater

Restriktion af de tre fase-ændrede pWT-plasmider og pAT153 med både
Bam HI og *Pst* I genererer to fragmenter fra hvert plasmid. Dette
vises i fig. 14.

pAT153 producerer fragmenter af 1129 bp og 2529 bp, idet det sidstnævnte større fragment indeholder det oprindelige, men uden *nic*-stedet.

5 pWT-Plasmiderne producerer alle det samme 3233 bp-fragment indeholdende det oprindelige og *nic*-stedet, men forskellige mindre fragmenter indeholdende *trp*-kontrol-elementer; forskellene opstår på grund af fase-ændrings-forandringer ved *Hind* III-stedet.

10 Plasmiderne begrænses med *Pst* I og *Bam* HI, undergår elektroforese på en 3,5% acrylamidgel, og pAT153 2529 bp-, pWT111 1590 bp-, pWT121 1604 bp- og pWT131 1618 bp-båndene skæres ud og udvindes fra acrylamidet. pAT153-båndet ligeres derpå uafhængigt til de 3 pWT-bånd, og ligationsblandingerne anvendes til at transformere *E. coli* HB 101-celler, idet der selekteres på næringsagar indeholdende carbenicillin ved 100 µg/ml. Da pAT153-fragmentet i sig selv ikke er i stand til at
15 meddele resistens mod ampicillin og tetracyclin, og da pWT-fragmenterne mangler et oprindelsessted, sikrer selektion på carbenicillin, at de opnåede rekombinantmolekyler indeholder disse to fragmenter. Plasmid-DNA'er fremstilles fra et antal af de kolonier, der blev dyrket på transformationsplader, og disse anvendes til at bekræfte
20 tilstedeværelsen af de ønskede plasmider ved restriktionsanalyse.

Følgende enzym-digereringer udføres:

Pst I og *Bam* HI-digerering til generering af de ligerede fragmenter: Under henvisning til fig. 15 er sporene b, c og d digereringer af *nic*⁻-derivater af henholdsvis pWT131, 121 og 111. Spor a er en digerering af pWT131, og spor e er en digerering af pAT153. Som det
25 fremgår af gelen, har alle tre *nic*⁻-*trp*-plasmider tilegnet sig pAT153 2529 bp-fragmentet, men bibeholder stadig de oprindelige *trp*-kontrol-fragmenter.

Hind III-digerering for at vise, at *trp* p/o-kontrolleret udtrykssted
30 stadig fungerer: Under henvisning til fig. 16 er sporene a, b, c og d digereringer af henholdsvis pWT231, 221, 211 og 131. Alle 3 *nic*⁻-

derivater begrænses med *Hind* III og er mindre en pWT153 på grund af manglen på de 2 *Hae* II-fragmenter.

Hae II-digerering for at vise, at *Hae* II B- og H-fragmenterne fra plasmidernes pBR322-område mangler: Under henvisning til fig. 17 er 5 sporene a til f digererings af henholdsvis pBR322, pAT153, pWT231, 221, 211 og 131. Alle 4 *nic*⁻-plasmider (spor b til e) mangler 2 *Hae* II-fragmenter, 622 bp *Hae* II B- og 82 bp *Hae* II H-fragmenterne af pBR322.

Fremstilling af plasmidet pWT221uro

10 Plasmidet pWT221, der er det ovenfor beskrevne *nic*⁻-derivat af plasmidet pWT121, blev anvendt til cloning af et eucariotisk gen. Nærmere bestemt blev det syntetiske gen for urogastron eller human epidermisk vækstfaktor, hvilket gen er beskrevet i Ref. Smith et al., 1982, 15 *Nucleic Acids Research*, 10, side 4467-4482, indsat mellem *Hind* III- og BamHI-stederne i plasmidet pW221, således at urogatrongenet blev udtrykt fra *trp*-promotoren.

PATENTKRAV

1. Plasmid,

k e n d e t e g n e t ved, at det har et indsættelsessted for et 20 eukaryotisk DNA-fragment, der ligger ved siden af en bakteriel *trp*-promotor, *trpE*-genet eller en del deraf, hvilket indsættelsessted er "nedstrøms" i forhold til et prokaryotisk ribosombindingssted og at det har en *trp*-initiatorokodon, så at den bakterielle *trp*-promotor kontrollerer transcription og oversættelse af et indsat DNA-fragment, 25 og at det har karakteristika som anført i et hvilket som helst af de følgende alternativer (A)-(G):

(A) et plasmid med en molekyllængde på 9866 bp; et *Hind*III-sted; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI; et *Hpa* I-sted 305 bp fra det andet *Hind* III; et andet *Hpa* I-sted 30

3250 bp fra det første *Hpa* I og 1950 bp fra det første *Hind* III, *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen på 1950 bp mellem det andet *Hpa* I-sted og det første *Hind* III-sted, et gen for tetracyclin-resistens, der følger umiddelbart efter det første *Hind* III-sted og et gen for ampicillin-resistens i delen på 3709 bp mellem
5 *Sal* I- og *Eco* RI-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH3.

(B) et plasmid med en molekyllængde på 9866 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Eco* RI-sted 3709 bp fra *Sal* I; et andet *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco*
10 RI; et *Hpa* I-sted 1950 bp fra det andet *Hind* III-sted; et andet *Hpa* I-sted 3250 bp fra det første *Hpa* I-sted og 305 bp fra det første *Hind* III-sted, *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen på 1950 bp mellem det andet *Hind* III- og det første *Hpa* I-sted, et gen for tetracyclin-resistens, der følger umiddelbart efter det
15 første *Hind* III-sted og et gen for ampicillin-resistens i delen på 3709 bp mellem *Sal* I- og *Eco* RI-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH4.

(C) et plasmid med en molekyllængde på 6750 bp; et *Hind* III-sted; et *Bam* HI-sted ved 346 bp fra *Hind* III-stedet; et *Sal* I-sted ved 275 bp
20 fra *Bam* HI-stedet; et *Hpa* I-sted ved 4230 bp fra *Sal* I-stedet og 1950 bp fra *Hind* III-stedet; *trp*-promotoren, *E*-genet og en del af *D*-genet i delen på 1950 bp, der strækker sig mellem *Hpa* I-stedet og *Hind* III-stedet og et gen for ampicillin-resistens i delen på 4800 bp mellem *Hind* III-stedet og *Hpa* I-stedet, hvilket plasmid betegnes pEH5.

