



# SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

## (B) (11) KUULUTUSJULKAISU UTLÄGGNINGSSKRIFT

80720

C (15) Patenti myönnetty  
Patent beviljat 01 07 1980

(51) Kv.1k.5 - Int.c1.5

C 12N 15/63, 1/19, C 12P 21/00

(21) Patentihakemus - Patentansökning	832825
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	05.08.83
(24) Alkuperäivä - Löpdag	05.08.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	10.02.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.03.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
09.08.82 GB 8222883	31.12.82 GB 8237026
02.06.83 GB 8315145	

(71) Hakija - Sökande

1. Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Hinnen, Albert, Landstrasse 66, CH-5264 Gipf-Oberfrick, Switzerland, (CH)  
2. Meyhack, Bernd, Säckingerstrasse 6, CH-4310 Rheinfelden, Switzerland, (CH)  
3. Meyer, Francois, Pfaffenrainstrasse 46, CH-4103 Bottmingen, Switzerland, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Saccharomyces cerevisiae-yhdistelmävektorit ja niiden käyttö polypeptidien valmistamiseksi  
Saccharomyces cerevisiae-hybridvektorit och deras användning för framställning av  
polypeptider**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 48081 (C 12 N 15/00),  
Nature 293 (1981), p. 717-722

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee DNA-jaksoja, joissa on hiivan happo-  
fosfataasigeenin promottori, yhdistelmävektoreita, jois-  
sa on mainittu promottori ja hiivaperäistä tai hiivaan  
kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, jota mainit-  
tu promottori ohjaa, mainituilla yhdistelmävektoreilla  
transformoituneita hiivoja ja niiden valmistusmenetelmiä.  
Keksintö tarjoaa myös menetelmän sellaisten polypepti-  
dien valmistamiseksi, jotka ovat hyödyllisiä ihmisten ja  
eläinten sairauksien hoidossa, ruoka-aineina tai entsy-  
maattisissa muuntoreaktioissa.

Uppfinningen avser DNA-fragment, vilka innehåller  
promotern av jästsyrafosfatasgenen, hybridvektorer inne-  
hållande nämnda promoter och ett jäst- eller icke-jästba-  
serat polypeptidkodande område, vilket styrs av nämnda  
promoter, med nämnda hybridvektorer transformerade jäst,  
och förfaranden för deras framställning. Uppfinningen av-  
ser även ett förfarande för framställning av polypeptider  
användbara vid behandling av sjukdomar hos människor och  
djur, såsom födoämnen eller i enzymatiska omvandlingsreak-  
tioner.

Saccharomyces cerevisiae-yhdistelmävektorit ja niiden käyttö polypeptidien valmistamiseksi - Saccharomyces cerevisiae-hybridvektorit och deras användning för framställning av polypeptider

Keksintö koskee DNA-palasia, jotka sisältävät hiivan happamen fosfataasin geenin eli happofosfataasigeenin PHO5-promoottorin ja mainitun promoottorin sisältäviä yhdistelmävektoreita, jotka kykenevät transformoimaan *Saccharomyces cerevisiae*-soluja. Keksintö tarjoaa myös menetelmiä mainittujen DNA-palasten, mainittujen yhdistelmävektorien ja niillä transformoitujen *S. cerevisiae*-solujen valmistamiseksi yhdistelmä-DNA-tekniikkaa soveltamalla. Edelleen keksintö koskee menetelmää sellaisten polypeptidien valmistamiseksi, jotka ovat mainittujen yhdistelmävektorien sisältämien liitännäisten koodittamia, ja jotka ovat hyödyllisiä hoidettaessa ihmisillä ja eläimillä esiintyviä sairauksia, sekä näiden johdannaisten valmistamiseksi.

Yhdistelmä-DNA-tekniikan kehityksen myötä on tullut mahdolliseksi tuottaa ohjatusti mikrobien avulla hyödyllisiä polypeptidejä, erityisesti sellaisia, joilla on mielenkiintoa lääketieteelliseltä kannalta. Suurin osa yhdistelmä-DNA-tekniikan alalla viime aikoina tapahtuneesta työstä koskee prokaryoottisia organismeja. Menetelmät ovat kehittyneet tarkoiksi ja koetelluiksi niin, että näihin organismeihin voidaan siirtää DNA:ta, joka koodittaa eukaryoottisia proteiineja. Useita bakteerilajeja, erityisesti *Escherichia coli*-kantoja, jotka on muunnettu tämän uuden tekniikan avulla, on nyt tarjolla ja niillä on mahdollista tuottaa kaupallisessa mittakaavassa erittäin tärkeitä polypeptidejä, kuten insuliinia, ihmisen leukosyytti- ja fibroblasti-interferonia ja ihmisen kasvuhormonia.

Kuitenkin tulevaisuudessa tulee moniin tarkoituksiin olemaan toivottavaa tai tarpeellista käyttää eukaryoottisia systeemejä valmistettaessa proteiineja, erityisesti farmakologisesti tärkeitä proteiineja, kaupallisesti. Koska hiivat ovat eukaryootteja, niillä on monia samoja toimintoja kuin muilla eukaryooteilla, joista erityisen tärkeinä mainittakoon nisäkässolut. Nisäkässolut syntetisoivat monia farmakologisesti tärkeitä proteiineja, ja näiden kahden järjestelmän sukulaisuussuhde voi olla edullinen. Esimerkiksi hiivan erityismekanismi muistuttaa korkeampien eläinsolujen vastaavaa, ja on tunnettua, että hiivasoluilla on mekanismi signaalisekvenssien lohkaistuksi (proteiinin varauksen N-pään osa, joka tavallisesti lohkeaa pois erittymiskuljetuksen yhteydessä) (47). Glykosylointijärjestelmä liittyy erityismekanismiin. Perusvaiheet, jotka johtavat glykosyloituneisiin proteiineihin, ovat samanlaisia kaikissa eukaryooteissa, ja on oletettavissa, että hiivasolut, toisin kuin prokaryoottiset solut, voivat tuottaa proteiineja, jotka ovat tarkoin vastaavasti glykosyloituneita (vaikka ketjun jotkut loppuvaiheet jouduttaisiinkin modifioimaan).

Sitäpaitsi hiivasolut ovat vapaita endotoksiineista. Endotoksiiniepäpuhtauksia löytyy usein *E. colista* saaduista proteiinivalmisteista ja ne pitää poistaa kalliilla puhdistustoimenpiteillä.

Koska hiiva on mikro-organismi, soluja on helppo viljellä. Hiivan solumassa kasvuliuksen tilavuusyksikköä kohti on huomattavasti suurempi kuin *E. colin* vastaava. Lisäksi hiivan käymisominaisuudet tunnetaan hyvin ja suuren mittakaavan käymisolosuhteet ovat jo vakiintuneet.

Aivan viime vuosina on leivontahiiva, *Saccharomyces cerevisiae*, saanut osakseen lisääntyvää huomiota sekä käytännön että teorian parissa työskenteleviltä molekyylibiologeilta. Tämä kehitys johtuu suurella määrällä trans-

formointisysteemin aikaansaamisesta (Hinnen et al. (1); Beggs (2)), joka mahdollistaa tämän mikro-organismien käytön geenimanipulaatioissa, kuten heterologisen DNA:n siirtämisessä ja kloonauksessa. Kuten prokaryoottisissa systeemeissä, ovat plasmidit edullisia vektoreita myös hiivasoluissa käytettäväksi, so. käytettyinä yhdistelmä-DNA:n siirtämiseksi hiivasoluihin.

On olemassa useita patenttihakemuksia ja muita julkaisuja, jotka koskevat hiivasolujen transformointiin soveltuvia vektoreita, mainituilla plasmideilla transformoituneita hiivoja, mainituilla transformoituneilla hiivoilla tuotettuja polypeptidejä ja niiden tuotantomenetelmiä:

Yleinen hiivan transformointimenettely on selostettu julkaisuissa Hinnen et al. (1), Beggs et al. (2), Hicks et al. (3) ja Struhl et al. (4).

Julkaisussa Hitzeman et al. (5) on kuvattu ihmisen interferonigeenin ilmentymistä, kun geeni on liitetty *Saccharomyces cerevisiae* alkoholidehydrogenaasi 1:n (ADH1) DNA-palasten 5'-oheissekvensseihin plasmidissa, jolla on transformoitu hiivasolut.

Beggs et al. (6) selostavat *Saccharomyces cerevisiae* transformointia plasmidilla, joka sisältää kanin kromosomaalisen  $\beta$ -globiinigeenin. Julkaisussa on mainittu, että geenin transkriptio tapahtuu virheellisesti eikä primääristen  $\beta$ -globiinitranskriptien lomittumista voitu havaita.

Eukaryoottisten solujen, kuten hiivasolut ja nisäkässolut, sekatransformointia vieraalla DNA:lla, joka koodittaa polypeptidiä, ja joka on liitetty indusoivaan promoottoriin, ja ilman liitännäistä olevalla DNA:lla, joka tekee mahdolliseksi transformoitumattomien solujen tunnistamisen, sekä näiden valmistusmenetelmää on selostettu PCT-patenttihakemuksessa 81/02425 (7).

Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 48081 (8) on selostettu eukaryoottista toisiintumiskohtaa kooditta-

vaa DNA-sekvenssiä, eukaryoottisia vektoreita, jotka antavat mitoottisen stabiilisuuden pienellä kopiomäärällä ja sisältävät eukaryoottisen toisiintumiskohdan, sekä hiivasoluja, jotka on transformoitu mainituilla vektoreilla.

Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 45573 (9) on selostettu yhdistelmä-DNA-molekyylejä, joissa on mm. eukaryoottisessa isännässä autonomisesti toisiintuva segmentti, menetelmää niiden valmistamiseksi ja menetelmää, jolla voidaan suurella taajuudella transformoida eukaryoottisia soluja, esim. hiivasoluja, mainituilla yhdistelmä-DNA-molekyyleillä.

Saksan Offenlegungsschrift-julkaisussa 2923297 (10) ja ranskalaisessa patenttihakemuksessa 2458585 (11) on selostettu plasmideja, jotka sisältävät ovalbumiinigeenin, jota ohjaa *Escherichia coli*  $\beta$ -lac Z-geenin promootori, ja joilla voidaan transformoida hiivasoluja.

Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 11562 (12) selostetaan yhdistelmäplasmideja, joissa on bakteeriplasmidin DNA:ta, hiivan 2 $\mu$ -plasmidin DNA kokonaisuudessaan tai osaksi ja hiivan URA3-geeni, sekä hiivoja, jotka on transformoitu mainituilla yhdistelmäplasmideilla.

Viime vuosien aikana on tapahtunut suurta edistystä geenitekniikan alalla ja ensimmäiset menetelmät, joissa käytetään geneettisesti manipuloituja mikro-organismeja, erityisesti *Escherichia coli*-enterobakteerin kantoja, ovat nyt toiminnassa. Kuitenkin on olemassa tarve kehittää uusia ja parempia menetelmiä, erityisesti eukaryoottisia menetelmiä, joissa käytetään esim. hiivasoluja, jotka soveltuvat proteiinien tuottamiseen taloudellisesti ja suurella mittakaavalla teollisesti. Tällä hetkellä on tarjolla erilaisia hiivavektoreita geenien kloonaukseen. Jotta vieraat geenit ilmentyisivät tehokkaasti hiivassa, pitää rakennetta koodittavat sekvenssit yhdistää voimakkaisiin hiivapromootoreihin, joilla mielellään pitäisi-

si olla säätöominaisuuksia, jotka mahdollistavat geenin ilmentymisen ohjauksen ulkopuolelta käsin. Tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota hiivapromoottoreita, jotka täyttävät nämä vaatimukset. Lisäksi tämän keksinnön tarkoituksena on tarjota yhdistelmävektorieta, jotka sisältävät mainittuja promoottoreita ja vieraita rakennegeenejä, joita mainitut promoottorit ohjaavat.

1. DNA-palasia, jotka sisältävät *Saccharomyces cerevisiae*n happofosfataasin promoottoreita, ja niiden valmistus

Tämä keksintö tarjoaa äskettäin eristetyn *S. cerevisiae*n PHO5-promoottorin, jolla on aikaisempaan verrattuna paremmat ilmentämismominaisuudet, sekä menetelmän sen valmistamiseksi.

Tämän keksinnön mukainen promoottori on johdettu *Saccharomyces cerevisiae*n perimästä. Happofosfataasin ilmentymiseen *S. cerevisiae*ssa osallistuu ainakin kaksi rakennegeeniä (PHO3 ja PHO5) ja useita säätögeenejä (PHO2, PHO4, PHO80, PHO81, PHO81) (ks. esim. viite (13)). PHO5 ja PHO3 koodittavat säädeltävissä olevaa ja vastaavasti konstitutiivista hiivan happofosfataasia. PHO5-geeni on kytketty pois päältä, kun epäorgaanisen fosfaatin väkevyydet ovat suuria, ja se kytkeytyy päälle, kun epäorgaanista fosfaattia on liian vähän (tavallisesti suuressa määrin asianomaisissa fysiologisissa olosuhteissa); kun taas PHO3-geeni ilmentyy konstitutiivisesti pieninä pitoisuuksina. Pois tuotannosta kytkettävissä oleva entsyymi on glykosyloitunut ja sen molekyylipaino on noin 490 kilodaltonia (14).

Happofosfataasigeenejä ohjaavia promoottoreita ei ole aikaisemmin eristetty tai käytetty yhdistelmä-DNA-tekniikassa ja näin ollen niiden nukleotidisekvenssejä ei ole määritetty. Toisin kuin muiden viimeaikaisessa yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettyjen hiivapromoottorien (ADH1) kohdalla on asian laite, hiivan happofosfataasipromootto-

reita välittömästi seuraavat DNA-sekvenssit koodittavat signaalipeptidejä, joiden ajatellaan liittyvän erittymisprosessiin. Olisi edullista liittää vierasta proteiinia koodittava alue hiivan signaalisekvenssiin sen takaamiseksi, että proteiini kulkeutuu in vivo hiivan solukalvon läpi. Tämä vähentäisi isäntäsolun aiheuttamaa tuotteen hajoamista ja kontaminoitumista ja helpottaisi tuotteen talteenottoa.

Tähän asti yhdistelmä-DNA-tekniikassa käytettyihin promoottoreihin on liittynyt se haitta, että vastaavien geenien transkriptio on tapahtunut konstitutiivisesti. Ilmentynyt polypeptidi voi olla joko myrkyllinen hiivalle (fungisidinen vaikutus) tai se voi ainakin estää solujen lisääntymisen (fungistaattinen vaikutus) tai polypeptidi voi hajota entsyymaattisesti solun sisällä, erityisesti, jos se on alttiina hiivan proteaasien vaikutukselle pitkän aikaa. Kaikissa mainituissa tapauksissa halutun polypeptidin saanto on huono. Nämä haitat voidaan välttää käyttämällä PH05-promoottoria ja vektoreita, jotka sisältävät mainitun promoottorin. PH05-promoottori voidaan kytkeä pois päältä tai kytkeä takaisin päälle kokeita suorittavan henkilön toimesta vain kohottamalla tai laskemalla epäorgaanisen fosfaatin pitoisuutta väliaineessa. Näin ollen promoottori voi olla kytkettynä pois päältä hiivan eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana ja se voidaan kytkeä päälle aikaisen stationäärisen kasvuvaiheen kuluessa solutiheyden ollessa suurimmillaan, jolloin PH05-promoottorin ohjaama geeni ilmentyy. Tämä ominaisuus sekä siihen liittyvä suuria pitoisuuksia tuotettava transkriptio tekevät PH05-promoottorista edullisen tässä keksinnössä.

Tämä keksintö koskee erityisesti DNA-palasta, joka sisältää *S.cerevisiae* PH05-happofosfataasipromoottorin, sekä oheissekvenssejä.

Mahdollisesti *S. cerevisiae*en PHO5-promoottoria seuraa kokonaisena tai osana *S. cerevisiae*en PHO5:ttä koodittava signaalisekvenssi. Lisäksi mainittu DNA-palanen voi sisältää sekvenssejä, jotka ovat tarpeen mRNA:n tehokkaan translaation kannalta. Keksintö kattaa myös ne alafragmentit, joissa on säilynyt mainitun DNA-palasen promoottoritoiminta.

Keksinnön mukainen DNA-palanen voidaan valmistaa esimerkiksi seuraavalla tavalla:

- (A) valmistetaan happamen fosfataasin (PHO5) geeni täydentämällä happamen fosfataasin PHO5 suhteen vajaa *Saccharomyces cerevisiae*-hiivakanta suorittamalla transformointi plasmidi-DNA:lla, joka on saatu mainitun geenin villityyppikopion sisältävästä *S. cerevisiae*-geenikirjastosta, ja eristetään mainittu geeni,
- (B) valmistetaan saadun geenin alaklooneja ja
- (C) identifioidaan promoottorialueen sijainti edellämainituissa alaklooneissa ja eristetään restriktioentsyymikatkaisulla DNA-palaset, jotka olennaisesti koostuvat happamen fosfataasin (PHO5) promoottorista, ja alajaksojen valmistamiseksi saadut DNA-jaksot lyhennetään katkaisemalla restriktioendonukleaasilla tai eksonukleaasilla.

Tarkemmin sanottuna mainitun DNA-palasen valmistus sisältää seuraavat vaiheet:

- (1) *S. cerevisiae*en geenikokoelma rakennetaan käyttämällä villityyppistä *S. cerevisiae*-DNA:ta, joka on kloonattu bakteeri-*S. cerevisiae*-yhdistelmäplasmidiin (erityisesti *Escherichia coli*), joka sisältää tarvittavat merkkikohdat sekä bakteeri- että *S. cerevisiae*-solussa tapahtuvalle ilmentymiselle (sopivista merkkikohdista tarkemmin jäljempänä).
- (2) Valitaan kloonit, jotka sisältävät *S. cerevisiae*-happofosfataasi(PHO5)geenin, transformoimalla happofosfataasin (PHO5) suhteen vajaa *S. cerevisiae*-kanta käyttämällä edellämaitun kokoelman plasmidivarantoja.
- (3) Plasmidit, jotka sisältävät *S. cerevisiae*en happofosfataasi(PHO5)geenin, eristetään transformoiduista *S. cerevisiae*-soluista ja vahvistetaan transformoimalla takaisin *E. coli*in suorittamalla valinta bakteerin merkkikohdan fenotyypin ominaisuuden mukaan (esim. vastustuskyky ampicilliinin suhteen).



(2') Vaihtoehtoisessa lähestymistavassa geenikokoelma jaetaan alavarantoihin, joilla transformoidaan fosfataasin (PHO5) suhteen vajaat *S.cerevisiae*-kannat, ja (3') positiiviset alavarannot jaetaan edelleen ja suoritetaan niillä transformointi edelläkuvatulla tavalla, kunnes saadaan identifioituksi yksi ainoa kloni.

(4) Identifioidun kloonin plasmidi-DNA eristetään, hajotetaan sopivilla restriktioendonukleaaseilla ja palaset kloonataan uudestaan haluttuun *S.cerevisiae*-vektoriin.

(5) DNA-palaset, jotka sisältävät *S.cerevisiae*en happofosfataasi(PHO5)geenin, voidaan identifioida transformoimalla hiivan happofosfataasin (PHO5) suhteen vajaat *S.cerevisiae*-kannat mainituilla vektoreilla. Tämän toimenpiteen avulla voidaan happofosfataasigeenin rajat määrittää noin 300 emäsparin tarkkuudella.

(6) Identifioitujen palasten DNA-emäsjärjestyksen määrittämisen avulla voidaan paikantaa promoottorialueet, happofosfataasi(PHO5)proteiinia koodittavat alueet ja lisäksi restriktiokohta (dat), jotka voivat olla hyödyllisiä jatkokäsittelyssä, esim. leikattaessa pois DNA-sekvenssejä, jotka eivät ole välttämättömiä promoottorin toiminnalle, restriktioendonukleaasien avulla.