(D) et plasmid med en molekyllængde på 4874 bp; et *Eco* RI-sted; et
25 *Hind* III-sted 31 bp fra *Eco* RI-stedet; et *Hpa* I-sted 313 bp fra *Hind* III-stedet; et andet *Hind* III-sted 199 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 346 bp fra det andet *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 752 bp fra *Eco* RI; et gen for tetracyclin-resistens, der strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud
30 over *Sal* I-stedet; et gen for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet, og den clonede del af *trp*-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af *E*-genet i området mellem *Hpa* I-stedet og det andet *Hind* III-sted; hvilket plasmid betegnes pWT101.

(E) et plasmid med en molekyllængde på 4823 bp; et *Hpa* I-sted; et *Hind* III-sted 199 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 346 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045 bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; et gen for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af *trp*-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af E-genet i området mellem *Hpa* I- og *Hind* III-stedet; hvilket plasmid betegnes pWT111.

10 (F) et plasmid med en molekyllængde på 4837 bp; et *Hpa* I-sted; et *Hind* III-sted 206 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 353 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045 bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; genet for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af *trp*-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af E-genet mellem *Hpa* I- og *Hind* III-stedet; hvilket plasmid betegnes pWT121, idet fasningen er ændret 1 bp fra pWT111.

(G) et plasmid med en molekyllængde på 4851 bp; et *Hpa* I-sted; et *Hind* III-sted 213 bp fra *Hpa* I; et *Bam* I-sted 360 bp fra *Hind* III; et *Sal* I-sted 275 bp fra *Bam* I; et *Pst* I-sted 2958 bp fra *Sal* I og 1045 bp fra *Hpa* I; hvorhos genet for tetracyclin-resistens strækker sig fra området for *Hpa* I-stedet til ud over *Sal* I-stedet; og genet for ampicillin-resistens i området for *Pst* I-stedet og den clonede del af *trp*-operonen omfatter området mellem promotoren og den første del af E-genet mellem *Hpa* I-stedet og *Hind* III-stedet, hvilket plasmid betegnes pWT131, idet fasningen er ændret 2 bp fra pWT111.

2. nic^- -derivat af et plasmid ifølge krav 1, fortrinsvis fremstillet ved at man fjerner *nic*-stedet fra et plasmid eller konstruerer et plasmid på en sådan måde, at *nic*-stedet ikke er til stede.

3. Fremgangsmåde til fremstilling af et plasmid ifølge krav 1, kendet ved, at man

(a) til fremstilling af det i krav 1 (A) angivne pEH3 digererer en vildtypestamme af *E. coli* med restriktionsendonuclease *Hind* III, ligger det således vundne fragment til det lineære molekyle, der fås ved begrænsning af plasmidet pBR322 med restriktionsendonuclease *Hind* III, transformerer *E. coli* W3110 trpoE ∇ 1 med det resulterende plasmid og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser tetracyclin-resistens og trp-komplementering, til opnåelse af plasmidet pEH3.

(b) til fremstilling af det i krav 1 (B) angivne pEH4 digererer en vildtypestamme af *E. coli* med restriktionsendonuclease *Hind* III, ligger det således vundne fragment til det lineære molekyle, der vindes ved begrænsning af plasmidet pBR322 med restriktionsendonuclease *Hind* III, transformerer *E. coli* W3110 trpoE ∇ 1 med det resulterende plasmid og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser tetracyclin-følsomhed og trp-komplementering, til opnåelse af plasmidet pEH4.

(c) til fremstilling af det i krav 1 (C) angivne pEH5 begrænser pEH3 med restriktionsendonuclease *Eco* RI, digererer det lineære molekyle med exonuclease III og S1-nuclease, behandler med DNA polymerase I, ligger det lineære molekyle med DNA ligase, transformerer *E. coli* W3110 trpoE ∇ 1 med det resulterende plasmid og selekterer de kolonier, der udviser trp-komplementering og ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pEH5.

(d) til fremstilling af det i krav 1 (D) angivne pWT101 begrænser pEH5 med restriktionsendonuclease *Hinf* I til dannelse af et fragment indeholdende den komplette trp-promotor og cloner fragmentet ind i *Hind* III-stedet i plasmidet pBR322, idet man behandler *Hinf* I-enderne af fragmentet med DNA polymerase I, behandler fragmentet med *Hind* III-linkere i nærværelse af DNA ligase, behandler det ligerede molekyle med *Hind* III-restriktionsendonuclease til dannelse af et lineært molekyle med *Hind* III-klæbrige ender, ligger dette lineære molekyle til *Hind* III-stedet i plasmidet pBR322, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT101.

(e) til fremstilling af det i krav 1 (E) angivne pWT111 begrænser pWT101 med restriktionsendonuclease *Eco* RI, digererer det lineære molekyle med exonuclease III og S1-nuclease, behandler med DNA polymerase I, religerer det lineære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT111.

(f) til fremstilling af det i krav 1 (F) angivne pWT121 begrænser pWT111 med restriktionsendonuclease *Hind* III, behandler det lineære molekyle med DNA polymerase I, ligerer med *Hind* III-linker DNA, begrænser med restriktionsendonuclease *Hind* III, religerer det lineære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT121.

(g) til fremstilling af pWT131 som angivet i krav 1 (G) begrænser pWT121 med restriktionsendonuclease *Hind* III, behandler det lineære molekyle med DNA polymerase I, ligerer med *Hind* III-linker DNA, begrænser med restriktionsendonuclease *Hind* III, religerer det lineære molekyle, transformerer *E. coli* K12 HB101 med de resulterende plasmider og selekterer de *E. coli*-kolonier, der udviser ampicillin-resistens, til opnåelse af plasmidet pWT131.

4. Plasmid,

k e n d e t e g n e t ved, at det er et plasmid ifølge krav 1 eller 2, der på indsætningsstedet har indsat et eukaryotisk DNA-fragment.

5. Fremgangsmåde til fremstilling af det i krav 4 angivne plasmid, k e n d e t e g n e t ved, at man indsætter et eukaryotisk DNA-fragment ved indsættelsesstedet i et plasmid som angivet i krav 1 eller 2.

6. Transformeret bakteriecelle, hvori der er indført et plasmid ifølge krav 4 eller fremstillet ifølge krav 5.

7. Fremgangsmåde til transformation af en transformerbar bakteriecelle,

k e n d e t e g n e t ved, at man indfører et plasmid ifølge krav 4 eller et plasmid fremstillet ifølge krav 5 i en egnet bakteriecelle.

8. Fremgangsmåde til udtrykkelse af et protein,

k e n d e t e g n e t ved, at man dyrker en celle ifølge krav 6.

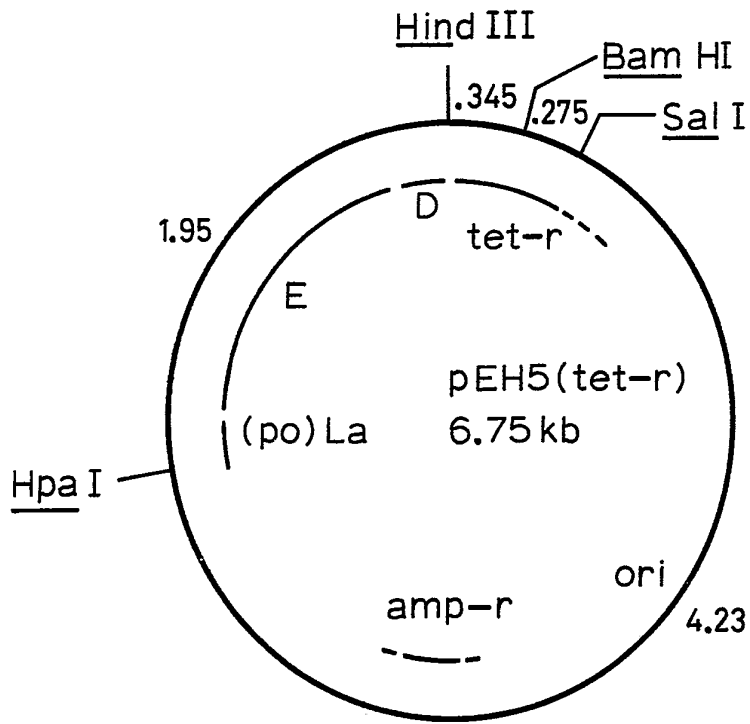


Fig.1

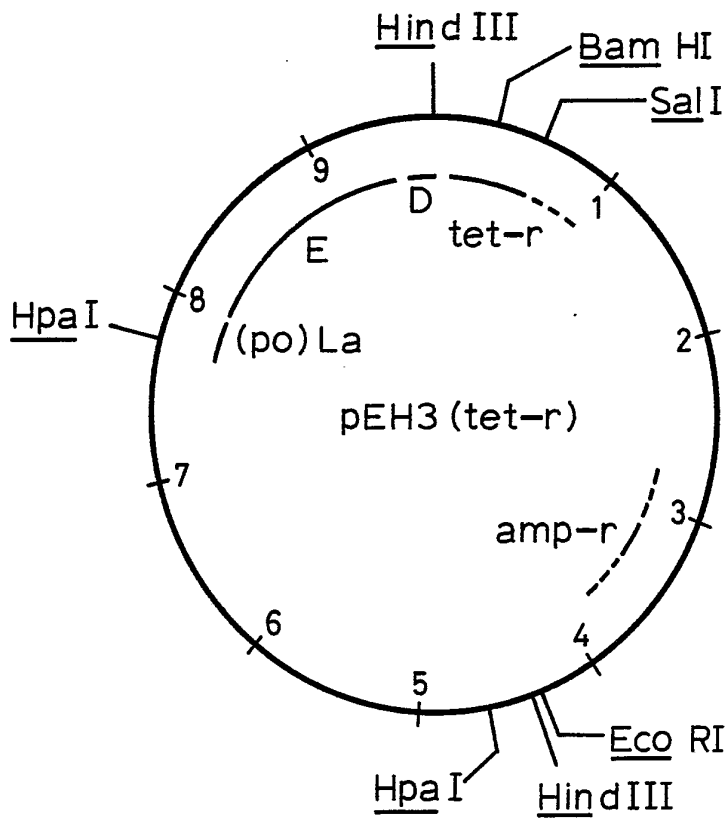


Fig.2

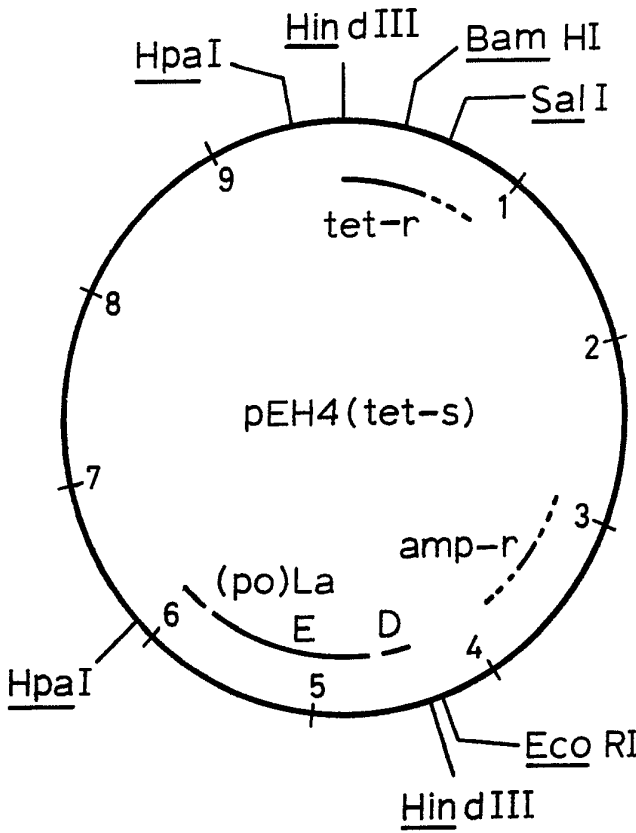


Fig. 3