Riippuen restriktioendonukleaasien valinnasta voivat happofosfataasipromoottorin sisältävät DNA-palaset sisältää myös 3'- ja 5'-päissä alkuperäisiä oheissekvenssejä, jotka eivät vaikuta promoottorin toimintaan, mutta joita voidaan käyttää apuna sekvenssien liittämässä myöhemmissä kloonaustoimenpiteissä. Haluttaessa näitä lisäsekvenssejä voidaan lyhentää katkaisemalla restriktioendonukleaasien avulla (jos mahdollista) tai sopivan eksonukleaasin, esim. Bal31, avulla. Lisäksi palasiin voidaan liittää kemiallisesti syntetisoituja DNA-liitospolymeerejä, jotka mielellään sisältävät sopivan restriktionendonukleaasin tunnistuskohdan. Näin voidaan happofosfataasi(PHO5)promoottori edullisella tavalla liittää vierasta polypeptidiä koodittaviin alueisiin.

PHO5:ttä koodittavasta alueesta on myös mahdollista eristää ja/tai konstruoida DNA-palanen, joka sisältää *S.cerevisiae* happofosfataasi (PHO5)promoottorin ja siihen liittyvän signaalisekvenssin osaksi tai kokonaan. Liitettynä oikealla tavalla leikattuun vierasta polypeptidiä koodittavaan alueeseen ilmentyy saatu yhdistelmä-DNA *S.cerevisiae*ssa ja saadaan polypeptidejä, jossa on (PHO5) happofosfataasisignaalisekvenssejä tai fuusioituneita signaalisekvenssejä.

Tämän keksinnön mukaista *S.cerevisiae* (PHO5) happofosfataasipromoottoria voidaan käyttää ohjaamaan hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan, hiivan yhdistelmävektorin sisältämän alueen ilmentämistä.

## 2. Yhdistelmävektoreita, jotka sisältävät hiivan happofosfataasipromoottoreita, ja niiden valmistus

Tämä keksintö koskee myös hiivan yhdistelmävektoreita, jotka sisältävät DNA-jakson, joka koostuu olennaisesti *S.cerevisiae* happofosfataasin (PHO5) säädeltävissä olevasta promoottorista, ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan alueen, jota mainittu promoottori ohjaa.

Termeillä "vektori", "yhdistelmävektori", "DNA-sekvenssit" jne., joita käytetään tässä hakemuksessa, tarkoitetaan erityisesti kaksisäikeisiä DNA-ketjuja.

Kuitenkin yksisäikeiset DNA-ketjut kuuluvat myös mukaan. Vektorit ja yhdistelmävektorit voivat olla läsnä lineaarisessa tai, mielellään, rengasmuodossa.

Hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue (geeni), jota ohjaa joku edellämainituista promoottoreista, voidaan johtaa perimän DNA:sta tai cDNA:sta, joka on valmistettu mRNA-tietä käyttäen, tai se voidaan syntetisoida kemiallisesti. Hiivaan kuulumattomia polypeptidejä koodittavat alueet (geenit) ovat pe-

räisin viruksista, prokaryoottisista soluista tai eukaryoottisista soluista, korkeammat eukaryoottiset solut, erityisesti ihmisen solut, mukaanlukien. Isäntähiivasolussa ilmentyessään nämä geenit voivat tehdä mahdolliseksi lukuisien eri polypeptidien tuotannon, mukaanlukien glykosyloituneet polypeptidit, kuten entsyymit, joita voidaan käyttää esim. ravintoaineiden tuotannossa ja entsyymaattisissa reaktioissa kemiassa, ja ei-entsyymaattiset polypeptidit, esim. hormonit, polypeptidit, joilla on immunomodulatorisia, viruslääke- ja syöpälääkevaikutuksia, vasta-aineet, virusten antigeenit, rokotteet, hyytymätekijät, ruoka-aineet tms. Tällaiset geenit koodittavat esim. amylaaseja, proteaaseja, lysotsyymiä, virusten tymidiinikinaasia, renniiniä,  $\beta$ -laktamaasia, glukoosi-isomeraasia; sekretiiniä, tymosiiniä, relaksiiniä, kalsitoniinia, somatostatiinia, ihmisen ja naudan kasvuhormonia, insuliinia, luteinisoivaa hormonia, parakilpirauhashormonia, adrenokortikotropiinia,  $\beta$ -endotropiinia, melanosyyttejä stimuloivaa hormonia,  $\beta$ -lipotropiinia, urogastronia; interferonia, kuten ihmisen interferonia, esim. ihmisen leukosyytti-, lymfoblastoidi- tai fibroblastisoluista johdettua ihmisen interferonia  $\alpha$  tai  $\beta$  tai ihmisen interferonia  $\gamma$ ; lymfokiineja, kasvainten nekroositekijää; antirenniini-vasta-ainetta, maksatulehdus-A-viruksen antigeeniä, maksatulehdus-B-viruksen (HBV) pinta- ja ydinantigeenejä, maksatulehduksen non-A non-B viruksen antigeeniä, ihmisen kudosten yhteensopivuusantigeenejä, ruuan ja suusairausvirusten antigeenejä, influenssahemagglutiniinia, linturuttoviruksen hemagglutiniinia; seerumialbumiinia, ovalbumiinia, taumatiinia, egliineja tai plasminogeeniaktivaattoreita.

Valittu polypeptidiä koodittava alue voi haluttaessa sisältää signaalisekvenssin tai osan siitä. Kuten edellä mainittiin, tällöin voi syntyä fuusioitunut proteiini,

jossa on PHO5:n signaalisekvenssi tai yhdistelmäsignaali-sekvenssi, joka sisältää osan PHO5:n signaalisekvenssistä ja osan vieraan polypeptidin signaalisekvenssistä, sekä vieraan kypsän polypeptidin. Kummassakin tapauksessa ne yhdistelmät ovat edullisia, jotka johtavat signaalisekvenssin lohkeamiseen vieraan polypeptidin kypsymisen yhteydessä.

Happofosfataasi(PHO5)promoottorin ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan alueen lisäksi keksinnönmukaiset yhdistelmävektorit voivat sisältää lisä-DNA-ketjun(juja), jotka eivät ole välttämättömiä tai ovat vähemmän tärkeitä promoottorin toiminnan kannalta, so. polypeptidiä koodittavan alueen ilmentymisen kannalta, mutta jotka voivat suorittaa tärkeitä toimintoja, esim. mainituilla yhdistelmävektoreilla transformoitujen hiivasolujen lisääntymisen yhteydessä. Lisä-DNA-sekvenssi(t) voi olla johdettu prokaryoottisista ja/tai eukaryoottisista soluista, ja ne voivat sisältää kromosomaalisia ja/tai kromosomien ulkopuolisia DNA-sekvenssejä. Esimerkiksi lisä-DNA-sekvenssit voivat olla peräisin (tai muodostua) plasmidi-DNA:sta, kuten bakteeriperäisestä tai virusperäisestä plasmidi-DNA:sta, virus-DNA:sta ja/tai kromosomaalisesta-DNA:sta, kuten bakteerien, hiivojen tai korkeampien eukaryoottien kromosomaalisesta DNA:sta.

Lisä-DNA-sekvenssit sisältävät mielellään hiivan toisiintumisen alkukohdan ja hiivaa varten selektiivisen geneettisen merkkikohdan. Hiivan toisiintumisen alkukohdan, esim. kromosomaalisen autonomisesti toisiintuvan segmentin (segmentin osia) sisältävät yhdistelmävektorit säilyvät kromosomin ulkopuolella hiivasolussa

transformoinnin jälkeen ja toisiintuvat autonomisesti mittoosin yhteydessä. Yhdistelmävektoreita, jotka sisältävät sekvenssejä, jotka ovat homologisia hiivan  $2\mu$ -plasmidin DNA:n kanssa, voidaan käyttää yhtä hyvin. Nämä yhdistelmävektorit intergoituvat rekombinoitumalla  $2\mu$ -plasmideihin, jotka jo ovat läsnä solussa, ja toisiintuvat autonomisesti.  $2\mu$ -sekvenssit ovat erityisen sopivia plasmideilla tapahtuvassa suurtaajuustransformoinnissa ja voivat saada aikaan suuria kopiomääriä.

Lisäksi keksinnönmukaiset yhdistelmävektorit voivat sisältää sellaisen geenin DNA-sekvenssin, joka on läsnä isäntähiivan kromosomissa (esim. PH05), ja jonka promoottori voi olla liittynään hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavaan alueeseen. Homologisen sekvenssin ansiosta koko vektori voidaan rekombinaatiolla siirtää stabiilisti isäntäkromosomiin. Näin ollen lisääntymisen yhteydessä syntyvät jälkeläissolut säilyttävät geneettisen materiaalin jopa ilman selektiivistä painetta.

Hiivan selektiivisenä merkkikohtana voidaan käyttää mitä tahansa merkkigeeniä, joka tekee mahdolliseksi transformanttien valitsemisen merkkikohtaan fenotyypin ilmentymisen johdosta. Hiivalle sopivia merkkikohtia ovat erityisesti ne, jotka ilmentävät vastustuskyvyn antibiootin suhteen, tai auksotrofisten hiivamutanttien ollessa kyseessä geenit, jotka täydentävät isännän vajeita. Tällaiset geenit antavat esim. vastustuskyvyn antibioottisen sykloheksimidin suhteen tai antavat prototropian auksotrooppiselle hiivamutantille, esim. URA3-, LEU2-, HIS3- tai TRP1-geeni. On myös mahdollista käyttää merkeinä rakennegeenejä, jotka ovat yhteydessä autonomisesti toisiintuvaan segmenttiin edellyttäen, että transformoitava isäntä on auksotrooppinen tuotteelle, jonka merkki ilmentää.

Keksinnönmukaisissa yhdistelmävektoreissa läsnäolevat lisä-DNA-sekvenssit voivat mielellään sisältää myös toi-

siintumisen alkukohdan ja selektiivisen merkkikohdan bakteeri-isäntää, erityisesti *Escherichia coli*, varten. On olemassa edullisia seikkoja, jotka liittyvät *E. coli* toisiintumiskohdan ja *E. coli* merkkikohdan läsnäoloon hiivan yhdistelmävektorissa: Ensinnäkin suuret määrät yhdistelmä-vektori-DNA:ta voidaan saada kasvattamalla ja vahvistamalla *E. coli*a, ja toiseksi yhdistelmävektorien rakentaminen on edullista suorittaa *E. coli*ssa käyttämällä hyväksi koko *E. coli*in perustuvaa kloonausteknologiaa. *E. coli*-plasmidit, kuten pBR322 tms., sisältävät sekä *E. coli*in toisiintumiskohdan että *E. coli*in geneettisiä merkkikohtia, jotka antavat vastustuskyvyn antibiooteille, esim. tetrasyklinille ja ampisilliinille, ja niitä voidaan edullisesti käyttää yhdistelmähiivavektorien osina.

Lisä-DNA-sekvensseistä, jotka sisältävät esim. toisiintumisen alkukohdat ja geneettiset merkkikohdat hiiva- ja bakteeri-isäntää varten (ks. edellä), käytetään tätä lähtien nimitystä "vektori-DNA", joka yhdessä PH05-happofosfataasipromoottorin ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan alueen kanssa muodostavat keksinnön mukaisen yhdistelmävektorin.

Yhdistelmävektorit voidaan valmistaa alalla tunnetuilla menetelmillä, esim. liittämällä vektori-DNA:han DNA-jakso, joka koostuu olennaisesti *S. cerevisiae*in happofosfataasin (PH05) säädeltävissä olevasta promoottorista, ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, jota mainittu promoottori ohjaa.

Voidaan käyttää kartaltaan sopivaa lineaarista tai mielellään rengasmaista vektori-DNA:ta, esim. bakteeri-plasmidi-DNA:ta tms. (ks. edellä), jossa on vähintään yksi katkaisukohta, mielellään kaksi tai useampia katkaisukohtia. Vektori-DNA voi mielellään jo sisältää toisiintumisen alkukohdat ja geenimerkit hiiva- ja/tai bakteeri-isännälle. Vektori-DNA katkaistaan sopivalla restriktio-

endonukleasilla. Katkaistu DNA liitetään DNA-palaseen, joka sisältää happofosfataasipromoottorin, ja DNA-palaseen, joka koodittaa hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä. Ennen promoottorin ja polypeptidiä koodittavan alueen liittämistä tai sen jälkeen (tai yhtä hyvin samanaikaisesti) voidaan myös liittää toisiintumisen alkukohdat ja/tai merkkikohdat hiiva- tai bakteeri-isäntää varten. Joka tapauksessa katkaisu- ja liittämisolosuhteet valitaan sillä tavalla, että ne eivät millään tavalla häiritse vektori-DNA:n ja promoottorin oleellisia toimintoja. Yhdistelmävektori voidaan rakentaa peräkkäisesti tai liittämällä yhteen kaksi DNA-palasta, jotka sisältävät kaikki mielenkiinnon kohteena olevat sekvenssit.

Useita menetelmiä voidaan käyttää DNA-palasten liittämiseksi in vitro. Tylpät päät (täydellisistä emäspareista koostuvat DNA-kahdenteet), jotka saadaan aikaan tietyillä restriktioendonukleaseilla, voidaan suoraan liittää T4 DNA-ligaasia käyttämällä. Tavallisemmin DNA-palaset liitetään yhteen yksisäikeisten kohesiivisten päidensä välityksellä ja suljetaan kovalenttisesti DNA-ligaasilla, esim. T4 DNA-ligaasi. Tällaiset "kohesiiviset päät" voidaan muodostaa katkaisemalla DNA toisentyypisillä endonukleaseilla, jotka tuottavat lomittaisia päitä (DNA-kahdenteen kaksi säiettä on katkaistu eri kohdista muutaman nukleotidin etäisyydeltä toisistaan). Yksisäikeisiä pätkiä voidaan myös muodostaa lisäämällä nukleotideja tylppiin päihin ja lomittaisia päitä käyttämällä terminaalista transferaasia ("homopolymeerinen hännänmuodostus") tai yksinkertaisesti syömällä pois toista säiettä tylppäpäisestä DNA-palasesta sopivan eksonukleasin, kuten  $\lambda$ -eksonukleasin, avulla. Vielä eräs tapa muodostaa lomittaisia päitä on se, että tylppäpäiseen DNA-palaseen liitetään kemiallisesti syntetisoitu DNA-sidoksenmuodostaja, joka sisältää tunnis-

tuskohdan lomittaisia päitä muodostavalle endonukleaa-  
sille ja saatu DNA hajotetaan vastaavalla endonukleaa-  
silla.

Ilmentyäkseen tehokkaasti hiivaperäistä tai hii-  
vaan kuulumatonta proteiinia koodittavan geenin tulee  
sijaita oikealla tavalla niiden sekvenssien suhteen, jotka  
sisältävät transkriptio- (happofosfataasipromoottori) ja  
luentafunktiot (ribosomaalinen sidoskohta). Ensinnäkin  
promoottorin sisältävän DNA-segmentin liittyminen polypep-  
tidiä koodittavaan alueeseen pitää saada tapahtumaan oi-  
keassa suunnassa. Jos kaksi suuntaa on mahdollista, voi-  
daan oikea määrittää tavanomaisella restriktioanalyy-  
sillä. Yhdistelmävektorit, jotka sisältävät väärin  
suunnatun geeniliitännäisen, voidaan suunnata uudestaan  
leikkaamalla geeniliitännäinen irti sopivalla restriktio-  
endonukleaaasilla ja liittämällä geeni uudestaan yhdistel-  
mävektoripalaseen. Joka tapauksessa väärä suunta voi-  
daan välttää liittämällä toisiinsa kaksi DNA-segmenttiä,  
joilla on päissä eri restriktiokohdat. Lisäksi yhdistel-  
mävektori pitäisi olla rakennettu niin, että transkriptio al-  
kaa ja päättyy oikein. Viimeksimainitussa kohdassa trans-  
kription tulisi mielellään päättyä DNA-sekvenssiin, joka  
on johdettu hiivan kromosomaalisesti DNA:sta tai hiivan  
2 $\mu$ -plasmidista. Mielellään transkriptio päättyy DNA-  
sekvenssiin, joka sisältää hiivan PH05-geenin  
transkription loppumisen signaalin. Toiseksi pitää  
olla olemassa oikea lukukehys. Yleensä sekä promoottori-  
alueen että polypeptidiä koodittavan alueen nukleotidi-  
sekvenssi tunnetaan ennen liittämistä tai ne voidaan hel-  
posti määrittää (esim. viite (15)), joten oikean lukuke-  
hysen aikaansaamisessa ei ole ongelmia. Lisäksi voidaan  
tarvita tiettyjä sekundäärisiä DNA-rakenteita geenin  
vielä tehokkaamman ilmentymisen saavuttamiseksi.



Edullinen alue PHO5-happofosfataasipromoottorin liittämiseksi vieraaseen koodittavaan alueeseen on laajan happofosfataasi-mRNA:n alun ja happofosfataasia koodittavan alueen ATG:n välissä, noin 40 emäsparin pituudella laajan PHO5-mRNA:n alun ja PHO5-happofosfataasia koodittavan alueen ATG:n välillä. Tällä alueella olevaa liitosta varten pitäisi vieraalla koodittavalla sekvenssillä olla oma ATG luennan aloittamista varten tai muuten se pitää saada aikaan lisäämällä synteettinen oligonukleotidi.

Koska korkeampien organismien monet polypeptidit ilmentyvät pääasiassa esipolypeptideinä, joissa on signaalipeptidi liittyneenä kypsän polypeptidin N-päähän, voi olla hyödyllistä sisällyttää signaalisekvenssi geeniliitännäiseen. Sopivia signaalisekvenssejä ovat sellaiset, jotka ovat luonnollisesti liittyneinä polypeptidi-geeniin, joka on tarkoitus ilmentää, tai happofosfataasipromoottoriin. Vaihtoehtoisesti voidaan rakentaa yhdistettyjä signaalisekvenssejä liittämällä toisiinsa osa happofosfataasin signaalisekvenssistä ja osa polypeptidin signaalisekvenssistä. Jos halutaan saada aikaan kypsän polypeptidin ilmentyminen suoraan, pitää poistaa signaalisekvenssit tai niiden osat, jotka mahdollisesti seuraavat promoottorialuetta tai mahdollisesti edeltävät kypsää polypeptidiä koodittavaa aluetta, esim. suorittamalla hajotus eksonukleaasilla, esim. Bal31.

Välituotteet, kuten vektorit, joista vielä puuttuu yksi tai useampia välttämättömiä toimintaosia, sekä lopulliset keksinnönmukaiset yhdistelmävektorit voidaan siirtää bakteeri-isäntään, erityisesti *E. coli*in, edellämainituista syistä (esim. saadaan tuotetuksi suuret määrät välituotteita tai yhdistelmävektoreita, vastaavasti). Bakteerivektorit, kuten *E. coli*n plasmidi pBR322 ja sen palaset, jotka sisältävät bakteeriaalisen toisiintumisen alkukohdan ja geeni merkkikohdan(t), ovat parhaita vektoreita tästä syystä. Käytettäessä tällaista bakteeri-

vektoria, kuuluu lopullisten hiivan yhdistelmävektorien valmistukseen myös vaiheet, joissa liitetään mukaan geneettinen merkkikohta ja toisiintumisen alkukohta hiivaa varten.