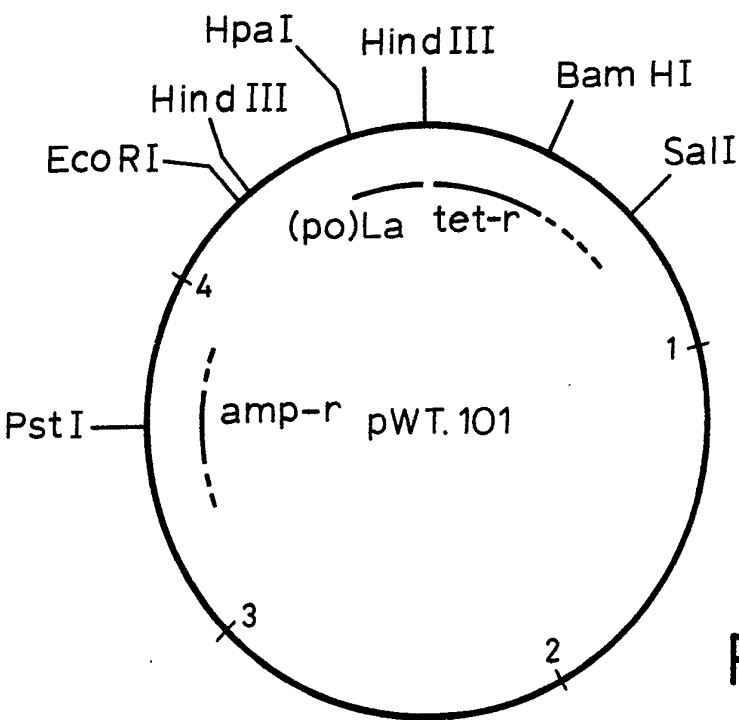


Fig. 4

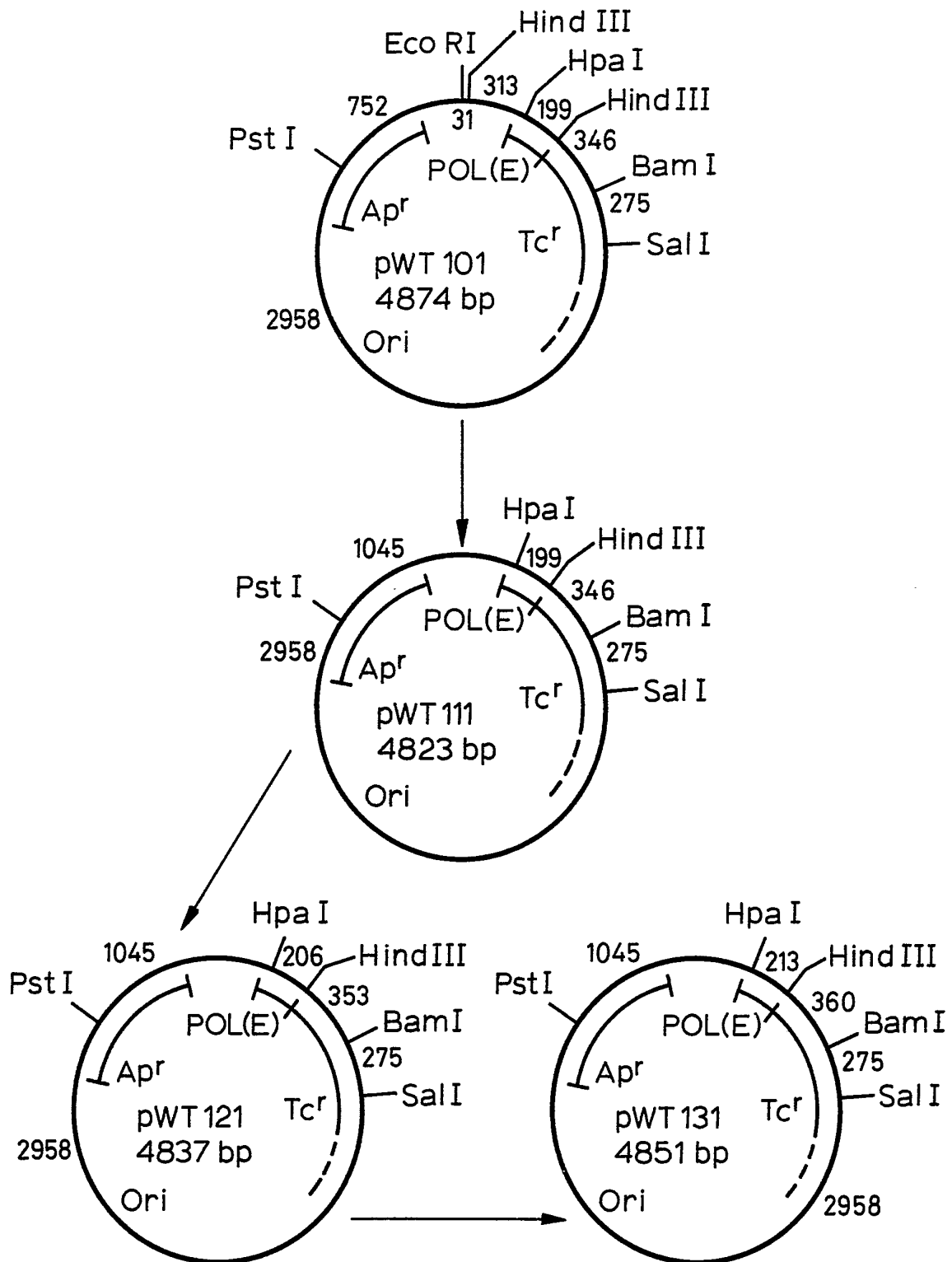


Fig. 5

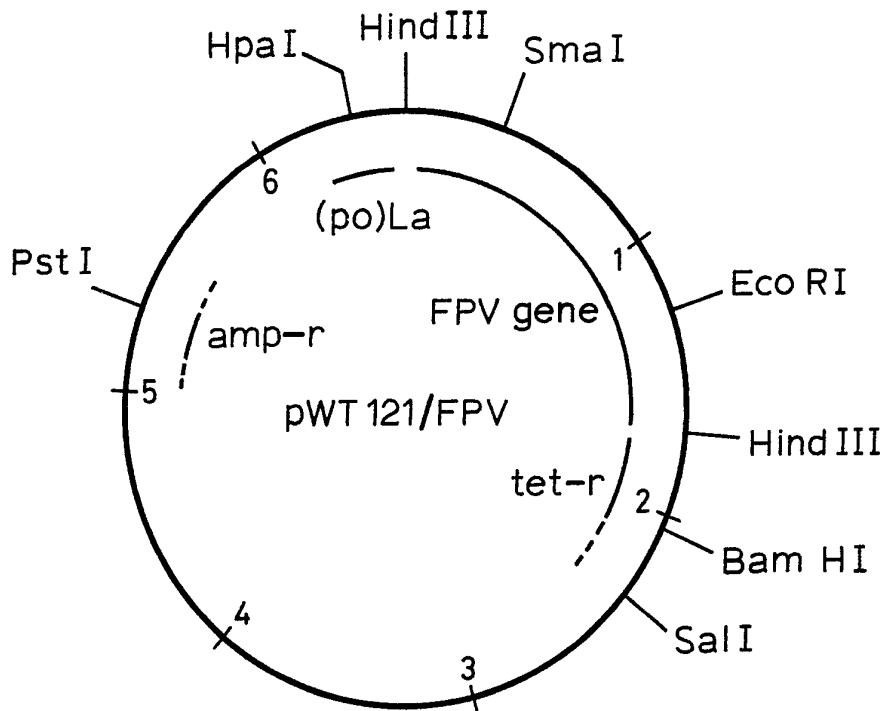


Fig. 6

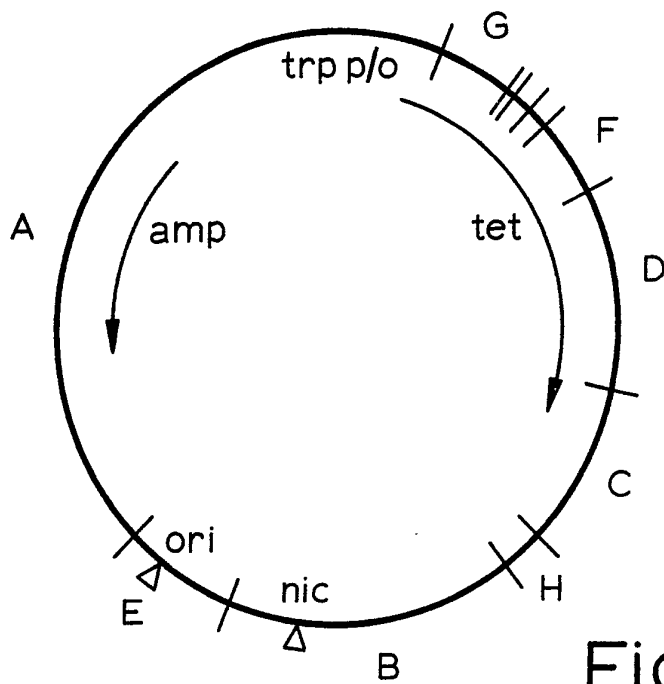


Fig. 13

a b c d e f g h i j

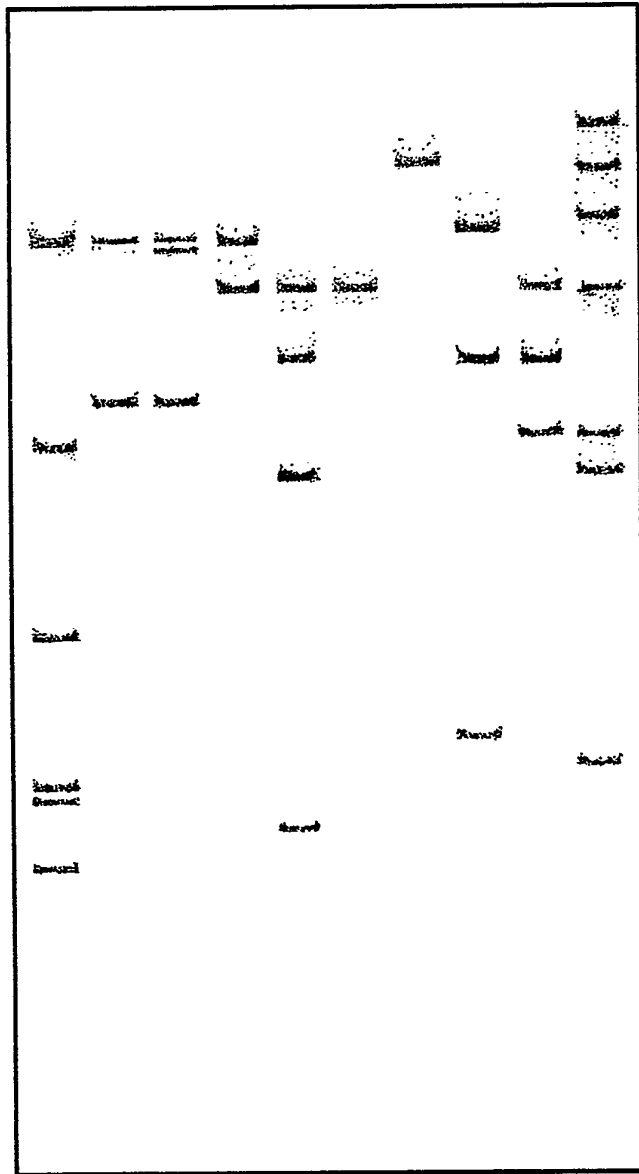


Fig.7