DNA-jaksot, jotka voidaan liittää bakteerivektoriin niin, että muodostuu keksinnönmukaisia yhdistelmävektoreita, kuten autonomisesti toisiintuva jakso (ars, ks. (4)), hiivan 2 $\mu$ -plasmidin jaksoja (2) tai hiivan merkki-DNA (ks. 16), voidaan eristää hiivan kromosomaalisesta DNA:sta ja hiivan 2 $\mu$ -plasmidin DNA:sta, vastaavasti, tavalliseen tapaan. Hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava geeni voidaan eristää kromosomista peräisin olevasta DNA:sta tai DNA:sta, joka on saatu kromosomin ulkopuolelta, jolloin johtaminen tapahtuu cDNA:sta, joka on valmistettu mRNA-tietä käyttäen (ks. edellä) tavanomaisilla menetelmillä (esim. 17, 18), tai se voidaan syntetisoida kemiallisesti.

Yhdistelmävektorien valmistus koostuu seuraavista vaiheista:

- (1) valmistetaan *S.cerevisiae* geenikokoelam käyttämällä villityyppistä hiiva-DNA:ta,
- (2) eristetään (PH05) happofosfataasigeeni, ja kloonataan se bakteeriplasmidiin, kuten pBR322, tai vastaavaan biologisesti toimivaan yksikköön, jossa on sen ehyen toisiintumisen alkukohdan ja valinnan merkkikohdan sisältävä palanen,
- (3) liitetään mainittuun plasmidiin hiivan geneettinen merkkikohta, kuten TRP1-geeni, ja hiivan toisiintumisen alkukohta, kuten kromosomaalinen autonomisesti toisiintuva jakso tai vaihtoehtoisesti hiivan 2 $\mu$ -plasmidijaksoja, sopivaan restriktiokohtaan,
- (4) liitetään hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä, kuten ihmisen interferonia tai HBV-pintaantigeeniä, koodittava DNA-jakso sillä tavalla, että

PH05-happofosfataasipromoottori ohjaa mainittua polypeptidiä koodittavaa jaksoa, ja

(5) polypeptidiä koodittavan alueen alapuolelle mahdollisesti liitetään PH05-geenin transkription päätösmerkki.

Yhtä lailla on mahdollista vaihtaa vaiheiden, kuten 3 - 5, järjestystä esim. siten, että ensin vaiheessa 2 saatuun yhdistelmäplasmidiin liitetään polypeptidiä koodittava jakso ja sen jälkeen liitetään geneettinen merkikohda ja toisiintumisen alkukohta hiivaa varten.

Ennen hiivan geneettisen merkkikohdan, hiivan toisiintumisen alkukohdan ja polypeptidiä koodittavan jakson liittämistä voidaan ei-välttämättömiä toimintoja koodittavat alueet, kuten happofosfataasin rakennegeeni, leikata pois vaiheessa 2 saadusta yhdistelmäplasmidista.

Erityisesti hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava DNA-jakso liitetään PH05-happofosfataasipromoottoriin (vaihe 4) alueelle, joka on laajan happofosfataasi-mRNA:n alun ja happofosfataasia koodittavan alueen ATG:n välissä. Mahdollisesti liitetään synteettinen liitospolymeeri, jossa on tarvittava katkaisukohta, jotta saadaan aikaan sidos mainitun DNA-jakson ja happofosfataasipromoottorin välille.

Yhdistelmävektorivälituotteet, joissa on *S.cerevisiae* PH05-happofosfataasin promoottori, mutta ei hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavaa aluetta, ovat myös tämän keksinnön kohteena ja ne voidaan valmistaa edelläkuvattujen peräkkäisten vaiheiden (1), (2), (3) ja mahdollisesti (5) avulla, jolloin happofosfataasipromoottori mielellään päättyy alueeseen, joka on laajan happofosfataasi-mRNA:n alun ja happofosfataasigeenin ATG:n välissä ja/tai mahdollisesti liitetään synteettinen sidospolymeeri, jossa on tarvittava katkaisukohta, jotta voidaan liittää hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava DNA-jakso.

3. Hiivan transformointi yhdistelmävektoreilla, joissa on hiivan happofosfataasipromoottori

Tämä keksintö koskee lisäksi menetelmää transformoituneiden *S.cerevisiae*-solujen valmistamiseksi, jotka kykenevät tuottamaan hiivaperäisiä tai hiivaan kuulumattomia polypeptidejä, jossa menetelmässä transformoidaan *S.cerevisiae* millä tahansa kappaleessa 2 kuvatulla yhdistelmävektorilla.

*S.cerevisiae*en transformointi hybridivektoreilla voidaan suorittaa kirjallisuudesta tunnetuilla menetelmillä, esim. menetelmällä, jota on kuvattu julkaisussa Hinnen et al.

(1). Tämä menetelmä voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen:

(1) Hiivan soluseinän poisto.

(2) "Alastomien" hiivasolujen (sferoplastit) käsittely transformointi-DNA:lla PEG:n (polyetyleeniglykolin) ja  $Ca^{2+}$ -ionien läsnäollessa.

(3) Soluseinän regenerointi ja transformoitujen solujen valinta kiinteässä agarkerroksessa.

Edulliset menetelmät:

ad (1): Hiivan soluseinä poistetaan käyttämällä erilaisia glukosidaasivalmisteita, kuten etanan suolinesteitä (esim. Glusulase<sup>R</sup> tai Helicase<sup>R</sup>) tai mikro-organismeista saatuja entsyymiseoksia (esim. Zymolyase<sup>R</sup>) osmoottisesti stabiloiduissa liuoksissa (esim. 1 M sorbitoli).

ad (2): Hiivan sferoplastit aggregoituvat PEG:n läsnäollessa ja tapahtuu sytoplasmakalvojen paikallisia yhtymisiä. "Yhtymisolosuhteiden" aikaansaaminen on ratkaisevaa ja useista transformoituneista hiivasoluista tulee diploidisia tai triploidisia transformoinnin kuluessa. Menettelytapoja, jotka mahdollistavat yhteenliittyneiden sferoplastien valinnan, voidaan käyttää transformanttien rikastamiseen, so. transformoituneet solut voidaan seu-

loa ennalta valittujen yhtymistuotteiden suhteen.  
ad (3): Koska hiivasolut, joissa ei ole soluseiniä, eivät pysty jakautumaan, pitää soluseinät regeneroida. Tämä regenerointi on edullista suorittaa peittämällä sferoplastit agariin. Esimerkiksi sferoplasteihin voidaan sekoittaa sulaa agarua (noin 50°C). Jäähdyttämällä liuos hiivan kasvulämpötilaan (noin 30°C), saadaan kiinteä kerros. Tämän agarkerroksen on tarkoitus estää nopea diffuusio ja välttämättömien makromolekyylien poistuminen sferoplasteista ja näin helpottaa soluseinän regeneroitumista. Kuitenkin soluseinien regeneroituminen voidaan myös saavuttaa (vaikka pienemmällä teholla) kasvattamalla sferoplasteja valmiiden agarkerrosten pinnassa.

Regenerointiagar on edullista valmistaa siten, että on mahdollista regeneroida soluseinät ja valita transformoituneet solut samanaikaisesti. Koska valintamerkeinä käytetään tavallisesti hiivageenejä, jotka kooditavat aminohapon biosynteesiä (ks. kappale 2), regenerointi on edullista suorittaa hiivan suhteen minimaalista ranintoalustaa sisältävässä agarissa. Kuitenkin, jos tarvitaan erittäin suuria regeneroitumistehoja, saattaa kaksivaiheinen prosessi olla edullinen: (1) Soluseinät regeneroidaan ravinnerikkaalla alustalla ja (2) transformoituneet solut valitaan kasvattamalla solukeroksen toisinto uudestaan selektiivisillä agarlevyillä.

Jos yhdistelmävektori ei sisällä merkkigeeniä, transformoituneet solut voidaan identifioida vaihtoehtoisilla menetelmillä. Tällaisia menetelmiä ovat mm. in situ-hybridisointi radioaktiivisesti merkityllä DNA-palaselalla, joka on homologinen yhdistelmävektorin sekvenssien kanssa (esim. menetelmällä Hinnen et al. (1)), in situ-immunomääritykset, edellyttäen, että geeniliitännäisen tuotteen vasta-aine on saatavissa, tai muut seulontamenetelmät, joissa mitataan transformointiplasmidin(ien) koodittamia geenituotteita.

Vaihtoehtoisesti voidaan hiiva sekatransformoida keksinnönmukaisella yhdistelmävektorilla ja toisella vektorilla, joka sisältää hiivan geneettisen merkkikohdan. Jos kahdella eri vektorilla on samoja DNA-sekvenssejä (nämä voivat olla vektoreissa olevia bakteerisekvenssejä), voi tapahtua yhtymimen, joka johtaa yhtyneeseen, valittavissa olevaan hybridimolekyyliin.

Keksintöön liittyy siten myös *S.cerevisiae*-isäntäsoluja, jotka ovat transformoituneet yhdistelmävektoreilla, jotka sisältävät hiivan happofosfataasi (PHO5) promoottorin ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan alueen.

#### 4. Transformoituneiden hiivasolujen viljely ja polypeptidisynteesin aikaansaaminen

Hiivasolut, jotka ovat transformoituneet autonomisesti toisiintuvilla plasmideilla, esim. plasmideilla, joissa on hiivan 2 $\mu$ -plasmidin DNA, ovat taipuvaisia vaihtelevassa määrin menettämään siirretyn yhdistelmäplasmidin (ks. (16)). Tästä syystä tällaisia hiivasoluja pitää kasvattaa selektiivisissä olosuhteissa, so. olosuhteissa, jotka vaativat plasmidin koodittaman geenin ilmentymistä kasvua varten. Useimmat tällä hetkellä käytössä olevat selektiiviset merkit ovat geneejä, jotka koodittavat aminohappo- tai puriinisynteesin entsyymejä. Näin ollen pitää käyttää synteettisiä minimikasvualustoja, joista puuttuu vastaava aminohappo tai puriiniemäs. Kuitenkin voidaan yhtä hyvin käyttää joitakin geneejä, jotka antavat vastustuskyvyn antibiootin suhteen (esim. geneejä, jotka antavat vastustuskyvyn sykloheksimidin tai aminoglykosidi G 418:n suhteen (21)). Hiivasoluja, jotka ovat transformoituneet vektoreilla, jotka antavat vastustuskyvyn antibiootin suhteen, voidaan kasvattaa ravinnerikkaissa alustoissa, jotka sisältävät vastaavaa antibioottia, jolloin voidaan saavuttaa nopeampi kasvu ja suuremmat solutiheydet.

Hiivasolut, jotka ovat transformoituneet kromosomeihin integroituneella DNA:lla, eivät vaadi selektiivisiä kasvuolosuhteita. Nämä transformoituneet solut ovat riittävän stabiileja kasvatettaviksi ilman selektiivistä painetta. Tästä syystä näitä soluja voidaan edullisesti kasvattaa ravinnerikkaissa kasvualustoissa.

Hiivasolut, jotka sisältävät yhdistelmäplasmideja, joissa on rakenteellisen happofosfataasin promoottori (esim. PHO3), ilmentävät mainittuun promoottoriin liittyvän hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavan geenin ilman indusointia. Jos kuitenkin hiivaperäisen tai hiivaan kuulumattoman proteiinin geeni on säädeltävissä olevan happofosfataasin promoottorin PHO5 ohjauksessa, kasvualustan koostumus pitää muuntaa siten, että saadaan maksimaaliset määrät mRNA-kopioita, so. kasvualustassa pitää olla pieni epäorgaanisen fosfaatin väkevyys, jotta PHO5-promoottori kytkeytyy päälle.

#### 5. Ilmentyneen polypeptidin eristäminen ja puhdistus

Keksintö koskee myös menetelmää hiivaperäisen tai hiivaan kuulumattoman polypeptidin, kuten ihmisen interferonin tai HBV-pinta-antigeenin, tuottamiseksi, jossa menetelmässä vaiheessa

(1) viljellään sopivissa ravinneolosuhteissa *S.cerevisiae*-kantaa, joka on transformoitunut yhdistelmävektorilla, jossa on hiivan happofosfataasin (PHO5) promoottori ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, ja vaiheessa

(2) eristetään ja puhdistetaan mainittu polypeptidi.

Tämän keksinnön mukaisia transformoituneista *S.cerevisiae*-soluja viljellään nestemäisessä kasvualustassa, joka sisältää assimiloituvia hiili- ja typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja.

Voidaan käyttää erilaisia hiililähteitä. Edullisia

hiililähteitä ovat assimiloituvat hiilihydraatit, kuten glukoosi, maltoosi, mannitoli tai laktoosi, tai aseatit, joita voidaan käyttää joko yksin tai seoksina. Sopivia typpilähteitä ovat esim. aminohapot, kuten kasaminohapot, peptidit ja proteiinit ja niiden hajoamistuotteet, kuten tryptoni, peptoni ja lihautteet, ja edelleen hiivauute, mallasuute, maissinliotusvesi, sekä ammoniumsuolat, kuten ammoniumkloridi, -sulfaatti tai -nitraatti, joita voidaan käyttää joko yksin tai sopivina seoksina. Sopivia epäorgaanisia suoloja ovat mm. natriumin, kaliumin, magnesiumin ja kalsiumin sulfaatit, kloridit, fosfaatit ja karbonaatit.

Ravinnealusta voi sisältää lisäksi kasvua edistäviä aineita ja/tai sellaisia aineita, jotka aiheuttavat valintapainetta, jotta yhdistelmäplasmidia ei menetettäisi. Kasvua edistäviä aineita ovat esim. hivenaineet, kuten rauta, sinkki, mangaani tms. tai yksittäiset aminohapot.

Jos yhdistelmäplasmidi sisältää geenin, joka antaa vastustuskyvyn antibiootin suhteen, tällöin solut, jotka sisältävät tällaisen yhdistelmäplasmidin, pysyvät elossa kasvualustassa, johon on lisätty kyseistä antibioottia, kun taas solut, jotka ovat menettäneet mainitun yhdistelmäplasmidin, sekä kontaminoivat antibiootin suhteen herkkät mikro-organismit eivät säily hengissä. Jos yhdistelmäplasmidi sisältää geenin, joka antaa prototropian aukso-trooppiselle hiivamutantille, esim. LEU2- tai HIS3-geenin, voidaan saada aikaan valintapaine, kun geenituote, kuten leusiini tai histidiini, jätetään pois ravinnealustasta.

Jos viljelty hiivasolu on transformoitunut yhdistelmäplasmidilla, joka sisältää säädeltävissä olevan happofosfataasin promoottorin PHO5, orgaanisen fosfaatin pitoisuus täytyy pitää alhaisena ravinnealustassa esiviljelyfaasin jälkeen, jotta saavutetaan maksimaalinen määrä mRNA-kopioita ja sen seurauksena maksimaalinen määrä polypeptidejä.



Viljely suoritetaan käyttämällä tavanomaisia menetelmiä. Viljelyolosuhteet, kuten lämpötila, kasvualustan pH ja käymisaika, valitaan siten, että muodostuu mahdollisimman suuret määrät polypeptidejä. Valittua hiivakantaa kasvatetaan mielellään aerobisissa olosuhteissa pinanalaiskasvatuksena ravistelemalla tai sekoittamalla lämpötila-alueella noin 25 - 35°C, mielellään noin 30°C:ssa, pH-alueella 4 - 8, esim. noin pH:ssa 7, noin 4 - 20 tuntia, mielellään siihen asti, kunnes on saavutettu maksimaalinen polypeptidimäärä.

Kun transformoituneet hiivasolut ovat kasvaneet tyydyttävään solutiheyteen, on ilmentyneen polypeptidin ensimmäinen talteenottovaihe se, että polypeptidi vapautetaan solun sisältä. Useimmissa menetelmissä soluseinä poitetaan ensin entsyymaattisella hajotuksella glukosidaasien avulla (ks. kohta 3). Sen jälkeen näin saadut sferoplastit käsitellään pinta-aktiivisilla aineilla, kuten Triton. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää mekaanisia voimia, kuten hankausvoimaa (esim. X-puristinta, ranskalaista puristinta) tai ravistelua lasikuulien kanssa, solujen rikkomiseksi. Saatu polypeptidiseos voidaan rikastaa halutun polypeptidin suhteen tavanomaisilla menetelmillä, kuten saostamalla ammoniumsulfaatilla tai trikloorietikkahapolla, geelielektroforeesilla, dialyysillä, kromatografisesti, esim. ioninvaihtokromatografisesti, geelisuodatuskromatografiolla, HPLC- tai käänteisfaasi-HPLC-kromatografiolla tms. Esipuhdistettu tuote voidaan puhdistaa lopullisesti esim. vasta-aineaffiniteettikromatografiolla. Periaatteessa puhdistus (lukuunottamatta solujen hajottamista) voidaan suorittaa menetelmällä, jonka Staehelin et al (22) ovat kehittäneet ihmisen leukosyytti-interferonin puhdistamiseksi.

Halutun polypeptidin eristäminen ja puhdistaminen voidaan suorittaa esimerkiksi seuraavalla tavalla:  
(1) hiivasolut rikotaan glukosidaasin avulla,

- (2) suoritetaan käsittely pinta-aktiivisella aineella,
- (3) suurin osa ei-proteiinimateriaalista poistetaan käsittelemällä polyetylenei-imiinillä,
- (4) polypeptidit saostetaan kyllästämällä liuos ammoniumsulfaatilla,
- (5) suoritetaan dialyysi sopivassa puskuriseoksessa,
- (6) suoritetaan pylväskromatografia DEAE-selluloosalla,
- (7) suoritetaan affiniteettikromatografia monoklonaalisessa vasta-aineypylväässä ja
- (8) molekyylit erotellaan koon perusteella sopivassa Sephadex<sup>R</sup>-pylväässä.

Jotta saataisiin aikaan riittävän puhdas tuote, saattaa olla tarpeen suorittaa jatkopuhdistus, esim. kationin- tai anioninvaihtokromatografia, adsorptio hydroksyyliapatiittiin, kääteisfaasi-HPLC jne. Toisaalta voidaan yksi tai useampi edellämaituista vaiheista jättää pois, mikäli mahdollista, tai käsittelyvaiheiden järjestystä voidaan muuttaa.

Siinä tapauksessa, että hiiva erittää halutun polypeptidin periplasmaattiseen tilaan, voidaan käyttää yksinkertaisempaa menetelmää. Polypeptidi voidaan ottaa talteen soluja rikkomatta siten, että soluseinä poistetaan entsyymaattisesti tai käsittelemällä kemiallisilla aineilla, esim. tiolireagensseilla tai EDTA:lla, jolloin soluseinä vaurioituu ja polypeptidi vapautuu. Jos polypeptidi erittyy kasvualustaan, se voidaan ottaa suoraan talteen siitä.

Tämän keksinnön mukaisesti saatavissa olevat polypeptidit ovat hyödyllisiä ja arvokkaita hoidettaessa ihmisillä ja eläimillä esiintyviä sairauksia tai ehkäistäessä niitä (esim. interferoni, HBV-pinta-antigeeni jne.) tai niitä voidaan käyttää elintarvikkeina, rehuina, rehujen lisäaineina tai entyymaattisissa reaktiossa (ks. 2 edellä). On selvää, että näihin kuuluvat myös luonnossa esiintyvät näiden polypeptidien johdannaiset, kuten proteolyttisesti katkaistut polypeptidit ja/tai glykosyloituu-

neet polypeptidit.

Keksintö koskee erityisesti DNA-jaksoja ja yhdistelmävektoreita ja niiden valmistusmenetelmiä, sekä transformoituneiden hiivojen ja polypeptidien valmistusmenetelmiä, kuten esimerkeissä on selotettu.

Seuraavassa tämän keksinnön eri toteutustapoja koskevassa selostuksessa viitataan liitteenä oleviin piirroksiin, joissa:

Kuva 1 esittää osittaista restriktioendonukleaasikarttaa plasmideista pJDB207/PHO5, PHO3 ja pBR322/PHO5Bam-Sal, joita käytetään PHO5-geenin lähteenä ja DNA-sekvenssinmäärityksessä vastaavasti.

Kuva 2 esittää PHO5- ja PHO3-happofosfataasigeenien paikantamista 5,1 Kb:n BamHI-jaksossa, joka on eristetty hiivan geenikokoelmasta.

Kuvat 3a ja 3b esittävät PHO5:n ja PHO3:n promoottorialueiden DNA-sekvenssejä vastaavasti.

Kuva 4 esittää plasmidien p30IFN2(8<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(8<sub>1</sub>) rakentamisen kaaviollisesti.

Kuva 5 esittää PHO5-promoottorin DNA:n liittämisen IFN-8<sub>1</sub>-cDNA:han rakennettaessa plasmidia p30IFN1(8<sub>1</sub>).

Kuva 6 esittää plasmidin pJDB207/IFN2'(8<sub>1</sub>) rakentamista.

Kuva 7 on kaavio sellaisten yhdistelmä-DNA-molekyylien rakentamisesta, jotka sisältävät Namalwa-cDNA:ta.

Kuva 8 on kaavioesitys menetelmistä, joita käytetään syntetisoitaessa IFN-mRNA:n suhteen spesifinen 13-määrinen DNA-alue.

Kuva 9 on kaavioesitys sellaisten kloonien identifioinnista, jotka sisältävät ihmisen lymfoblastoidi-IFN-cDNA:ta.

Kuvat 10 - 14 esittävät plasmidien CG-pBR322/HLycIFN-1'b, - $\beta_1$ , -4 $_1$ , -8 $_1$  ja -5 $_1$  cDNA-liitännäisten DNA- ja aminohapposekvenssejä.

Kuva 15 esittää plasmidin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -1 rakentamista ja kuva 16 esittää sen cDNA-liitännäisen DNA- ja aminohapposekvenssiä.

Kuva 17 esittää plasmidin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 rakentamista ja kuva 18 esittää sen cDNA-liitännäisen DNA- ja aminohapposekvenssiä.

Kuva 19 esittää plasmidin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -2 DNA- ja aminohapposekvenssiä.

Kuva 20 on kaavioesitys plasmidin p31 rakentamisesta, joka sisältää PHO5:n päätösjakson.

Kuva 21 esittää PHO5:n transkription päätösjakeen Sau3A-PstI nukleotidisekvenssiä.

Kuva 22 on kaavioesitys plasmidien p31/IF1(5 $_1$ ), p31/IF2(5 $_1$ ), p31/IF3(5 $_1$ ) ja p31/IF2(1'b) rakentamisesta.

Kuva 23 on kaavioesitys plasmidin p31/IF(8 $_1$ ) rakentamisesta.

Kuva 24 on kaavioesitys oikean liitoksen PHO5-HBVs rakentamisesta plasmidiin pBR322/PHO5/HBVs $\Delta$ 14.

Kuva 25 esittää DNA-sekvenssiä PHO5-promoottoria ja HBVs:a koodittavan alueen liitospohdan läheisyydessä plasmidissa pBR322/PHO5/HBVs.

Kuva 26 on kaavioesitys hiivan ilmentämisplasmidien pJDB207/PHO5/HBVs $\Delta$ 14 ja pJDB207/PHO5/HBVs $\Delta$ 14t rakentamisesta.

Kuva 27 on kaavioesitys hiivan ilmentämisplasmidien pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$  ja pJDB207/IF2(5 $_1$ ) $\Delta$ 72 rakentamisesta.

Kuva 28 esittää plasmidien pJDB207/IF2(5 $_1$ ) $\Delta$ 72 ja pJDB207/IF2(5 $_1$ ) $\Delta$ 82 nukleotidisekvenssejä XhoI-liitospohdassa IFN-5 $_1$ :n 3'-päähän ei-luetun alueen ja PHO5:n transkription päätösalueen välissä.

Kuva 29 on kaavioesitys plasmidin CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -3)-252 rakentamisesta.

Kuva 30 esittää plasmidien CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -2)-261 ja CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258 rakenteita.

Kuva 31 esittää kaaviollisesti PHO5:n signaalisekvenssin poistamisen ilmentämisplasmidista p31 ja erityisesti plasmidin p31/R rakentamisen.

Kuva 32 on kaavioesitys kloonikokoelmasta, joka saatiin kuvassa 31 hahmotellulla menetelmällä.

Kuvat 33 ja 34 esittävät BamHI-EcoRI-restriktiojaksojen nukleotidisekvenssejä, jotka sisältävät PHO5/R- ja PHO5/Y-promoottorialueet.

Kuvat 35 - 37 ovat kaavioesityksiä menetelmästä, jolla IFN- $\alpha$ -3-, - $\alpha$ -2- ja - $\alpha$ -1-DNA liitetään plasmidiin p31/R.

Kuva 38 on kaavioesitys plasmidin pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) rakentamisesta.

Keksintöä valaistaan, mutta ei rajoiteta seuraavien esimerkkien avulla.

Esimerkeissä käytetään seuraavia lyhenteitä:

EtBr: etidiumbromidi

BSA: naudan seerumialbumiini

DTT: 1,4-ditiotreitoli (1,4-dimerkapto-2,3-butaanidioli)

EDTA: etyleenidiamiinitetraetikkahappo

SDS: natriumdodekyylisulfaatti

TNE: liuos, jossa on 100 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 1 mM EDTA

Tris.HCl: tris-(hydroksimetyyli)-aminometaani, pH säädetty suolahapolla

PMSF: fenyyli metaanisulfonyylifluoridi

TE: liuos, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 1 mM EDTA

Esimerkki 1: Hiivan geenikokoelman aikaansaaminen

30  $\mu$ g villihiivatyypin Saccharomyces cerevisiae-kannan S288C DNA:ta (23), jonka kokonaismolekyylipaino on suuri, inkuboidaan 30 minuuttia 37<sup>o</sup>C:ssa 2 yksikön kanssa EcoRI-metylaasia (New England Biolabs) 250  $\mu$ l:ssa EcoRI-mety-

lointipuskuria, kuten valmistaja on suositellut. DNA saostetaan etanolilla, suspendoidaan 500  $\mu$ l:aan puskuria, jossa on 25 mM Tris.HCl pH 8,5 ja 2 mM MgCl<sub>2</sub> (EcoRI\*-puskuri) (24), ja hajotetaan EcoRI:lla (Boehringer), kunnes DNA-jaksojen kokojakautuman maksimi on alueella 30 - 50 kb (kun  $\lambda$ DNA hajotetaan XhoI:llä, saadaan sopivat 33 kb ja 17 kb merkit). Hiivan DNA, joka on hajotettu EcoRI\*-olosuhteissa, fraktioidaan koon perusteella sakkaroosigradientissa (5 - 20 % sakkaroosia puskurissa, jossa on 10 mM Tris.HCl pH 7,5 ja 1 mM EDTA) 6 tuntia nopeudella 38 000 1/min SW 40-roottorissa. Gradientin päältä kerätään 40 kpl 0,4 ml jaetta. Jae 16 sisältää DNA-jaksot, joiden pituus on 30 - 40 kb. Tämän jakeen sisältämä DNA (3  $\mu$ g) saostetaan etanolilla ja liitetään 16 tunnin aikana 15°C:ssa 15  $\mu$ l:n kokonaistilavuudessa 1  $\mu$ g:aan kosmidivektoria pYc1 (25), joka on tehty lineaariseksi EcoRI:llä. Liittäminen suoritetaan 300 yksiköllä T4 DNA-ligaasia (New England Biolabs) käyttämällä valmistajan kuvaamaa puskurisysteemiä. DNA pakataan in vitro bakteriofaagi - $\lambda$  :aan (26) ja kootut faagit siirretään E. coli-kantaan HB101 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, pro<sup>-</sup>, recA<sup>-</sup>). Siirron tehokkuus on noin 5000 ampisilliinin suhteen vastustuskykyistä pesäkettä per  $\mu$ g pYc1-vektoria. 3000 amp<sup>R</sup>-pesäkettä poimitaan ja kasvatetaan erikseen mikrotitrauslevyjen koloissa LB-alustassa (10 g Bacto-Tryptonea (Difco), 5 g Bacto-hiivauutetta (Difco), 10 g NaCl), jossa on 100  $\mu$ g/ml ampisilliiniä.

Esimerkki 2: Säädettävissä olevan happofosfataasin geenin PHO5 eristäminen

Geenikokoelman kopioita kasvatetaan LB-agarlevyillä (LB-alusta + 15 g/l agaria), joissa on 100  $\mu$ g/ml ampisilliiniä. 500 pesäkkeen solumateriaali pestään levyiltä ja kerätään yhteen eriksi. DNA eristetään yksittäisistä eristä seuraavalla tavalla:

Solut otetaan talteen sentrifugoimalla (Sorvall, GSA-roottori, 10 min, 6000 1/min, 4°C), suspendoidaan uudelleen 100 ml:aan TE-liuosta (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ja sentrifugoidaan uudestaan edellämainituissa olosuhteissa. Solupelletti suspendoidaan uudestaan 3 ml:aan Tsuc-liuosta (50 mM Tris.HCl, pH 7,5, 25 % (paino/tilavuus) sakkaroosia) ja siirretään SS-34-polypropyleenisiin Sorvall-putkiin. Kaikki seuraavat vaiheet suoritetaan jään päällä. Lisätään 0,3 ml lysotsyymiliuosta (10 mg/ml, ostettu Worthingtonilta, 11 000 U/mg), 5 min kuluttua lisätään 1,2 ml EDTA (500 mM, pH 8,0) ja vielä 5 min kuluttua lisätään 4,8 ml pinta-aktiivista ainetta (0,1 % Triton X-100 (merck), 50 mM EDTA, 50 mM Tris.HCl, pH 8,0). 5 minuutin kuluttua lyaatti sentrifugoidaan esijäähdytetyssä SS-34-roottorissa (40 min, 4°C). Emälius poistetaan huolellisesti ja lisätään kiinteätä CsCl (8,3 g CsCl per 8,7 ml emäliuosta). Kun on lisätty etidiumbromidi (Sigma) (lopullinen väkevyys 1 mg/ml emäliuosta), liuos siirretään 13,5 ml:n Quick Seal-polyallomeeriputkiin (Beckman) ja sentrifugoidaan Beckman Ti50-roottorissa 40 tuntia nopeudella 40 000 1/min. Kaksi fluorisoivaa kaistaa voidaan nähdä pitkäaaltoisella UV-valolla (366 nm). Alempi kaista sisältää erittäin kiertynyttä plasmidi-DNA:ta, joka otetaan talteen puhkaisemalla putki sivusta 2 ml:n ruiskulla (18G-neula). Etidiumbromidi poistetaan uuttamalla 5 kertaa yhtä suurilla tilavuuksilla isopropanolia (kyllästetty CsCl:lla) ja tuote siirretään 30 ml:n Corex-putkiin. Lisätään 2,5 tilavuutta TE-liuosta ja DNA saostetaan etanolilla. Sitten liuosta pidetään 12 - 15 tuntia -20°C:ssa. Saostunut DNA otetaan talteen sentrifugoimalla Sorvall HB-4-roottorissa 30 min nopeudella 12 000 1/min 0°C:ssa ja liuotetaan uudestaan 200 µl:aan TE-liuosta. 100 ml:sta viljelmää saadaan 50 - 100 µg yhdistelmäplasmidi-DNA:ta.

Näistä eristä saadulla plasmidi-DNA:lla transformoidaan *S. cerevisiae*-kanta AH216 (a, his3, leu3, pho3, pho5) noudattamalla menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Hinnen et al. (1). Hiivatransformanteista kasvatetaan jäljennökset levyillä, joissa on alhainen  $P_i$ -minimikasvualusta (kuten "Difcon minimaalinen kasvualusta ilman aminohappoja" täydennettynä 20 g/l glukoosia, mutta valmistettu aineosista Difcon reseptin mukaan (Difco Manual, Difco Laboratories, Detroit, USA) paitsi, että käytetään 0,03 g/l  $KH_2PO_4$  + 1 g/l KCl eikä 1 g/l  $KH_2PO_4$ ) ja värjätään happofosfataasiaktiivisuuden suhteen laittamalla päälle värjäysagar (1% Difco-agar 100 mM asetaattipuskurissa pH 4,0, 2 mg/ml Fast Blue B-suolaa (Serva) ja 0,2 mg/ml  $\alpha$ -naftyyylifosfaattia (Serva)). Pেসäkkeet, joissa on funktionaalinen PHO5-geeni, värjäytyvät punaisiksi, koska geenin toiminta kytkeytyy päälle alhaisessa  $P_i$ -alustassa. Kun alaeriä kerätään yhteen (17), löytyy geenikokoelmasta 3 riippumatonta kloonia, joilla on säädettävissä oleva happofosfataasiaktiivisuus.

Yhdelle näistä klooneista (pG7) suoritetaan jatkoanalyysi. Yhdistelmäplasmidin koko on 42 kb. pG7:n EcoRI- ja BamHI-palaset jatkokloonataan plasmideihin pBR322/HIS3 (16) ja pJDB207 (28) vastaavasti. Restriktiokatkaisut suoritetaan valmistajan suosittelemalla tavalla (New England Biolabs) ja liittämiset suoritetaan 20  $\mu$ l:ssa käyttämällä 150 U T4 DNA-ligaasia (New England Biolabs) ja 20  $\mu$ g/ml yksittäisiä hajotettuja plasmideja (New England Biolabsin suosittelimissa olosuhteissa). 5,1 kb:n BamHI-palaneen, joka on osa 8 kb:n EcoRI-palasesta, jatkokloonataan hiivavektoriin pJDB207, ja sen jälkeen kun on suoritettu hiivakannan AH216 transformointi, tämä yhdistelmäplasmidi (pJDB207/PHO5, PHO3, ks. kuva 1) tuottaa korkean fosfataasiaktiivisuuden päällekytkeytymisolosuhteissa (alhainen  $P_i$ -) (PHO5-geeni) ja matalan aktiivisuustason normaalissa hiivan minimaalisessa kasvualustassa (PHO3-geeni ilmentyy).



Esimerkki 3: PHO5- ja PHO3-geenin paikantaminen ja DNA:n sekvenssinmääritys

a. PHO5-geeni

PHO3:n ja PHO5:n paikantamisessa BamHI-palasen sisällä käytetään hyväksi Sau3A:n katkaisukohtien ryhmitelmää ja ainoata esiintyvää PstI-kohtaa. Kun BamHI-palanen hajotetaan restriktioendonukleasilla Sau3A (New England Biolabs), saadaan 6 palasta (A-F, kuva 2). Kun Sau3A:lla osittain hajotettu tuote jatkokloonataan itsessään toisiintuvan hiivavektorin pJDB207 BamHI-kohtaan, saadaan plasmideja, joissa on erilaisia Sau3A-jaksoyhdistelmiä. Sitten näillä plasmideilla transformoidaan pho3,pho5-mutanttihiiwa *S. cerevisiae* AH216. Transformanttien happofosfataasiaktiivisuus tarkistetaan sen jälkeen, kun niitä on kasvatettu joko matala- $P_i$ -alustaa tai normaalia minimaalista alustaa sisältävillä levyillä. Kloonit, jotka sisältävät ainakin Sau3A-palaset A ja B (kuva 2, no:t 1-4) ilmentävät happofosfataasin samalla tasolla (kvalitatiiviset arviot, kun on peitetty happofosfataasia värjäävällä agarilla esimerkissä 2 kuvatulla tavalla) kuin koko 5,1 kb:n BamHI-palanen. Ilmentymistä säädelään tavallisesti kasvualustan sisältämällä epäorgaanisen fosfaatin väkevyydellä. Kloonit, joissa on ainoastaan Sau3A-palanen A (kuva 2, no:t 5,6) ilmentävät matalia happofosfataasitasoja, johon ei vaikuta epäorgaanisen fosfaatin väkevyyden kasvualustassa. Tämä ilmaisee sen, että Sau3A-palasen A sisältämä informaatio riittää konstitutiivisen happofosfataasin (PHO3) ilmentymiseen. Sau3A-palanen B (kuva 2, no. 7) ei yksin johda minkään happofosfataasin ilmentymiseen, ei päältä pois kytkevissä eikä päälle kytkevissä olosuhteissa. Kuitenkin alaklooni, jossa on BamHI-kohdan ja PstI-kohdan välinen täydellinen sekvenssi (kuva 2, no. 10) osoittaa happofosfataasin säädeltyä, mutta ei konstitutiivista syntetisoitumista. Tämän alakloonin pitää silloin sisältää hiivan PHO5-geeni (16).

PHO5-geenin tarkka sijainti määritetään DNA-senvenssinmäärityksellä Maxamin ja Gilbertin menetelmällä (15).

632 bp sisältävä BamHI-SalI-restriktiopalanen kloonataan plasmidiin pBR322 (ks. kuva 1) korvaamalla sen BamHI-SalI-palanen, joka ulottuu kohdasta 375 kohtaan 650 (pBR322:ssa käytetty merkitsemistapa), käyttämällä hajotus- ja liittämisolosuhteita, jotka on selostettu edellä (kaikki entsyymit ovat New England Biolabsilta). BamHI-SalI-DNA-liitännäisen DNA-jaksot on radioaktiivisesti merkitty asymmetrisesti 5'-päistään seuraavista kohdista: BamHI (-541), Sau3A (-200) ja SalI (+82), (numeroinnin suhteen ks. kuva 3a). 623 bp sisältävän BamHI-SalI-DNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 3a. Siitä ilmenee, että liitännäinen sisältää PHO5-promoottorialueen ja osan PHO5-fosfataasiproteiinia koodittavasta alueesta.

#### b. PHO3-geeni

PHO3-geenin tarkka paikka määritetään DNA-sekvenssinmäärityksellä käyttämällä apuna käsikirjaa "M13 cloning and DNA sequencing system", julkaisija New England Biolabs. 416 bp sisältävä (5')PstI-RsaI(3')-palanen jatkokloonataan vektoreihin M13mp8 ja M13mp9 (49) käyttämällä ainoita PstI- ja SmaI-restriktiokohtia. 416 bp sisältävän PstI-RsaI-DNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 3b. Siitä ilmenee, että liitännäinen sisältää PHO3-promoottorialueen ja osan PHO3-happofosfataasiproteiinia koodittavasta sekvenssistä.

Esimerkki 4: Plasmidin p30 rakentaminen (ks. kuva 4)

#### a) BalI-katkaisukohdan eliminointi plasmidista pBR322

Kuvassa 4 esitetty kaavio edellyttää ainoan BalI-katakisukohdan eliminoimista plasmidista pBR322. 3 µg plasmidi pBR322 hajotetaan täydellisesti restriktiendonukleaaseilla BalI (BRL) ja PvuII (Biolabs) valmis-

tajan ohjeiden mukaan. *BalI*:llä ja *PvuII*:lla hajotettu pBR322 johtaa kahteen restriktiopalaseen, joiden koot ovat 3738 bp ja 622 bp. Kyseiset kaksi palasta erotetaan toisistaan matalalla sulavassa agarosigeelissä (*Sigma*) (1%), joka on tehty TBE-puskuriin (90 mM *Tris.HCl* pH 8,3, 2,5 mM EDTA, 90 mM boorihappoa). DNA-kaistat värjätään etidiumbromidilla ja tehdään näkyviksi pitkäaaltoisella UV-valolla allonpituudella 366 nm. Se agarosipala, joka sisältää 3738 bp pituisen jakson, leikataan irti geelistä, geeli nesteytetään 65°C:ssa, säädetään 500 mM NaCl-pitoisuuteen ja inkuboidaan 20 minuuttia 65°C:ssa. Lisätään yksi tilavuus fenolia (tasapainotettu pitoisuuteen 10 mM *Tris.HCl* pH 7,5, 1mM EDTA, 500 mM NaCl). Vesifaasi uutetaan kahdesti uudelleen fenonilla ja kerran kloroformilla. DNA saostetaan 2,5 tilavuudella kylmää absoluuttista etanolia ja otetaan talteen sentrifugoimalla. Pelletti pestään kylmällä 80-prosenttisellä etanolilla ja kuivataan vakuuissa. DNA suspendoidaan uudestaan TE-liuokseen väkevyyteen 0,15 mg/ml.