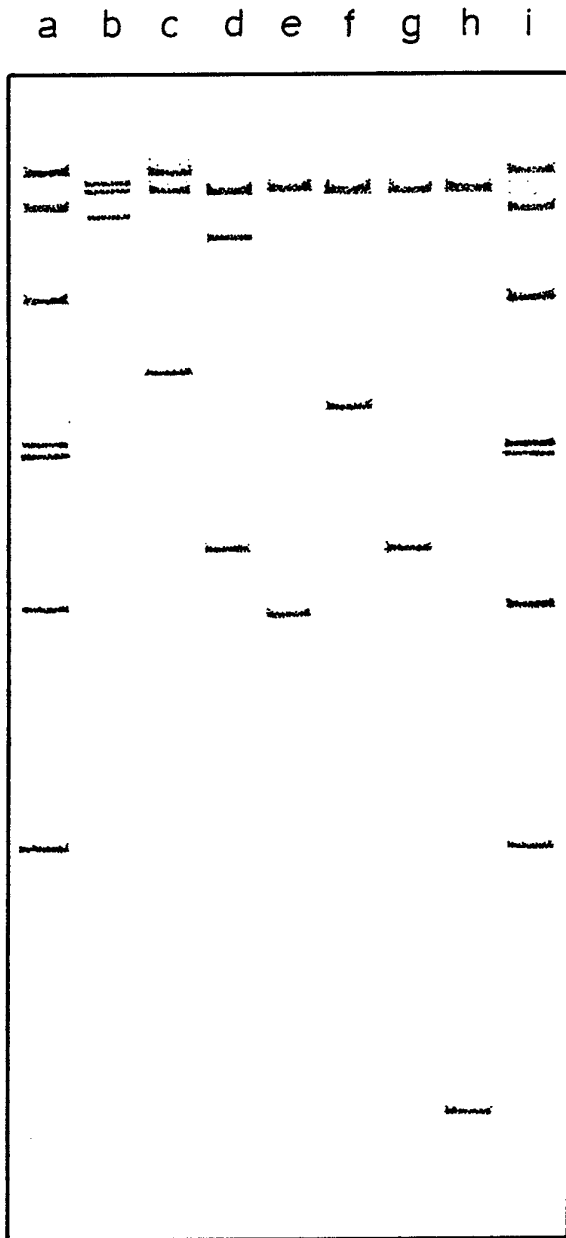


Fig.8

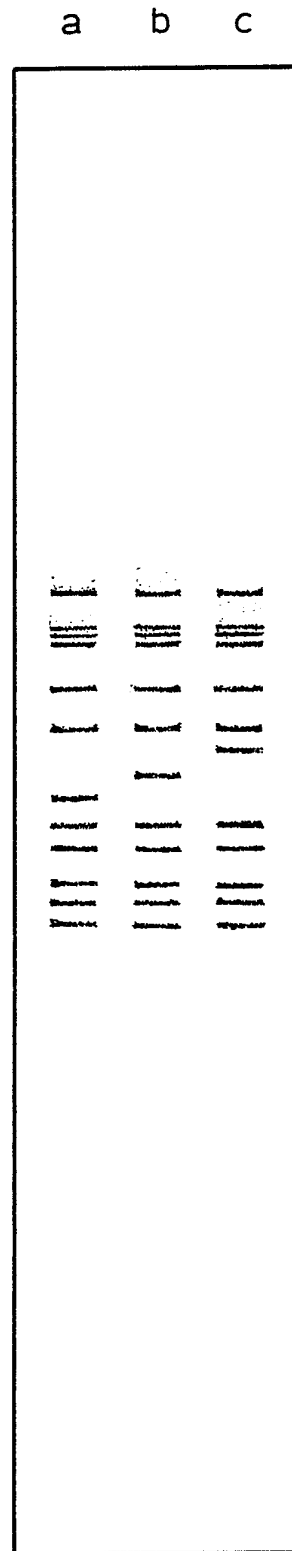


Fig.12

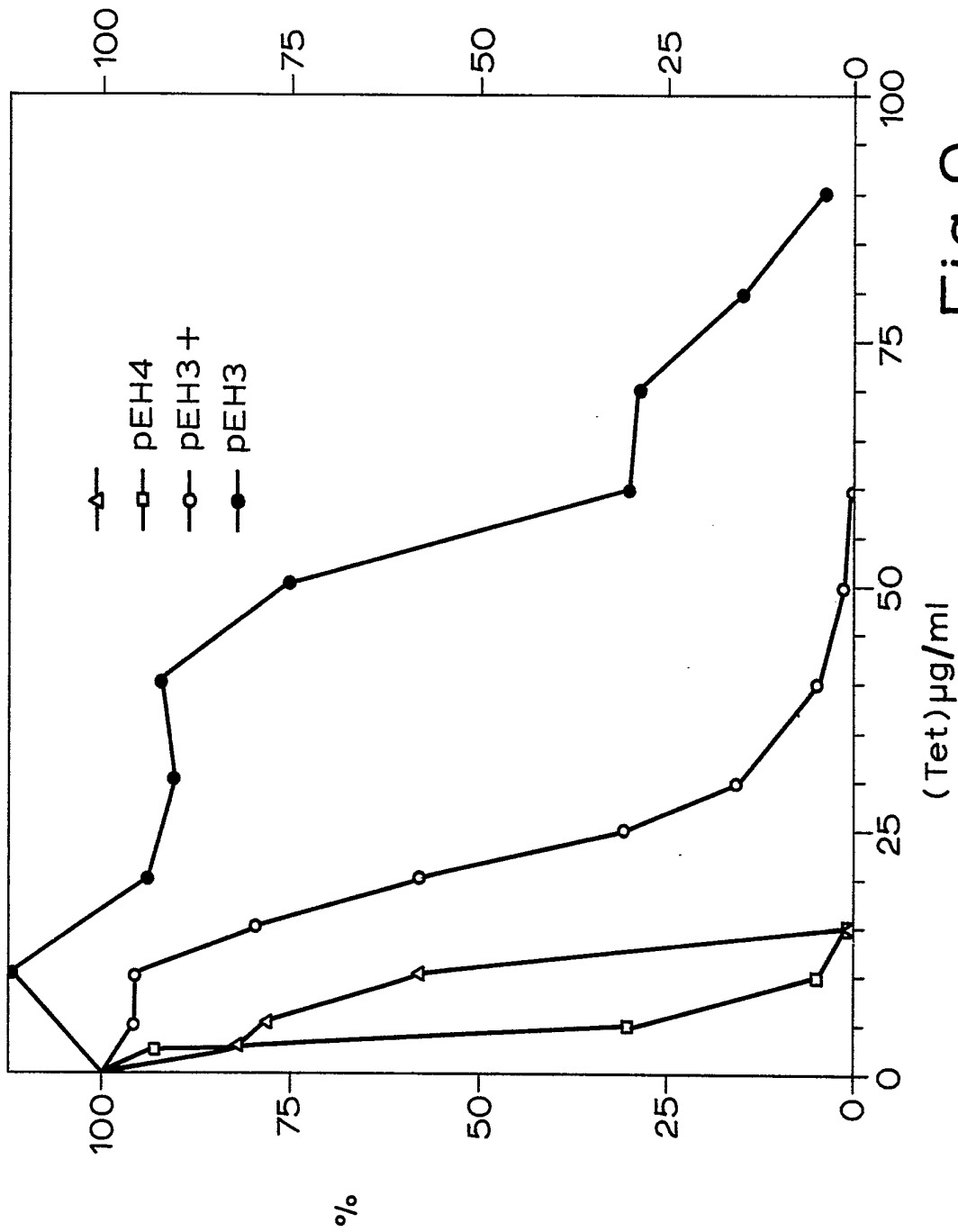


Fig. 9