Eristetyssä 3738 bp sisältävässä DNA-palasesa on kaksi tylppää päätä, jotka aiheutuvat *BalI*:llä ja *PvuII*:lla suoritettusta kaksoishajotuksesta. DNA saatetaan renkaan muotoon liittämällä tylpät päät yhteen. 0,6 µg DNA:ta inkuboidaan yön yli huoneenlämpötilassa 30 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM *Tris.HCl* pH 7,5, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 4 mM ATP ja 900 U T4 DNA-ligaasia (*Biolabs*). 5 µl erät liittämisseosta lisätään 50 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikelpoisia *E. coli* BH101-soluja, jotka oli käsitelty menetelmällä Mandel et al. (29). Seosta pidetään jäällä 5 minuuttia, sen jälkeen sitä inkuboidaan 2 minuuttia 37°C:ssa ja jätetään 19 minuutiksi huoneenlämpötilaan enenkuin suoritetaan viljely LB-agarlevyillä, joissa on 100 µg/ml ampisilliiniä. Poimitaan kuusi amp<sup>R</sup>-pesäkettä ja niitä kasvatetaan erikseen 100 ml:ssa LB-alustaa (kuten edellä,

mutta ilman agaria), jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan soluista esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. Hajotustuotteet, jotka on saatu käsittelemällä plasmidit HaeIII:lla (ostettu Biolabsista, hajotusolosuhteet valmistajan suosittelemat), PvuII:lla ja BalI:llä, analysoidaan 1,5-prosenttisessä agarosigeelissä, joka on tehty TBE-puskuriin. Katkaisukohtakartta ja vastamuodostuneen liitoksen ennakoitu koko viittaavat siihen, että plasmidit ovat identtisiä ja sisältävät kaikki pBR322:n sekvenssit lukuunottamatta BalI-PvuII-palasta. Näissä plasmideissa ei ole BalI-katkaisu-kohtaa, ja niistä käytetään nimitystä pBR322ΔBalI.

b) Hiivan PHO5:n ja PHO3:n sisältävän BamHI-restriktiopalasen (5,1 kb) kloonaus plasmidiin pBR322ΔBalI

pJDB207/PHO5,PHO3 (ks. kuva 1) sisältää hiivan 5,1 kb:n BamHI-liitännäisen, jossa on säädeltävissä olevan ja konstitutiivisen hiivan happofosfataasin geenit (PHO5 ja PHO3). pJDB207/PHO5,PHO3 sekä plasmidi pBR322ΔBalI hajotetaan restriktioendonukleaasilla BamHI. Täydellisen hajoamisen tapahduttua enstyymi inaktivoidaan pitämällä 2 min 65°C:ssa. Kumpikin DNA saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris.HCl pH 8,0, väkevyyteen 0,2 mg/ml kukin. 0,5 µg kutakin kahdesta BamHI:lla hajotetusta DNA:sta yhdistetään ja liitetään toisiinsa 20 µl:ssa liittämispuskuria (kuten New England Biolabs on suositellut), jossa on 300 U T4 DNA-ligaasia, reaktioajan ollessa 20 tuntia 15°C:ssa. 5 µl:n erät liittämisseosta lisätään 50 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä E. coli HB101-soluja ja transformointi suoritetaan esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. Transformoitujen E. colisolujen vastustuskyky ampicilliinin ja tetrasykliinin suhteen tutkitaan. Kahdeksan amp<sup>R</sup>,tet<sup>R</sup>-pesäkettä eristetään ja kasvatetaan 100 ml:ssa LB-alustaa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA eristetään

soluista (ks. esimerkki 2). Kun suoritetaan katkaisu BamHI:llä, havaitaan, että 4 plasmidia sisältää 5,1 kb:n liitännäisen sekä 3,7 kb:n vektoripalasen (pBR322 $\Delta$ BalI). Kun suoritetaan katkaisu Sall:llä (New England Biolabs), saadaan selville liitetyn 5,1 kb:n palasen suunta: kahdessa plasmidissa on liitännäinen kuvan 4 mukaisessa suunnassa. Yhdelle niistä annetaan nimitys p30. PHO5,PHO3-geenien transkriptio 5,1 kb:n liitännäisessä tapahtuu vastapäivään, kuten kuvassa 4 on esitetty.

Esimerkki 5: Vieraan DNA:n liittäminen plasmidiin p30 (ks. kuva 4)

a) EcoRI-BalI-palasen (3,9 kb) eristäminen plasmidista p30 (A-palanen)

10  $\mu$ g plasmidin p30 DNA:ta katkaistaan restriktioendonukleaasilla BalI. Suoritetaan uutto fenolilla ja klororomilla ja DNA saostetaan etanolilla. DNA suspendoidaan uudestaan 100  $\mu$ l:aan TE-puskuria. Hajotustuotteet erotetaan toisistaan preparatiivisella, matalalla sulavalla agarosigeelillä (0,8 %) (Sigma). 5,1 kb:n palanen, joka sisältää plasmidin p30 vektoriosan, eluoidaan geelistä esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. DNA puhdistetaan adsorboimalla se DE52-ioninvaihtopylvääseen (Whatman) laimeaa suolaliuosta sisältävässä puskurissa (150 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 8,0, 1mM EDTA) ja eluoimalla sen jälkeen väkevää suolaliuosta sisältävällä puskurilla (1,5 M NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 8,0 ja 1 mM EDTA). DNA saostetaan etanolilla ja sen jälkeen katkaistaan edelleen EcoRI:llä (Boehringer). 3,9 kb:n EcoRI-BalI-restriktiopalanen erotetaan sen jälkeen preparatiivisella, matalalla sulavalla agarosigeelillä (0,8 %) ja otetaan talteen esimerkissä 4a kuvatulla tavalla ja saostetaan etanolilla. Tätä DNA-jaksoa kutsutaan A-palaseksi.

b) HaeIII-EcoRI-palasen (602 bp) eristäminen plasmidista CG-p-BR322/HLycIFN-8<sub>1</sub> (B-palanen)

*E. coli*-kantaa HB-101 CG-pBR322/HLycIFN-8<sub>1</sub> (ks. esimerkki 10 E) kasvatetaan 100 ml:ssa LB-alustaa, johon on lisätty 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja plasmidi eristetään esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. 9 µg HLycIFN-8<sub>1</sub>-DNA:ta hajotetaan täysin restriktioendonukleaasilla HaeIII. Hajotustuotteet erotetaan toisistaan preparatiivisella, matalalla sulavalla agarosigeelillä (0,8 %). 940 bp:n HaeIII-palanen leikataan irti ja eluoidaan agarosigeelistä esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. DNA puhdistetaan DE52:lla, kuten esimerkissä 5a on kuvattu, ja katkaistaan sen jälkeen EcoRI:llä. 602 bp:n EcoRI-HaeIII-palanen puolestaan erotetaan preparatiivisella, matalalla sulavalla agarosigeelillä (0,8 %), otetaan talteen esimerkissä 4a kuvatulla tavalla ja saostetaan etanolilla. Tätä DNA-jaksoa kutsutaan B-palaseksi.

c) A-palasan ja B-palasan liittäminen yhteen (ks. kuva 5)

Kyseiset kaksi restriktiopalasta voidaan liittää yhteen lomittaisista EcoRI-päistä ja tylpistä BalI- ja HaeIII-päistä vastaavasti, jolloin syntyy rengasmainen molekyyli, jossa on yksi ainoa EcoRI-kohta ja BalI-HaeIII-liitos, joka katkeaa HaeIII:lla (mutta ei katkea BalI:llä).

Liittäminen suoritetaan puskurisysteemissä, jossa on 60 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP ja 300 yksikköä T4 DNA-ligaasia, reaktioajan ollessa 16 tuntia 23<sup>o</sup>C:ssa ja DNA-väkevyyden 20 µg/ml A-palasta ja 3 µg/ml B-palasta ja kokonaistilavuuden 10 µl.

d) *E. coli* HB101:n transformointi yhteenliitetyillä palasilla

2 µl:n erät liitosseosta (esimerkki 5c) lisätään 50 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä *E. coli* HB101-soluja (ks. esimerkki 4a). Sitten seoksia kasvatetaan LB-agarlevyillä, joihin on lisätty 100 µg/ml ampicilliiniä. Levyjä inkuboidaan 16 tuntia 37<sup>o</sup>C:ssa.

Näin saadaan noin 300 ampisilliinin suhteen vastustuskykyistä *E. coli* HB101-pesäkettä. Kahdeksasta ampisilliinin suhteen vastustuskykyisestä pesäkkeestä eristetään plasmidi-DNA, suoritetaan analyysi ja niiden rakenne määritetään vertaamalla *EcoRI*:llä ja *HaeIII*:lla saatujen restriktiopalasten liikkuvuutta standardi DNA:han (bakteriofaagi  $\lambda$ :n DNA, joka on hajotettu *HindIII*:lla (New England Biolabs), p30-plasmidi-DNA, joka on hajotettu *HaeIII*:lla ja *EcoRI*:llä). Kun liitoskohtien rakenne on todettu, saadaan 5 plasmidia, joissa on oikea rakenne. Yhdelle näistä plasmideista, joissa on PHO5-promootori liittyneenä 8<sub>1</sub>'-interferonipolypeptidiä koodittavaan alueeseen (ks. kuva 5) annetaan nimitys p30IFN1(8<sub>1</sub>).

Esimerkki 6: Hiivan toisiintumisen alkukohdan ja selektiivisen merkkikohdan lisääminen (ks. kuva 4)

a) *EcoRI*-palasen (1,5 kb) eristäminen plasmidista Yrp7 ja sen liittäminen plasmidiin p30IFN1(8<sub>1</sub>)

Liittämisreaktion helpottamiseksi 1,5 kb:n *EcoRI*-restriktiopalanen puhdistetaan. Plasmidi Yrp7 (4) leikataan *EcoRI*:llä, saadut kaksi palasta erotetaan toisistaan 0,8-prosenttisessa agarosigeelissä ja 1,5 kb:n palanen, joka sisältää hiivan autonomisesti toisiintuvan jakson ja hiivan TRP1-geenin, puhdistetaan ja eristetään esimerkiksi 4a kuvatulla tavalla. Liittäminen suoritetaan (New England Biolabsin ehdottamalla tavalla) käyttämällä 20  $\mu\text{g/ml}$  *EcoRI*:llä leikattua p30IFN1(8<sub>1</sub>)-plasmidia ja 10  $\mu\text{g/ml}$  Yrp7:stä saatua 1,5 kb:n *EcoRI*-restriktiopalasta ja 100 yksikköä T4-ligaasia.

b) *E. coli* JA 194:n transformointi yhteenliitetyillä palasilla

Plasmidit, jotka sisältävät hiivan TRP1-geenin voidaan suoraan valita transformoimalla *E. coli* *trpC*:n mutanttikanta JA 194 (*trpC*, *leuB*, B1). *E. coli* *trpC*-geeni koodittaa *E. coli* N-(5'-fosforibosyyli)antranilaatti-isome-

raasia. *E. coli* trpC-mutantit voidaan täydentää hiivan TRP1-geenillä (4). *E. coli*-kannan JA 194 transformointi suoritetaan samoin kuin *E. coli* HB101:n (ks. esimerkki 4a) kohdalla on selostettu, mutta seuraavin muunnoksien: ennen agarlevyille levittämistä solujen annetaan toipua 1 ml:ssa LB-alustaa 60 minuuttia 37°C:ssa; solut pestään kerran *E. coli* M9:n minimaalisella kasvualustalla (30) ja levitetään M9:n minimaaliselle kasvualustalle, johon on lisätty B1-vitamiinia (1 µg/ml) ja L-leusiinia (20 mg/ml). Levyjä inkuboidaan 2 vuorokautta 37°C:ssa. Näin saadaan noin 1000 tryptofaanin suhteen prototrofista *E. coli*-pesäkettä.

c) Yhdistelmäplasmidien eristäminen ja tunnistaminen

Trp<sup>+</sup>-pesäkkeet puhdistetaan LB-levyillä, joihin on lisätty 100 µg/ml ampicilliinia. Yksittäiset pesäkkeet poimitaan ja plasmidit erotetaan esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. Puhdistetut plasmidit analysoidaan mittaamalla niiden restriktiopalasten koot, jotka on saatu katkaisemalla EcoRI-, HindIII-, PstI- ja BglII-entsyymillä (Biolabs). Näin saadaan kaksi eri plasmidia, jotka sisältävät 1,5 kb:n EcoRI-restriktiopalasen kyseisissä kahdessa mahdollisessa suunnassa (ks. kuva 4). Niille annetaan nimitykset p30IFN2(8<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(8<sub>1</sub>), kuten kuvaan 4 on merkitty.

Esimerkki 7: *Saccharomyces cerevisiae* RH971:n transformointi ja interferonituotannon aikaansaaminen

Plasmidit p30IFN2(8<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(8<sub>1</sub>) siirretään kukin *Saccharomyces cerevisiae*-kantaan RH971 (a, trp1, leu2, his4) samoin kuin on kuvattu julkaisussa Hinnen et al. (1). 1 µg plasmidi-DNA:ta lisätään 100 µl:aan sferoplastisuspensiota ja seos käsitellään polyetyleeniglykolilla julkaisussa (1) kuvatulla tavalla. Sferoplastit sekoitetaan 10 ml:aan regenerointiagarua ja le-



vitetään hiivan minimaalista kasvualustaa sisältäville levyille, joissa ei ole leusiinia. Kun on inkuboitu noin 3 vuorokautta, saadaan noin 1000 transformoitunutta solua.

Yksi ainoa hiivapesäke poimitaan hiivan transformointilevyiltä (nimeltään *Saccharomyces cerevisiae* RH971/p30IFN2(8<sub>1</sub>) ja /p30IFN2'(8<sub>1</sub>), vastaavasti) ja sitä kasvatetaan 10 ml:ssa hiivan minimaalista kasvualustaa 100 ml:n Erlenmeyer-pullossa 24 tunnin ajan 30°C:ssa nopeudella 200 1/min solutiheyteen noin  $2-3 \times 10^7$  solua/ml. Solut pestään kerran 20 ml:lla alhaisen  $P_i$ :n minimaalista kasvualustaa. 3 ml uudelleensuspendoituja soluja siirrostetaan 300 ml:aan alhaisen  $P_i$ :n minimaalista kasvualustaa ja 300 ml:aan normaalia minimaalista kasvualustaa, vastaavasti, 1000 ml:n Erlenmeyer-pulloissa. Inkubointi suoritetaan 30°C:ssa nopeudella 160 1/min. PH05-promoottorin induktiota seurataan mittaamalla happofosfataasiaktiivisuuden esiintyminen kokonaisuudessa soluissa menetelmällä, jota Toh-e et al. ovat kuvanneet (31). Soluja kasvatetaan tiheyteen noin  $1-2 \times 10^7$  solua/ml (26-30 tunnin inkubointi)

Esimerkki 8: Hiivasolu-uutteiden valmistus ja intertefonitiitterin määrittäminen

300 ml:n kasvualustasta (ks. esimerkki 7), jonka solutiheys on  $1-2 \times 10^7$ /ml, kerätään solut talteen sentrifugoimalla Sorvall GSA-roottorissa 5 minuuttia nopeudella 8000 1/min 4°C:ssa. Solut pestään kerran 100 ml:lla vettä ja suspendoidaan uudelleen 6 ml:aan jääkylmää rikkomisseosta (0,1M kaliumfosfaattipuskuri pH 7,4, 1% (tilavuusosina) Triton X-100, 0,0001M PMSF (Merck)) ja siirretään 30 ml:n corex-putkeen. Suspensiota sentrifugoidaan vielä 5 minuuttia Sorvall SS-34-roottorissa nopeudella 8000 1/min 4°C:ssa ja suspendoidaan uudelleen 3 ml:aan rikkomisseosta 0°C:ssa. Solususpensioon lisä-

tään 4 g lasihelmiä (halkaisija 0,4 mm) ja suspensiota ravistellaan Vortex Mixerissä (Scientific Instruments Inc., USA) täydellä nopeudella 30 sekuntia ja sen jälkeen sitä jäädytetään 1 minuutti jäähauteella. Tämä ravistelu-toimenpide toistetaan 5 - 10 kertaa, kunnes yli 90 % soluista on rikkoutunut (tarkistetaan valomikroskoopilla). Rikkoutunut solumateriaali ja lasihelmet poistetaan liuoksesta sentrifugoimalla 10 minuuttia nopeudella 8000 1/min Sorvall HB-4-roottorissa. Emäliuos siirretään Eppendorf-putkiin, jäädytetään nestemäisessä työssä ja säilytetään  $-60^{\circ}\text{C}$ :ssa. Interferoniaktiivisuus määritetään Armstrongin menetelmällä (32) käyttämällä ihmisen CCL-23-soluja ja rakkulastomatiittivirusta (VSV) ärsytysviruksena. Tuloksista on esitetty yhteenveto taulukossa 1.

#### Taulukko 1

Saccharomyces cerevisiae-kannan RH971 interferoniaktiivisuus sen jälkeen kun se on transformoitu plasmideilla p30IFN2(8<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(8<sub>1</sub>) vastaavasti sekä myös plasmidilla pJDB207/IFN2'(8<sub>1</sub>) (ks. esimerkki 9)

	Interferoniaktiivisuus ilmaistuna yksiköissä/ml hiivasolu-uutetta		
plasmidi	p30IFN2(8 <sub>1</sub> )	p30IFN2'(8 <sub>1</sub> )	pJDB207/IFN2'(8 <sub>1</sub> )
kytketty pois päältä (normaali fosfaattipitoisuus)	0	30	100
kytketty päälle (alhainen fosfaattipitoisuus)	700	7000	50000

Esimerkki 9: Interferonigeenin liittäminen suuren kopiomäärän tuottavaan hiivan 2 $\mu$ -vektoriin pJDB 207 (ks. kuva 6).

Plasmidi p30IFN2'(8<sub>1</sub>) katkaistaan restriktioendonukleaaseilla HindIII ja BamHI noudattamalla valmistajan oh-

jeita (Biolabs). Saadaan kaksi palasta, joiden koot ovat 4,0 kb ja 2,0 kb. 2,0 kb:n jae erotetaan ja puhdistetaan käyttämällä matalla sulavassa agarosigeelissä tehtyä geelielektroforeesia, jota on selostettu kohdassa 4a.

Plasmidi pJDB207 (28) katkaistaan restriktioendonukleaaseilla HindIII ja BamHI. Tällöin syntyy kolme palasta. 6,5 kb:n restriktiopalanen erotetaan edelläkuvatulla tavalla.

0,3 µg 2,0 kb:n palasta (joka sisältää PHO5-promootorin liittyneenä interferoniproteiinia koodittavaan alueeseen) liitetään 15 tunnin ajan 6,5 kb:n vektoripalaseen reaktioliuoksen kokonaistilavuuden ollessa 20 µl ja käyttämällä 300 yksikköä T4 DNA-ligaasia valmistajan kuvaamissa olosuhteissa (Biolabs). *E. coli* HB101-solut transformoidaan ja ampisilliinin suhteen vastustuskykyiset pesäkkeet valitaan. Plasmidi-DNA eristetään ja eristetyn plasmidi-DNA:n oikea rakenne todetaan restriktiokatkaisulla käyttämällä entsyymejä HindIII ja BamHI ja käyttämällä molekyylipainostandardeina samoilla entsyymeillä katkaistuja plasmideja p30IFN2'(8<sub>1</sub>) ja pJDB207. Saadulle uudelle plasmidille annetaan nimitys pJDB207/IFN2'(8<sub>1</sub>).

Plasmidi pJDB207/IFN2'(8<sub>1</sub>) transformoidaan *S. cerevisiae*-kantaan RH971 julkaisussa (1) kuvatulla tavalla valitsemalla leusiinin suhteen prototrooppiset pesäkkeet. Yksi leusiinin suhteen prototrooppinen hiivapesäke (nimeltään *Saccharomyces cerevisiae* RH971/pJDB207/IFN2'(8<sub>1</sub>)) poimitaan ja sitä kasvatetaan esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Interferonitiitteri määritetään esimerkissä 8 kuvatulla tavalla. Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Esimerkki 10: Sellaisten E. coli-kantojen valmistus, jotka ovat transformoituneet yhdistelmäplasmideilla, jotka sisältävät ihmisen lymfoblastoidi-interferoneja koodittavat alueet

A. HuIFN mRNA:n suhteen rikastetun poly(A) RNA:n eristäminen (kuva 7)

a) Namalwa-solujen indusointi

Namalwa-soluja kasvatetaan RPMI 1640-kasvualustassa, jossa on 10 % naudan sikiöaikaista seerumia, 37°C lämpötilassa. Kun solutiheys on  $3 \times 10^6$  solua/ml, suspensio sentrifugoidaan nopeudella 800x g 10 minuutin ajan huoneenlämpötilassa. Kerätyt solut suspendoidaan 200 ml:aan kasvualustaa, jossa on glutamiinia (0,027 tilavuus-%), penisilliiniä (100 yksikköä/ml) ja streptomysiiniä (50 µg/ml). Soluja inkuboidaan 90 minuuttia 37°C:ssa Newcastle-sairausviruksen (NDV 110) kanssa suhteessa 190 HAU/ $10^6$  solua (HAU = hemagglutinaatioyksikköä). Lisäämällä tuoretta kasvualustaa solutiheys säädetään arvoon  $1,3 \times 10^6$  solua/ml ja solususpensiota ravistellaan 34°C:ssa nopeudella 100 1/min. 12 tunnin kuluttua kerätään talteen  $6 \times 10^9$  solua ja ne suspendoidaan uudelleen 50 ml:aan fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta ("PBS": 1 l PBS-liuosta sisältää 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ja 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Ennen solujen korjuuta otetaan näyte ja interferoniaktiivisuus määritetään Armstrongin menetelmällä (32) käyttämällä ihmisen CCL-23-soluja ja rakkulastomatiittivirusta ärsytysviruksena. Näin saadaan tulokseksi 4300 IFN-yksikköä/ml.

b) Solujen rikkominen ja deproteinisointi

Solususpensio ( $6 \times 10^9$  solua 50 ml:ssa PBS-puskuria) lisätään huoneenlämpötilassa 800 ml:aan hajotuspuskuria, jossa on 0,05 M Tris.HCl (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA ja 2% SDS (kiteinen tutkimuslaatu, Serva). Lysaattia hajotetaan määrällä 0,2 mg/ml esi-inkuboitua (2 h 37°C:ssa) proteaasia (Protease P, type VI, Sigma) huoneenlämpötilassa sekoittamalla 1 tunnin ajan. Liuoksesta poistetaan pro-

teiini uuttamalla 3 kertaa 500 ml:lla fenolilla kyl-  
lästettyä TNE-liuosta ja 5 kertaa 500 ml:lla klorofor-  
mia. Näin saadaan 500 mg nukleiinihappoja, kun mita-  
taan absorbanssina 260 nm:ssa.

c) Kontaminoivan DNA:n ja RNA:n poistaminen

Hieman viskoosinen vesiliuos, joka on saatu edel-  
läkuvatulla tavalla (vaihe Ab), säädetään pitoisuuteen  
0,3 M NaCl ja 1 g oligo(dT)selluloosaa (tyyppi 7,  
P-L Biochemicals). Kun on sekoitettu 30 minuuttia hu-  
oneenlämpötilassa, suspensio sentrifugoidaan 1 litran  
Sorvall-pulloissa Sorvall RC-3-sentrifugissa nopeudella  
4000 1/min 10 minuuttia huoneenlämpötilassa ja oligo(dT)-  
liete pestään kahdesti 40 ml:lla 2xTNE, jossa on 0,5 %  
SDS. Sitoutunut poly(A) RNA eluoidaan sen jälkeen vii-  
dellä peräkkäisellä pesulla (2,4 ml H<sub>2</sub>O). Näin saadaan  
720 µg poly(A) RNA:ta optisen tiheyden perusteella  
määritettynä. Ensimmäisen adsorption jälkeen saatu  
emäliuos-RNA adsorboidaan toisen kerran 1 g:aan oligo(dT)-  
selluloosaa ja eluoidaan edelläkuvatulla tavalla, jol-  
loin saadaan 320 µg poly(A) RNA:ta. Eluaatit yhdistetään,  
säädetään TNE-liuokseksi ja poly(A) RNA saostetaan 67-  
prosenttisella etanolilla -20°C:ssa 10 tunnin ajan. RNA  
otetaan talteen sentrifugoimalla nopeudella 10 000  
1/min Sorvall RC-5B-sentrifugissa 10 minuuttia 0°C:ssa.  
Sakka (1 mg) liuotetaan uudestaan 1 ml:aan 1mM EDTA.

RNA:n HuIFN mRNA-aktiivisuus tutkitaan injektoimal-  
la *Xenopus laevis*-sammakon varhaismunasoluihin seuraavalla tavalla:

50 nl RNA-liuosta injektoidaan kuhunkin 20 varhais-  
munasolusta. Varhaismunasoluja inkuboidaan Barth-alus-  
tassa (2 mM Tris, 88 mM NaCl, 1mM KCl, 0,33 mM Ca(NO<sub>3</sub>).H<sub>2</sub>O,  
0,41 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,82 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,4 mM NaHCO<sub>3</sub>,  
0,01 mg/ml penisilliiniä, 0,01 mg/ml streptomysiiniä ja  
liuoksen pH säädetään suolahapolla arvoon 7,6) julkai-

sujen Gurdon (33), Barth (34) ja Colman et al. (35) mukaan. Injektoituja varhaismunasoluja inkuboidaan 42-48 tuntia ja inkubointiväliaine poistetaan, sentrifugoidaan 5 minuuttia Eppendorf-sentrifugissa ja emäliuosta säilytetään  $-20 - -80^{\circ}\text{C}$ :ssa, kunnes se käytetään määrittäksessä. IFN-aktiivisuus määritetään oleellisesti ottaen Armstrongin menetelmän mukaan (32) paitsi, että VSV-virusta käytetään ärsytysviruksena Hep-2-soluissa (Flow Laboratories). Varhaismunasolu-uutteen ominaisaktiivisuus on 600 IU interferonia per  $\mu\text{g}$  injektoitua RNA:ta.

d) Poly(A) RNA:n rikastaminen HuIFN mRNA:n suhteen

Poly(A) RNA lasketaan Chelex-100-pylvään läpi (200-400 mesh, Bio-Rad) (pakatun pylvään tilavuus 0,5 ml). Pylväs huuhdellaan 1 ml:lla 1mM EDTA.

Eluaatti (1 mg poly(A) RNA:ta 2 ml:ssa EDTA) kuumentetaan 2 minuuttia  $100^{\circ}\text{C}$ :ssa ja sen jälkeen suoritetaan sentrifugointi sakkaroositiheysgradientin läpi (6 kpl 14 ml:n sakkaroosiliuoksia, joiden sakkaroositiheys nousee 5 prosentista 23 prosenttiin (paino/tilavuus), ja jotka sisältävät 50 mM Tris.HCl (pH 7,5), 0,2 M NaCl ja 1 mM EDTA). Sentrifugointi suoritetaan TST 41-roottorisessa (Kontron AG) nopeudella 35 000 1/min 16 tunnissa  $5^{\circ}\text{C}$ :ssa. 0,3 ml:n jakeet kerätään ISCO-gradienttien keräyslaitteeseen. Kuhunkin jakeeseen lisätään 2 tilavuutta etanolia ja liuoksen annetaan seisoa 10 tuntia  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa. Saostunut mRNA sentrifugoidaan talteen (Sorvall, HB-4-roottori,  $0^{\circ}\text{C}$ , 10 000 1/min, 10 minuuttia). Kunkin jakeen sakka liuotetaan uudestaan 25  $\mu\text{l}$ :aan 1 mM EDTA ja jokaisesta jakeesta määritetään ihmisen IFN mRNA-aktiivisuus edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ac) paitsi, että RNA-näytettä kohti injektoidaan vain 10 varhaismunasolua eikä 20. Saadut tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

Sakkaroositiheysgradientin jakeista määritetty HuIFN mRNA-aktiivisuus

jae n:o	IFN-aktiivisuus (yksikköä/ml)
1-18	-
19	162
20	162
21	162
22	162
23	ei tutkittu
24	729
25	ei tutkittu
26	405
27	ei tutkittu
28	486
29	ei tutkittu
30	162
31	ei tutkittu
32	162
33	ei tutkittu
34	54
35-40	ei tutkittu

Jakeet 23 - 29 yhdistetään ja poly(A) RNA puhdistetaan seuraavalla tavalla:  
 Poly(A) RNA-liuos säädetään 2xTNE-väkevyyteen 0,5-prosenttisessa SDS-liuoksessa ja siirretään 200 µl:n oligo(dT)selluloosapylväeseen. Pylväs pestään 2 ml:lla 0,5-prosenttista SDS-liuosta, jossa on 2xTNE, ja poly(A) RNA eluoidaan pesemällä 5 kertaa 0,5 ml:lla H<sub>2</sub>O. Eluaatti säädetään TNE-pitoisuuteen ja liuos uutetaan kahdesti yhtä suurella tilavuudella fenolia (kylästetty TNE:llä) ja kahdesti yhtä suurella tilavuudella kloroformia.

Poly(A) RNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa 10 tunnin ajan ja otetaan talteen sentrifugoimalla HB-4-roottorissa edelläkuvatulla tavalla.

Poly(A) RNA liuotetaan 100  $\mu\text{l}$ :aan 0,5 mM EDTA. Saanto on 40  $\mu\text{g}$ , kun mitataan optinen tiheys.

Osa poly(A) RNA:ta käytetään ihmisen IFN-aktiivisuuden määrittämiseen edelläkuvatulla tavalla käyttämällä 20 varhaismunasolua määrittäystä kohti. Poly(A) RNA-valmisteen ominaisaktiivisuus on 8100 IU interferonia per  $\mu\text{g}$  RNA.

#### B. Kaksisäikeisen cDNA:n valmistus (kuva 7)

Poly (A) RNA:n suhteen rikastettua HuIFN mRNA:ta (ks. vaihe Ad) käytetään templaattina valmistettaessa kaksisäikeistä cDNA:ta käyttämällä oleellisesti katsoen niitä menetelmiä, joita on kuvattu julkaisuissa Efstratiadis et al. (36), Maniatis et al. (37) ja Hoeijmakers et al. (38).

##### a) Ensimmäisen säikeen synteesi

250  $\mu\text{l}$  reaktioseosta, jossa on 40 mM Tris.HCl (pH 7,5), 30 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM DTT (Calbiochem.), 1 mM dGTP, dCTP, dTTP (P-L Biochemicals) ja 1 mM  $^{32}\text{P}$ -dATP (Amersham, ominaisaktiivisuus 50 000 cpm/nmol), 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oligo(dT)<sub>12-18</sub> (P-L Biochemicals), 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  poly(A) RNA ja 100 yksikköä linnun myeloblastosis-viruksen (AMV) käänteiskopioijaentsyymiä (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, Florida), inkuboidaan 80 minuuttia  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa. Reaktio katkaistaan säätämällä liuoksen pitoisuudeksi 10 mM EDTA ja 0,1% SDS. Seos uutetaan kerran 1 tilavuudella fenolia. Vesifaasi uutetaan uusestaan 1 tilavuudella kloroformia ja sijoitetaan 3 ml:n Sephadex G-30-pylväeseen (Pharmacia, fine). Kerätään 0,1 ml:n jakeet. Kukin jakeen radioaktiivisuus määritetään mittaamalla Cerenkov-säteily. Radioaktiiviset jakeet yhdistetään ja nukleiinihapot saostetaan 2 tilavuudella etanolia  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa 10 tunnin aikana. Näytettä sentrifugoidaan HB-4-rootto-



rissa 20 minuuttia nopeudella 10 000 1/min 0°C:ssa. Sakka liuotetaan 95 µl:aan H<sub>2</sub>O. Lisätään 5 µl 10 N NaOH ja seosta inkuboidaan 40 minuuttia 25°C:ssa. Kun on neutra-loitu 5 M etikkahapolla, lisätään 50 µl vettä ja 2 tila-vuutta etanolia ja näytettä säilytetään 10 tuntia -20°C:ssa. Sakka sentrifugoidaan talteen edelläkuvatulla tavalla ja liuotetaan uudestaan 200 µl:aan 0,1 mM EDTA. Näin saa-daan 3,7 µg yksisäikeistä cDNA:ta. cDNA:n pituus on 700-1500 nukleotidia, kun määritetään elektroforeettisen liikkuvuuden perusteella 6-prosenttisessa polyakryyliamidi-geelissä Tris-boraatti-EDTA:ssa (108 g Tris, 9,3 g di-natrium-EDTA ja 55 g boorihappoa per 1 litra liuosta, pH 8,3), jossa on 7 M ureaa, vertaamalla pituudeltaan tun-nettuihin merkki-DNA-palasiin (39).

b) Toisen säikeen synteesi ja katkaisu S<sub>1</sub>-endonukleaa-silla

Saatua cDNA-liuosta kuumennetaan 90 sekuntia 100°C:ssa, jäädytetään ja inkuboidaan 400 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 0,1 M kaliumfosfaattipuskuria (pH 6,9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (Calbiochem), 1 mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dTTP (P-L Biochemicals) 1mM <sup>3</sup>H-dGTP (Amersham, ominaisaktiivisuus 94 000 cpm/nmol) ja 165 yksikköä/ml E. colin DNA-polymeraasi I:tä (Biolabs, New England), 8 tuntia 15°C:ssa. Reak-tio katkaistaan lisäämällä EDTA ja SDS väkevyyteen 10 mM ja 0,1% vastaavasti. Seos uutetaan fenolilla ja klorofor-milla, kromatografoidaan Sephadex G-50:llä (Pharmacia, fine, pakatun kolonnin tilavuus 2 ml) ja saostetaan eta-nolilla edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ba).

Saatu DNA käsitellään 50 µl:ssa inkubointiseosta, jos-sa on 0,25 M NaCl, 50 mM natriumasettaattia (pH 4,5) ja 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 6 yksiköllä S<sub>1</sub>-endonukleasia (P-L Biochemi-cals) 30 minuuttia 37°C:ssa. Reaktio pysäytetään sää-tämällä väkevyydeksi 0,1% SDS ja 10 mM EDTA. Reaktio-seoksesta poistetaan proteiini 1 tilavuudella fenolia (kyllästetty 50 mM natriumasettaattiin, pH 4,5) ja kloro-

formia. Vesifaasi kromatografoidaan 2 ml:n Sephadex G-50-pylväässä (Pharmacia, fine) TNE:ssä. 100 µl jakeet kerätään ja kunkin jakeen Cerenkov-säteily määritetään. Erotetut jakeet yhdistetään ja DNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia 10 tunnin aikana  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa edelläkuvatulla tavalla. Sakka sentrifugoidaan HB-4-roottorissa (ks. edellä) ja kertynyt sakka liuotetaan 100 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,5 mM EDTA. Näin saadaan 4 µg DNA:ta. DNA fraktioidaan TST-60-roottorissa (Kontron AG) sakkaroosigradientin läpi (5-23%), jossa on 50 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 1 mM EDTA. Sentrifugointi suoritetaan nopeudella 55 000 1/min 5 tunnissa  $15^{\circ}\text{C}$ :ssa. DNA, joka laskeutuu nopeammin kuin 800 emäsparin merkki-DNA, jota käsitellään rinnakkaisgradientissa, kerätään talteen, säädetään TNE-pitoisuuteen ja saostetaan 67-prosenttisellä etanolilla  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa 10 tuntia. Näin saadaan 0,4 µg kaksisäikeistä cDNA:ta.

C. pBR322:een liitetyn cDNA:n valmistus (kuva 7)

a) dCMP:llä pidennetyn cDNA:n valmistus

0,1 µg:aan saatua kaksisäikeistä cDNA:ta liitetään 3'-päihin poly(dC)-hännät 10 µl:ssa reaktiosesta, jossa on 100 mM natriumkakydylaattia (pH 7,2), 2,4 mM  $\text{CoCl}_2$ , 50 µg BSA (Calbiochem.) per ml, 1 mM dCTP ja 10 yksikköä terminaalista deoksinukleotidyyli transferaasia (P-L Biochemicals) per µg kaksisäikeistä cDNA:ta. Inkuboinnin jälkeen (20 min,  $27^{\circ}\text{C}$ ) lisätään EDTA väkevyyteen 10 mM ja seosta säilytetään  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa käyttöön asti.

b) Pst I:llä katkaistun, dGMP:llä pidennetyn pBR322:n valmistus

10 µg pBR 322:n plasmidi-DNA:ta hajotetaan 10 yksiköllä Pst I-endonukleaasia (Biolabs) 100 µl:ssa liuosta, jossa on 50 mM NaCl, 6 mM Tris.HCl (pH 7,5), 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM 2-merkptoetania ja 100 µg/ml gelatiinia, 1 tunti  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa. Liuos uutetaan 1 tilavuudella fenolia ja kloroformia. Liuos säädetään TNE-pitoisuuteen ja linearisoitu

DNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa 5 tunnin ajan.

Linearisoitu plasmidi-DNA pidennetään dGMP:llä 200  $\mu\text{l}$ :ssa reaktioseosta, jossa on 100 mM natriumkakydylaattia (pH 7,1), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50  $\mu\text{g}$  BSA per ml, 1 mM dGTP ja 100 yksikköä terminaalista deoksinukleotidyylitransferaasia (P-L Biochemicals). Kun on inkuboitu 20 minuuttia  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa, lisätään EDTA:ta väkevyyteen 10 mM ja reaktioseos jäädytetään  $-20^{\circ}\text{C}$ :een käyttöön asti.

c) dGMP:llä pidennetyyn pBR322:n liittämisen dCMP:llä pidennettyyn kaksisäikeiseen cDNA:han

Seosta, jossa on cCMP:llä pidennettyä kaksisäikeistä cDNA:ta (0,1  $\mu\text{g}$ ) ja dGMP-häntäistä, linearisoitua pBR 322:ta (0,5  $\mu\text{g}$ ) 500  $\mu\text{l}$ :ssa TNE:tä, inkuboidaan  $65^{\circ}\text{C}$ :ssa 1 tunti,  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa 1 tunti ja  $20^{\circ}\text{C}$ :ssa 1 tunti. Liuos, jossa on pBR322 siihen liitetyn cDNA:n kanssa sijoitetaan jäähän ja käytetään transformointiin välittömästi.

D. E. coli HB 101:n transformointi yhteenliitetyllä yhdistelmäplasmidilla

Kalsiumilla käsitelty E. coli HB 101 valmistetaan transformointia varten menetelmällä Mandel et al. (29).