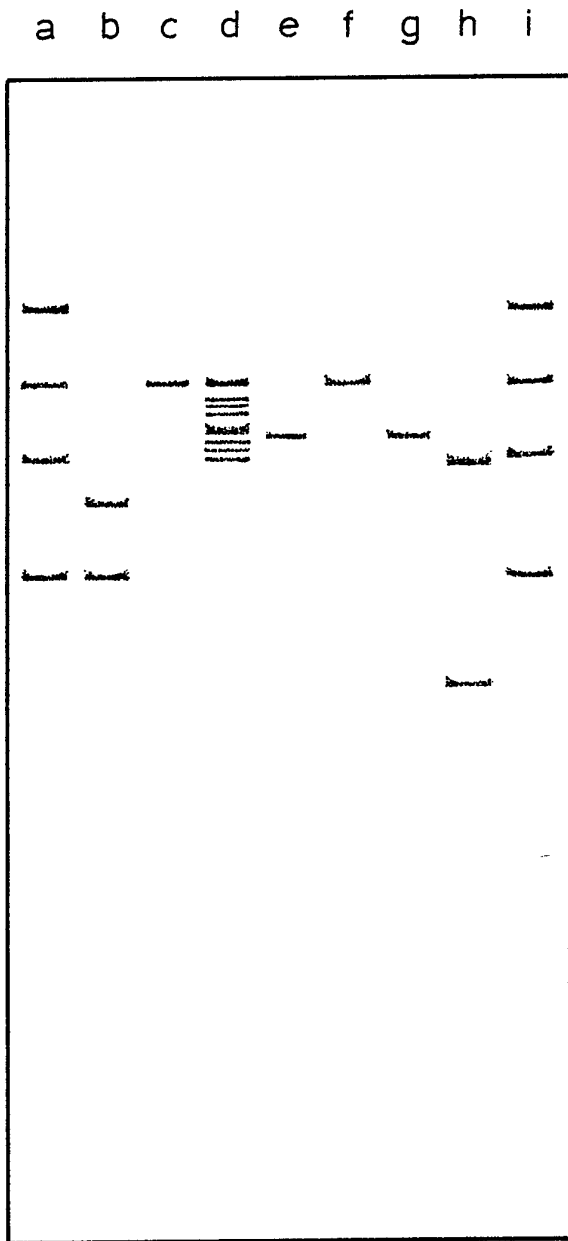


Fig.10

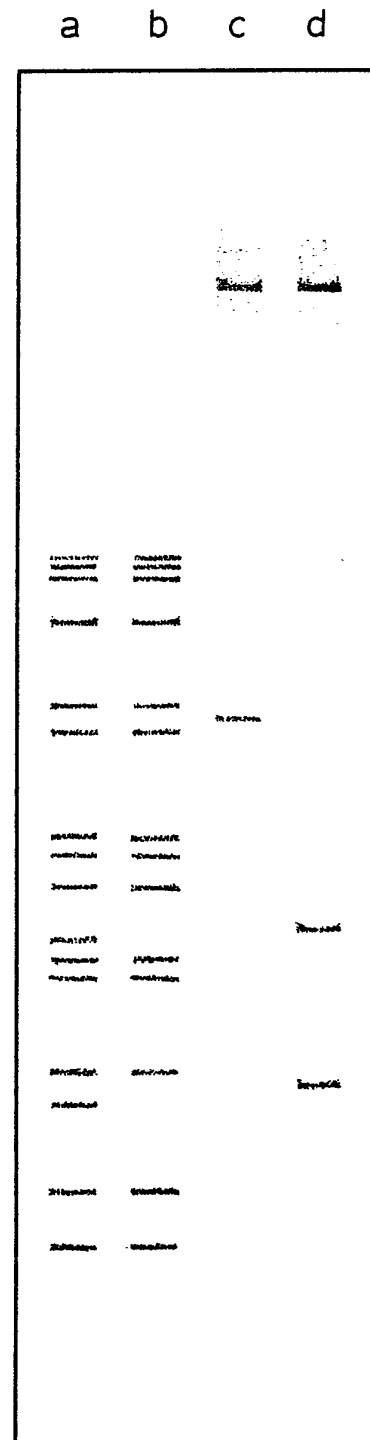


Fig.11

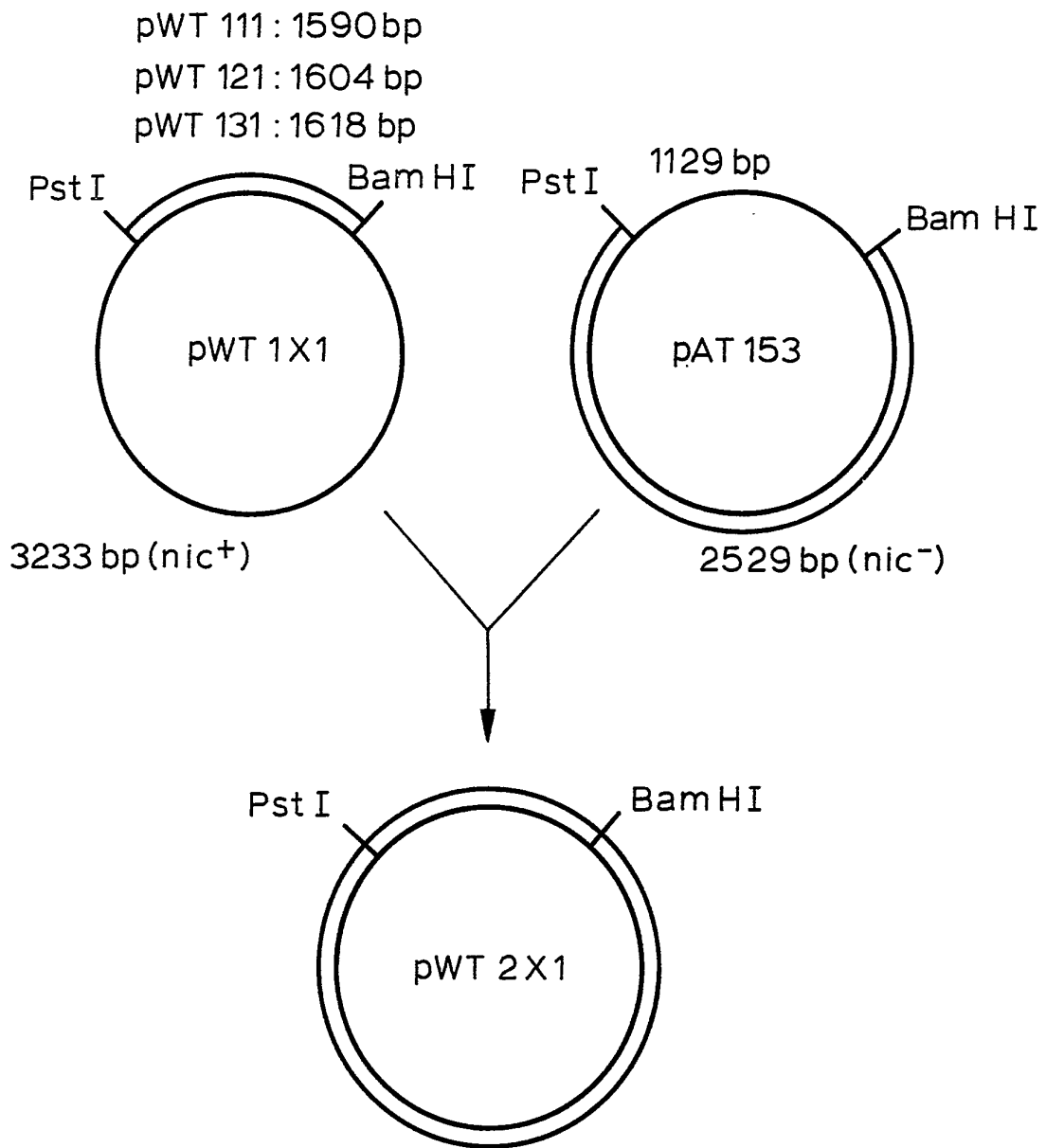


Fig.14