10  $\mu\text{l}$  reaktioseosta, jossa on edellävalmistettua (vaihe Cc) yhteenliitettyä pBR322-yhdistelmäplasmidi-DNA:ta lisätään seokseen, jossa on 150  $\mu\text{l}$  kalsiumilla käsiteltyä E. coli HB 101:tä, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$  ja 10 mM Tris.HCl (pH 7,5), kokonaistilavuuden ollessa 200  $\mu\text{l}$ .

Seosta jäädytetään jäässä 20 minuuttia, kuumennetaan  $42^{\circ}\text{C}$ :een 1 minuutiksi ja inkuboidaan 10 minuuttia  $20^{\circ}\text{C}$ :ssa. Lisätään 1 ml tryptonialustaa (tryptonialusta sisältää 10 g Bacto-Tryptonia (Difco); 1 g hiivauutetta (Difco); 1 g glukoosia; 8g NaCl ja 294 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 litrassa tislattua vettä) ja saatua seosta inkuboidaan 30 minuuttia  $37^{\circ}\text{C}$ :ssa ravistelemalla nopeudella 300 1/min. Seosta kasvatetaan 2 agarlevyllä (McConkey, Difco; 0,6 ml/levy), joi-

hin on lisätty 10 µg/ml tetrasykliiniä (Sigma). Levyjä inkuboidaan 37°C:ssa 12-17 tuntia. Näin saadaan noin 5600 tetrasykliinin suhteen vastustuskykyistä transformoitunutta E. coli HB 101-kantaa.

E. Sellaisten kloonien identifiointi, jotka sisältävät HuIFN cDNA:n

a) 13-meerisen oligodeoksinukleotidialukkeen syntetisointi (kuva 8)

Oligodeoksinukleotidi, joka on komplementaarinen 13 nukleotidia sisältävälle jaksolle, joka on sama sekä HuIFN- $\alpha_1$ :n että HuIFN- $\beta$ :n mRNA:ssa, syntetisoidaan kemiallisesti fosfotriesterimenetelmällä (ks. Itakura et al. (40), de Rooij et al. (41)). Synteesin erilliset vaiheet on esitetty periaatteellisesti kuvassa 8. Kuvan 8 rivillä 1 mainitut lähtöaineet (mono- ja dideoksinukleotidit, joissa on suojaryhmät) tunnetaan kirjallisuudesta. Suojaryhmät lohkaistaan irti Itakura et al:n kuvaamalla menetelmällä: 5'-monometoksitriityyllillä (M) tai dimetoksitriityyllillä (D) substituoitujen hydroksyyli-ryhmien suojaus poistetaan etikkahapolla (80 %) huoneenlämpötilassa ja  $\beta$ -syanoetyyli-fosfaattiryhmät lohkaistaan 0,1 N natriumhydroksidilla dioksaani-vesiseoksessa (4:1) huoneenlämpötilassa. Rakennosien kondensointi suoritetaan käyttämällä tri-isopropyylibentseenisulfonyylikloridia aktivointiaineena niin, että saadaan oligodeoksinukleotideja aina täysin suojattuun 13-meeriseen alukkeeseen asti, joka on esitetty kuvan 8 rivillä 7. Viimeinen vaihe (kaikkien suojaryhmien poisto) suoritetaan seuraavalla tavalla:

Liuokseen, jossa on 64,6 mg täysin suojattua 13-meeristä oligodeoksinukleotidia dioksaanin (3 ml) ja asetonitriilin (1 ml) seoksessa, lisätään 200 mg syn-p-nitrobentsaldoksiimia ja 124 mg N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>3</sup>-tetrametyylliguanidiinia ja annetaan seisoa 27 tuntia. Lisätään 10 ml ammoniakkaa (25 %) ja liuosta säilytetään 24 tuntia

50°C:ssa. Kun liuos on haihdutettu vakuuissa, jäännös liuotetaan veteen, pH säädetään etikkahapolla arvoon 4 ja liuos uutetaan 20 kertaa kloroformilla. Vesiliuos haihdutetaan vakuuissa ja jäännös liuotetaan 1 ml:aan etikkahappoa (80 %). Liuoksen annetaan seisoa 1 tunti, laimennetaan 6 ml:lla vettä, uutetaan 3 kertaa kloroformilla ja lyofilisoidaan. Kolmasosa epäpuhtaasta tuotteesta puhdistetaan kromatografisesti käyttämällä DEAE-Sephadex A 25-pylvästä (pylvään koko: 10x1,3 cm) ja 200 ml 0,2-1,2 M trietyyliammoniumbikarbonaattigradiienttia. Pääjakeen eluoituminen tapahtuu väkevyydessä 0,87 M. Pääjake, joka sisältää puhtaan tuotteen, todetaan HPLC-kokeella, haihdutetaan 3 kertaa veden kanssa, suodatetaan 10 ml:n läpi Dowex 50 W:tä (NH<sub>4</sub>-suola) ja lyofilisoidaan. HPLC (perma-phase AAX, column size 90x0,3 cm, 60°C, 2 ml/min, gradi-entti: A = 0,005 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, B = 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M KCl, pH 4,5; 20 % A → 100% B 30 minuutissa): t<sub>R</sub> 11,8 min.

b) <sup>32</sup>P:llä merkityn IFN-α:n ja IFNβ:n suhteen spesifi-sen cDNA-koettimen valmistus (kuva 9)

40 pmol synteettistä 13-meeristä oligodeoksinukleoti-dialuketta (ks. vaihe Ea) ja 40 pmol [γ-<sup>32</sup>P]7-ATP:tä (5700 Ci.mmol<sup>-1</sup>, Amersham) yhdistetään 100 μl:ssa 50 mM Tris.HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> ja 5 mM DTT. 50 yksikköä T<sub>4</sub>-polynukleotidikinaasia (P-L Biochemiclas) lisätään ja kun on pidetty 30 minuuttia 37°C:ssa, lisätään vielä 20 yksikköä entsyymiä ja inkubointia jatketaan vielä 15 minuuttia 37°C:ssa. Vesiliuos, jossa on <sup>32</sup>P:llä mer-kitty aluke, puhdistetaan fenolilla uuttamalla. Jatko-puhdistus suoritetaan kromatografisesti 4 ml:n Sephadex G-50-pylväessä (Pharmacia, fine) 1 ml:ssa Tris.HCl-pusku-ria (pH 8,0). Kerätään 0,1 ml:n jakeet. Kunkin jakeen radioaktiivisuus määritetään mittaamalla Cerenkov-säteily. Ominaisaktiivisuudeksi saadaan 4x10<sup>6</sup> Cerenkov cpm per mooli oligodeoksinukleotidia. <sup>32</sup>P:llä merkitty aluke

(40 pmol) lyofilisoidaan, suspendoidaan uudestaan 91  $\mu$ l:aan vettä, jossa on 14  $\mu$ g poly(A) RNA:ta (saatu induoiduista Namalwa-soluista vaiheessa A kuvatulla tavalla) ja kuumennetaan 60 sekuntia 100°C:ssa. 9  $\mu$ l 4 M KCl lisätään ja seosta inkuboidaan 25°C:ssa 60 minuuttia. 450  $\mu$ l käänteiskopioijaentsyymiseosta lisätään niin, että reaktiutilavuus sisältää 40 mM Tris.HCl (pH 8), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (Calbiochem, Inc.), 74 mM KCl, dATP, dGTP, dCTP ja dTTP, 1 mM kutakin, (P-L Biochemicals) ja 90 yksikköä linnun myeloblastosisviruksen (AMV) käänteiskopioijaentsyymiä. Inkubointia jatketaan 1 tunti 37°C:ssa. Liuos uutetaan 1 tilavuudella fenolia (kylästetty TNE-liuokseen) ja nukleiinihapot saostetaan 2 tilavuudella etanolia -20°C:ssa 10 tunnin kuluessa. Sakka sentrifugoidaan talteen (HB-4-roottori, 20 min, 10 000 1/min, 0°C) ja liuotetaan 20  $\mu$ l:aan värjäysseosta, jossa on 90 % (tilavuusosina) formamidia (Merck, pro analysis), 1 mM EDTA, 0,05 % bromifenolisinistä ja 0,05 % ksyleenisyanolisistä. Näytettä kuumennetaan 2 minuuttia 90°C:ssa ja sen jälkeen se sijoitetaan 5-prosenttiselle polyakryyliamidigeelille, jossa on Tris-boraatti-EDTA:ta (ks. Peacock et al. (39)). Tällöin näkyy autoradiogrammilla yksi kaista, joka liikkuu <sup>32</sup>P:llä merkittyjen 267 bp ja 435 bp sisältävien DNA-palasten välissä, jotka on saatu leikkaamalla plasmidi pBR 322 Hae III:lla. <sup>32</sup>P:llä merkitty cDNA-palaneen uutetaan geelistä ja puhdistetaan julkaisussa Mueller et al. (42) kuvatulla tavalla. Näin saadaan <sup>32</sup>P:llä merkitty ihmisen IFN- $\alpha$ :n ja IFN- $\beta$ :n suhteen spesifinen cDNA-koetin, jonka säteily on 20 000 Cerenkov cpm.

c) Sellaisten kloonien seulonta, joissa on HuIFN cDNA (kuva 9)

1650 edelläkuvatulla tavalla valmistettua transformanttipesäkettä (vaihe D) siirretään nitroselluloosasuotimille BA 85 (Schleicher & Schuell, halkaisija 8 cm).

Solut hajotetaan ja niiden DNA denaturoidaan ja kiinnitetään suotimiin in situ menetelmällä Grunstein ja Hogness (20). Pesäkkeet sisältävät suotimet esihybridisoidaan liuoksessa, jossa on 4xSET (liuos, jossa on 0,15 M NaCl, 30 mM Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA), 0,1 % (paino/tilavuus) Ficoll 400 (Pharmacia), 0,1 % (paino/tilavuus) polyvinyylipyrrolidonia (PVP-360, Sigma), 0,1 % (tilavuusosina) BSA, 50 µg/ml denaturoitua vasikan kateenkorva-DNA:ta (valmistettu seuraavalla tavalla: 5 mg vasikan kateenkorva-DNA:ta (tyyppi I, Sigma) keitetään 10 min 0,5 M NaOH:ssa DNA leikkaamiseksi, neutraloidaan 5M etikkahapolla ja saostetaan 2 tilavuudella etanolia -20°C:ssa. Sakka sentrifugoidaan talteen HB-4-roottorisessa 10 minuutin ajan 0°C:ssa ja liuotetaan uudestaan 500 µl:aan 0,5 mM EDTA), 65°C:ssa 4 tuntia käyttämällä 20 ml seosta suodinta kohti ja hybridisoidaan määrällä  $10^3$  Cerenkov cpm  $^{32}\text{P}$ :llä merkittyä koetinta per nitroselluloosasuodin liuoksessa, jossa on 5xSET, 0,02 % (paino/tilavuus) Ficoll, 0,01% polyvinyylipyrrolidonia, 0,02 % (tilavuusosina) BSA, 0,2 % SDS ja 50 µg/ml denaturoitua vasikan kateenkorva-DNA:ta. Hybridisointi suoritetaan 65°C:ssa 36 tunnin kuluessa.

Suotimet huuhdellaan kerran kloroformissa, kahdesti SET, 0,5 SDS:ssä huoneenlämpötilassa ja kahdesti SET, 0,5% SDS:ssä 1 tunnin ajan 60°C:ssa ja kerran 3 mM Trizma-emäksessä huoneenlämpötilassa 1 tunnin ajan. Suotimet kuivataan imemällä 3 MM-paperilla (Whatman) ja suotimista otetaan röntgenkuva käyttämällä varjostinta (Ilford vahvistusvarjostin) -80°C:ssa 72 tunnin valotusajalla.

Autoradiogrammilta löydetään yhdeksän positiivista pesäkettä, jotka otetaan jatkotutkimuksiin.

Koska transformoituneiden solujen primääriset kloonit sisältävät silloin tällöin useampaa kuin yhtä yhdistelmä-DNA-molekyylilaatua, yhdistelmäplasmidi-DNA:t

eristetään yhdeksästä positiivisesti hybridisoituvasta kloonista ja käytetään E. coli HB 101:n transformointiin edelläkuvatulla tavalla.

Yhdistelmäplasmidi-DNA eristetään seuraavalla tavalla: 1 pesäke siirrostetaan 10 ml:aan tryptonialustaa, joka on täydennetty 10 µg/ml:lla tetrasykliiniä, 25 ml:n Erlenmeyer-kolvissa edelläkuvatulla tavalla. Viljelmää ravistellaan 15-18 tuntia 37°C:ssa nopeudella 300 1/min. Solut sentrifugoidaan talteen (Sorvall, HS-4-roottori, 10 minuuttia, 400 1/min, 4°C). Näin saadaan noin 0,1 g soluja, jotka suspendoidaan uudestaan 1 ml:aan 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). Lisätään 0,25 ml lysotsyymi-liuosta (10 mg/ml 50 mM Tris-HCl-puskurissa (pH 8,0), lysotsyymi on hankittu Sigmalta) ja kun on inkuboitu 10 minuuttia 0°C:ssa, lisätään 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5). Kun seosta on pidetty vielä 10 minuuttia 0°C:ssa, lisätään 60 µl 2% Triton X-100 (Merck). Kun seosta on pidetty vielä 30 minuuttia 0°C:ssa, näytettä sentrifugoidaan 30 minuuttia nopeudella 15 000 1/min 4°C:ssa Sorvall SA-600-roottorissa. Emäliuos deproteinisoidaan 1 tilavuudella fenolia (kyllästetty TNE:hen). Faasit erotetaan sentrifugoimalla (Sorvall HB-4-roottori) 10 min nopeudella 500 1/min 4°C:ssa. Ylempi faasi uutetaan kahdesti 1 tilavuudella kloroformia. Haiman RNAaasia A (Sigma; 10 mg/ml TNE:ssä, esikuumennettu 20 min 85°C:ssa) lisätään lopulliseen väkevyyteen 25 µg/ml ja saatua seosta inkuboidaan 40 minuuttia 37°C:ssa. Sitten liuos säädetään pitoisuuteen 1 M NaCl ja 10 % polyetyleeniglykolia 6000 (Fluka, autoklavoitu 20 min 120°C:ssa) ja inkuboidaan -10°C:ssa 2 tuntia. Sakka otetaan talteen Sorvall HB-4-roottorilla (20 min, 10000 1/min, 0°C) ja liuotetaan uudestaan 100 µl:aan TNE. DNA-liuos uutetaan 1 tilavuudella fenolia ja DNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia -80°C:ssa 10 minuutin ajan. Sakka otetaan talteen sentrifugoimalla Eppendorf-sentrifugissa ja DNA liuotetaan uudestaan 20 µl:aan luosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,5 mM



EDTA. 10 ml:sta viljelmää saadaan 8-10 µg yhdistelmä-plasmidi-DNA:ta.

*E. coli* HB 101 transformoidaan kullakin yhdeksästä eristetyistä yhdistelmä-DNA:sta ja transformoituja soluja kasvatetaan agar-levyillä, joissa on tetrasykliiniä, edelläkuvatulla tavalla (vaihe D). Kustakin transformatiosta poimitaan 3 tetrasykliinin suhteen vastustuskykyistä kloonia, valmistetaan 10 ml:n viljelmät ja yhdistelmä-DNA:t eristetään viljelmistä edelläkuvatulla tavalla.

Kaikki DNA-näytteet analysoidaan ennen transformointia ja sen jälkeen katkaisemalla PstI-endonukleaasilla ja käyttämällä apuna elektroforeesia 1 % agarosigeelissä, jossa on 50 mM Tris-asetaattia (pH 7,8) ja 1 mM EDTA. Kaikilla näytteillä on identtiset katkeamiskartat ennen transformointia ja sen jälkeen.

Yksi uudelleenkloonatuista yhdistelmä-DNA-molekyyleistä antaa 2 kaistaa, joista toisen liikkuvuus vastaa PstI:llä katkaistun pBR322:n liikkuvuutta ja toinen noin 1000 bp sisältävän jakson liikkuvuutta. Sille annetaan nimitys CG-pBR322/HlycIFN-1'b.

Toinen yhdistelmä-DNA antaa 3 kaistaa, joista yhden liikkuvuus vastaa PstI:llä katkaistua pBR322:ta, yhden liikkuvuus noin 600 bp ja yhden liikkuvuus noin 150 bp. Tämän kloonin yhdistelmä-DNA-molekyylille annetaan nimitys CG-pBR322/HLycIFN-β<sub>1</sub>.

d. Kloonien CG-pBR 322/HLycIFN-1b' ja CG-pBR322/HLycIFN-β<sub>1</sub> karakterisointi

Kloonien CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ja CG-pBR322/HLycIFN-β<sub>1</sub> yhdistelmä-DNA:t eristetään viljelmistä edelläkuvatulla tavalla (ks. vaihe Ec) ja tunnistetaan määrittämällä cDNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi Maxamin ja Gilbertin kuvaamalla menetelmällä (15). Määrittäminen tapahtuu periaatteessa seuraavasti:

Eristetty yhdistelmäplasmidi-DNA katkaistaan erilaisilla restriktioendonukleaaseilla. Entsyymejä käytetään oleellisesti ottaen valmistajan ohjeiden mukaan (New England Biolabs) paitsi, että BSA korvataan gelatiinilla entsyymipuskureissa. Liuos, joka sisältää katkaistun DNA:n, deproteinoidaan fenolilla (kyllästetty TNE:llä). DNA saostetaan etanolilla, liuotetaan uudestaan 50 mM Tris.HCl-puskuriin (pH 8,0) DNA-väkevyyteen 50 µg/ml ja inkuboidaan 0,1 yksikön kanssa naudan sisäelinten emäsfosfataasia (Boehringer) per pmol DNA:n 5'-päitä 30 min 37 °C:ssa. Entsyymi inaktivoidaan kuumentamalla liuosta 60 minuuttia 65 °C:ssa. DNA puhdistetaan DEAE-selluloosakromatografisesti Mueller et al. (42) kuvaamalla menetelmällä ja saostetaan etanolilla. Sitten DNA merkitään 5'-päistään  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP:llä (>5000 Ci/mmol, Amersham) ja suoritetaan T4-polynukleotidikinaasireaktio (P-L Biochemicals) oleellisesti ottaen julkaisussa Maxam ja Gilbert (15) kuvatulla tavalla, mutta DNA:ta ei denaturoida ennen kinaasireaktiota. Yleensä ominaisaktiivisuudet ovat 1-3x10<sup>6</sup> cpm/pmol 5'-päitä.

Radioaktiivisesti merkityt DNA-palaset katkaistaan toisella restriktioendonukleasilla ja tuotteet erotetaan elektrofeettisesti käyttämällä 6%, 8% ja 10% polyakryyliamidigeeliä Tris-boraatti-EDTA-puskurissa. DNA-palaset uutetaan geelistä ja puhdistetaan Mueller et al. (42) kuvaamalla tavalla. Nukleotidisekvenssien määrittämiseksi DNA-palaset hajotetaan kemiallisesti ja tuotteet erotetaan polyakryyliamidigeelielektroforeesilla Maxamin ja Gilbertin (15) kuvaamalla tavalla.