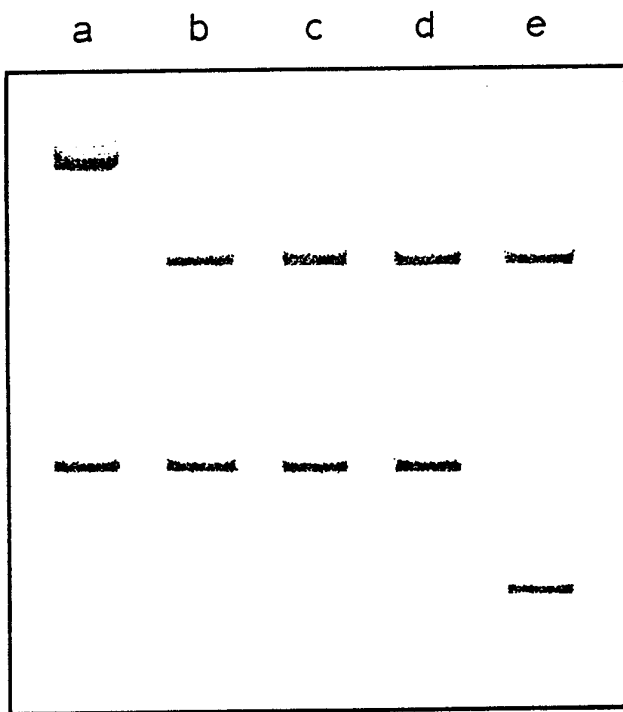


Fig.15

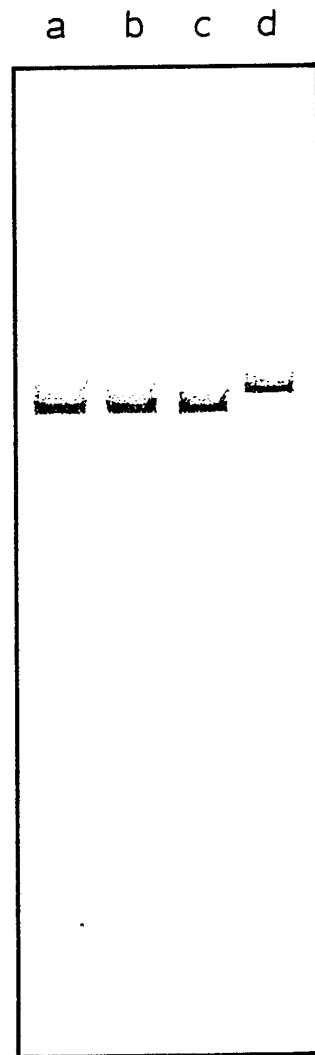


Fig.16

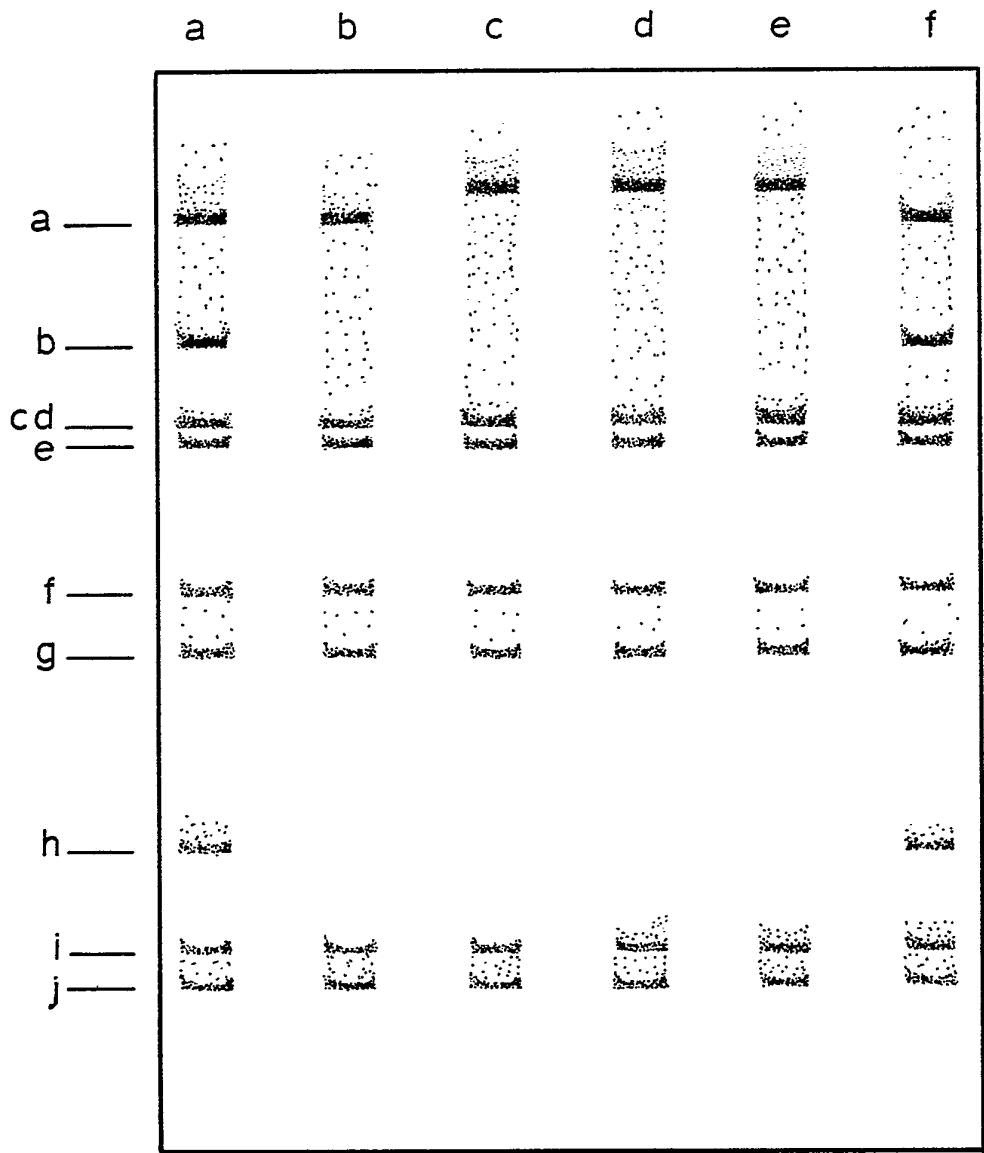


Fig.17