Eriyisesti kloonista CG-pBR 322/HLycIFN-1'b eristetyt plasmidi-DNA:t käsitellään seuraavalla tavalla. Toisaalta 5 µg plasmidi-DNA:ta katkaistaan BglII:lla, merkitään radioaktiivisesti 5'-päistä ja katkaistaan PvuII:lla. PvuII-Bgl\*- (\* tarkoittaa radioaktiivisesti merkittyä kohtaa) ja BglII-PvuII\*-DNA-palaset eristetään 6% polyakryyliamidigeelillä. Toisaalta 5 µg plasmidia

5 µg plasmidia hajotetaan Alu I:llä, merkitään 5'-päistään ja katkaistaan PstI:llä. PstI-AluI\*-DNA-palanen eristetään 8% polyakryyliamidigeelillä. Sen jälkeen yksittäiset palaset hajotetaan ja sekvenssit määritetään Maxamin ja Gilbertin menetelmällä. Saatu nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 10. Noin 25-35 deoksiguanosiininitähdettä sisältävä jakso on cDNA-liitännäisen 5'-pään edessä. Esitetty nukleotidisekvenssi on jossain määrin samanlainen kuin IFN-α:n (tyyppi F) cDNA:n vastaava, jota Goedel et al. ((43), ks. myös Weissmann (44)) ovat kuvanneet, mutta siinä esiintyy kuitenkin paljon selviä poikkeamia (pistemutaatioita), joista jotkut vaikuttavat aminohappoihin (ks. kuva 10).

Kloonista CG-pBR322/HLycIFN-β<sub>1</sub> eristetty plasmidi-DNA käsitellään samalla tavalla. 5 µg plasmidi-DNA:ta hajotetaan PvuII:lla ja merkitään radioaktiivisesti 5'-päistä. Puolet seoksesta katkaistaan PstI:llä ja loput Bgl II:lla. PstI-PvuII\*- ja BglIII-PvuII\*-jakeet eristetään elektroforeettisesti 6% polyakryyliamidigeelillä ja hajotetaan edelläkuvatulla tavalla. Nukleotidisekvenssi (N-pään sekvenssi) on esitetty kuvassa 11 ja se osoittaa, että cDNA liitännäinen alkaa nukleotidista numero 102 IFN-β<sub>1</sub>:n cDNA:ssa, kuten Taniguchi et al. (45) kuvanneet. Näin ollen cDNA-liitännäisellä on kyky koodittaa ihmisen IFN-β<sub>1</sub>:a, josta puuttuu 11 aminohappoa N-päässä. cDNA-liitännäisessä on 5'-päässä noin 20-25 oheisdeoksiguanosiininitähdettä ja siinä on pistemutaatio kohdassa 153, joka muuntaa C-tähteen T-tähteeksi vaikuttamatta syntyvään aminohappoon.

e. Sellaisten kloonien identifiointi, jotka sisältävät DNA-molekyylejä, jotka ristihybridisoituvat CG-pBR 322/HLycIFN-1'b:n ja CG-pBR 322/HLycIFN-β<sub>1</sub>:n liitännäisiin

Kloonien CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ja CG-pBR 322/HLycIFN-β<sub>1</sub> yhdistelmäplasmidi-DNA:t eristetään viljelmistä edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ec). CG-pBR 322/HLycIFN-1'b:n

plasmidi-DNA (5 $\mu$ g) katkaistaan Bgl II:lla, merkitään radioaktiivisesti 5'-päistään ja katkaistaan PvuII:lla. Toisaalta eristetty CG-pBR 322/HLycIFN- $\beta_1$ -plasmidi-DNA (5  $\mu$ g) katkaistaan Pvu II:lla, merkitään radioaktiivisesti 5'-päistään ja katkaistaan Bgl II:lla. Pvu II- Bgl II\*-DNA-palanen (351 bp) (koetin A) ja Pvu II\*-Bgl II-DNA-palanen (368 bp) (koetin B) eristetään 8% polyakryyliamidigeelistä edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ed) ja käytetään in situ pesäkehybridisointiin (ks. jäljempänä). Plasmidi-DNA-molekyylien katkaisu, radioaktiivinen merkitseminen ja DNA-palasten puhdistus suoritetaan edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ed).

Edelläkuvatulla tavalla valmistetaan 4000 transformanttipesäkettä (vaihe D), jotka siirretään nitroselluloosa-suotimille BA 85 (Schleicher & Schuell, halkaisija 8 cm). Solut hajotetaan ja niiden DNA denaturoidaan ja kiinnitetään suotimiin in situ menetelmällä Grunstein ja Hogness (20). Koettimien A ja B hybridisointi (molemmat koettimet on sekoitettu) suoritetaan edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ec). Autoradiografisesti identifioidaan 6 positiivista pesäkettä, joista kolmelle annetaan nimet

E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-4<sub>1</sub>,  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-5<sub>1</sub> ja  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub>

ja ne tutkitaan tarkemmin. Näiden kloonien plasmidi-DNA:t eristetään, transformoidaan uudelleen ja eristetään uudelleen edelläkuvatulla tavalla (vaiheet Ec, ja Ed).

Yhdistelmä-DNA-molekyylien liitännäisten luonteen toteamiseksi cDNA-liitännäisten nukleotidisekvenssit (osit-tain tai kokonaan) määritetään käyttämällä edelläkuvattua yleistä lähestymistapaa (vaihe Ed).

Tarkemmin sanottuna 5  $\mu$ g eristettyä plasmidi-DNA:ta CG-pBR 322/HLycIFN-4<sub>1</sub> ja CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub> kutakin

hajotetaan Pvu II:lla, merkitään radioaktiivisesti 5'-päistään ja katkaistaan Pst I:llä. DNA-palaset fraktioidaan 8% polyakryyliamidigeelillä ja 8<sub>1</sub>'-DNA:n PstI - PvuII\* (n. 120 bp) ja 4<sub>1</sub>'-DNA:n Pst I - Pvu II\* (82 bp) eristetään tavalliseen tapaan.

Eristetty CG-pBR 322/HLycIFN-5<sub>1</sub>:n eristetty plasmidi-DNA käsitellään seuraavalla tavalla. Toisaalta 5 µg plasmidi-DNA:ta katkaistaan Hae III:lla, merkitään radioaktiivisesti 5'-päistään ja katkaistaan Pst I:llä. Pst I -Hae III\*-DNA-jakeet (57 bp) eristetään 10% polyakryyliamidigeelillä. Toisaalta 5 µg plasmidia katkaistaan EcoR I:llä, merkitään 5'-päistään ja katkaistaan Pst I:llä. Pst I -EcoR I\*-DNA-palaneen (235 bp) ja EcoR I\* - Pst I-DNA-palaneen (n. 700 bp) eristetään 8% polyakryyliamidigeelillä. Eri DNA-palasten sekvenssit määritetään Maxamin ja Gilbertin menetelmällä (15).

cDNA-liitännäisten nukleotidisekvenssit on esitetty kuvissa 12-14. Kuvassa 12 on esitetty CG-pBR 322/HLycIFN-4<sub>1</sub>:n cDNA-liitännäisen osittainen nukleotidisekvenssi. Liitännäisessä on 5'-päässä oheisena 23 deoksiguanosiinitähden jakso ja se sisältää osan IFN-α<sub>2</sub>:n (Le) cDNA:sta, jota Streuli et al. (46) ovat selostaneet. 3'-ekstrakstronisessa alueessa on joitakin pieniä poikkeamia (pistemutaatioita) ja 318 lisänukleotidin jakso. CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub>:n cDNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 13. Liitännäisessä on 5'-päässä ohessa 20-23 deoksiguanosiinitähdettä ja se on samanlainen, mutta ei identtinen sen IFN-α:n (tyyppi D) cDNA:n kanssa, jota Goedel et al. ovat selostaneet (743); ks. myös Mantei et al. (27)7. Lukuunottamatta eroja cDNA-alueissa, jotka edeltävät ja seuraavat IFN:ää koodittavaa sekvenssiä, IFN-geeni sisältää kohdissa 28-30 GCC-tripletin ja kohdissa 409-411 GCG-tripletin, jotka koodittavat alaniinia, eikä tripletejä GTC ja GTG, vastaavasti, jotka koodittavat valiinia. Viimein CG-pBR 322/HLycIFN-5<sub>1</sub>:n cDNA-liitännäisen nukleotidisekvenssissä (kuva 14) on

17 deoksiguanosiinitähdettä 5'-päässä. Nukleotidisekvenssi muistuttaa IFN- $\alpha$ :n (tyyppi B) cDNA:n vastaavaa, jota Goeddel et al. ovat selostaneet (43). Kuitenkin HLycIFN-5<sub>1</sub>:n cDNA-liitännäisen 5'-päässä on lisänukleotideja, pistemutaatioita, puuttuvia kohtia ja lisäyksiä ekstrakistronisessa alueessa ja IFN:ää koodittavassa sekvenssissä kohdissa 22 ja 361-372.

F. Ihmisen interferonien synteesi käyttämällä *E. coli*-bakteereita, joissa on ihmisen IFN:n suhteen spesifisiä yhdistelmä-DNA-mokekyylejä

5 kloonin, joiden on osoitettu sisältävän ihmisen interferonin suhteen spesifisiä DNA-molekyylejä, nimittäin

*E. coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b  
*E. coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-4<sub>1</sub>,  
*E. coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-5<sub>1</sub>,  
*E. coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8'<sub>1</sub>, ja  
*E. coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN- $\beta$ <sub>1</sub>,

IFN-aktiivisuus tutkitaan, mikä kussakin tapauksessa tehdään seuraavalla tavalla:

Vastaavan *E. coli*-kloonin viljelmiä (30 ml:n suspensiot) kasvatetaan tryptonialustassa optiseen tiheyteen (OD<sub>650</sub>) noin 1. Solut otetaan talteen ja suspendoidaan uudestaan 0,5 ml:aan vesiliuosta, jossa on 30 mM NaCl ja 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). Lisätään lysotsyymiä määrään 1 mg/ml (Sigma). Kun on pidetty 30 minuuttia 0°C:ssa, suspensiot jäädytetään (nestemäinen tyyppi) ja sulatetaan (37°C:ssa) 5 kertaa ja sentrifugoidaan 20 minuuttia nopeudella 20 000 1/min SS 34 Sorvall-roottorissa 4°C:ssa. Emäliuosten IFN-aktiivisuus määritetään käyttämällä sytopaattista biomääritystä Armstrongin mukaan (32), kuten vaiheessa Ac on selostettu. Saadaan seuraavat aktiivisuudet:

Uutteen lähde	IFN-aktiivisuus
Yhdistelmä-DNA:n sisältävä E. coli HB 101	(IU/ml)
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-4 <sub>1</sub>	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-5 <sub>1</sub>	10 000;10 000
CG-pBR 322/HLycIFN-8 <sub>1</sub>	100;100
CG-pBR 322/HLycIFN-β <sub>1</sub>	0;0

Mahdollisesti kloonit, jotka eivät anna mitään mitattavissa olevaa IFN-aktiivisuutta, sisältävät yhdistelmä-DNA-muotoja, joissa HuLyIFN-cDNA-liitännäinen on väärässä suunnassa transkription suunnan suhteen. Tästä syystä tällaisen kloonin (CG-pBR 322/HLycIFN-1'b) yhdistelmä-DNA, jossa on täyspitkä cDNA-liitännäinen, suunnataan uudestaan seuraavalla tavalla: Kloonin E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b plasmidi-DNA eristetään edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ec) ja katkaistaan Pst I:llä. 0,5 µg katkaistua DNA:ta 20 µl:ssa puskuriseosta, jossa on 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 25 mM NaCl ja 50 µg/ml gelatiinia, käsitellään 0,2 yksiköllä T4 DNA-ligaasia (Biolabs) ja 0,5 mM ATP 2 tuntia 15°C:ssa. E. coli HB 101 transformoidaan cDNA-seoksella edelläkuvatulla tavalla (vaihe D). Transformoituneet kloonit valitaan McConkey-agarlevyillä, joihin on lisätty tetrasykliiniä ja sen jälkeen otetaan toisinnot nitroselluloosasuotimille. Neljälle bakteeripesäkkeelle, jotka hybridisoituvat CG-pBR 322/HLycIFN-1'b:n yhdistelmä-DNA:n <sup>32</sup>P:llä merkityn Pvu II-Bgl II\*-palasen (351 bp) kanssa annetaan nimet E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b<sub>1</sub> - -1'b<sub>4</sub>. Näistä 4 kloonista valmistetaan uutteen ja niiden IFN-aktiivisuus mitataan edelläkuvatulla tavalla. Näin saadaan seuraavat aktiivisuudet:

Uutteen lähde	IFN-aktiivisuus
Yhdistelmä-DNA:n sisältävä E. coli HB 101	(IU/ml)
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b <sub>1</sub>	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b <sub>2</sub>	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b <sub>3</sub>	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b <sub>4</sub>	30;30

Näin ollen plasmidi CG-pBR 322/HLycIFN-1'b<sub>4</sub> sisältää cDNA-liitännäisen, joka kykenee ohjaamaan sellaisen polypeptidin synteesiä, jolla on IFN-aktiivisuus.

G. Sellaisten yhdistelmäplasmidien rakentaminen, jotka kykenevät tuottamaan suuria määriä IFN-aktiivisuuden omaavia polypeptidejä

I. CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -1-yhdistelmäplasmidin rakentaminen

Jotta saataisiin parannetuksi E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b-kloonin IFN-spesifisen proteiinin saantoa, suoritettiin seuraava rakentaminen, joka on esitetty kaaviollisesti kuvassa 15.

a. cDNA-liitännäisen valmistus

Kloonin E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b yhdistelmäplasmidi-DNA (150  $\mu$ g) katkaistaan Pst I:llä (Biolabs) tavallisilla menetelmillä (ks. vaihe Ed). Uutetaan fenolilla ja saostetaan etanolilla ja leikattu liitännäinen eristetään sakkaroositiheysgradienttisentrifugoinnilla (5-23%) liuoksessa, jossa on 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. Sentrifugointi suoritetaan nopeudella 35 000 1/min TST 41-roottorissa (Kontron AG) 15<sup>o</sup>C:ssa 16 tunnissa. Kerätään 0,3 ml:n jakeet ISCO-gradientinkeräyslaitteessa nopeudella 1 ml/min. Jakeet, jotka si-



sältävät pienen jakeen (so. liitännäisen) yhdistetään. DNA saostetaan etanolilla tavalliseen tapaan ja sakka sentrifugoidaan HB-4-roottorissa (Sorvall) nopeudella 10 000 1/min 0°C:ssa 10 minuuttia. Sakka liuotetaan uudestaan 60 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA. Näin saadaan 30 µg DNA:ta, kun mitataan optinen tiheys.

DNA-liitännäinen (10 µg) katkaistaan Hae III:lla (Biolabs) ja palaset fraktioidaan 2-prosenttisellä agarosigeelillä liuoksessa, jossa on 50 mM Tris, 50 mM boorihappoa, 1 mM EDTA ja 0,5 µg/ml etidumbromidia. Suurimmat DNA-palaset, Hae III-Pst I (869bp) ja HaeIII - Hae III (82 bp, ks. kuva 15, palaset 3 ja 4 vastaavasti), ja kukin leikataan geelistä, ruiskutetaan ohuen neulan läpi ruiskulla 5 ml:aan liuosta, jossa on 0,15 M NaCl, 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) ja 1 mM EDTA, ja eluoidaan yön yli ravistellen. Eluaatti lasketaan 100 µl:n DE-52 (Whatman) Pasteur-pipettipylvään läpi DNA:n adsorboimiseksi. Pylväs pestään 2 ml:lla samaa puskuria ja DNA eluoidaan 400 µl:lla liuosta, jossa on 1,5 M NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. Sakka saostetaan 2 tilavuudella etanolia -20°C:ssa yön aikana. Sakka sentrifugoidaan talteen Eppendorf-sentrifugissa.

Hae III-Hae III-DNA-jae (82 bp) liuotetaan uudestaan ja katkaistaan Sau 3A:lla (Biolabs). Entsyymi inaktivoidaan lämmön avulla 65°C:ssa 30 minuutin aikana. 1 µg Hae III-Pst I-DNA-jaetta (869 bp) lisätään, liuoksen väkevyyttä säädetään määrään 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT ja 0,5 mM ATP, ja lisätään T4 DNA-ligaasia (Biolabs) 30 yksikköä/µl reaktiutilavuutta. Liuosta inkuboidaan 10 tuntia 15°C:ssa. Uutetaan fenolilla ja kloroformilla ja seos fraktioidaan 2% agarosigeelillä, joka on tehty Tris-boraatti-EDTA:han, etidumbromidin läsnäollessa. Sau 3A-Pst I-DNA-jae (ks. kuva 15, jae 5) uutetaan edelläkuvatulla tavalla, saostetaan etanolilla ja liuotetaan uudestaan 10 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5)

ja 0,05 mM EDTA.

b. Sellaisen DNA-palasen valmistaminen, joka sisältää pBR 322:n  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen (ApPr)

Plasmidi pBR 322 katkaistaan Pst I:llä (ks. vaihe Cb) ja käsitellään 4 yksiköllä/ml eksonukleaasia Bal 31 (Bethesda Research Lab.) 30°C:ssa 4-10 minuutin ajan  $\beta$ -laktamaasia koodittavan sekvenssin poistamiseksi.

Syntetisoidaan kemiallinen DNA-sidoksenmuodostaja, jonka kaava on

5'-ATGTGTGATCACACAT-3'

edelläkuvatulla menetelmällä (vaihe Ea). Sidoksenmuodostaja liitetään Bal 31:llä käsiteltyyn pBR 322 DNA:han käyttämällä tavanomaisia menetelmiä. Saatu yhdistelmä-molekyylä katkaistaan restriktioendonukleaaseilla Bcl I (Biolabs) ja EcoR I. Katkaisutuotteet fraktioidaan 8% polyakryyliamidigeelillä Tris-boraatti-EDTA:ssa edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ba). DNA-palaset (ApPr-DNA-palaset), jotka kulkevat 184 bp:n ja 234 bp:n merkki-DNA-palasten välissä, eristetään edelläkuvatulla tavalla (vaihe Ia) ja saostetaan etanolilla tavalliseen tapaan. Sakka liuotetaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA.

c. ApPr-DNA-palasen liittäminen cDNA-liitännäiseen

Liuokset, joissa on ApPr-DNA-palaset ja cDNA-liitännäinen, yhdistetään. Seos säädetään väkevyyteen 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT ja 0,5 mM ATP, ja inkuboidaan 30 yksikön/ $\mu$ l kanssa T4 DNA-ligaasia (Biolabs) 15°C:ssa 12 tuntia. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, seos fraktioidaan 1% matalalla sulavassa agarosigeelissä (Biorad). Saatu ApPr-cDNA-palanen liitetään suureen pBR 322-palaseen, joka on katkaistu sekä Pst I:llä (Biolabs) että Eco I:llä (Biolabs), seuraavalla tavalla. Geelipala, jossa on ApPr-

cDNA-palanen (noin 20  $\mu$ l) sekoitetaan pBR 322:n PstI - Eco I-palaseen, sulatetaan 2 minuuttia 65°C:ssa ja jäädytetään 37°C:een ja väkevyydeksi säädetään 0,5 mM ATP, 10 mM DTT ja 10 mM MgCl<sub>2</sub> ja inkuboidaan T4 DNA-ligaasin (30 yksikköä/ $\mu$ l) kanssa (Biolabs) 12 tuntia 15°C:ssa.

Lisätään 1/10 tilavuutta liuosta, jossa on 100 mM Tris.HCl (pH 7,5), 100 mM CaCl<sub>2</sub> ja 100 mM MgCl<sub>2</sub>, liuosta kuumennetaan 10 minuuttia 65°C:ssa ligaasin inaktivoimiseksi ja jäädytetään 37°C:een. Sitten liuoksella transformoidaan Ca<sup>2+</sup>-käsitelty E. coli HB 101-kanta edelläkuvatulla tavalla (vaihe D) ja suoritetaan kasvatus McConkey-agarlevyillä, joihin on lisätty 10  $\mu$ g/ml tetra-sykliiniä. Transformoituneet pesäkkeet seulotaan IFN-aktiivisuuden suhteen (ks. vaihe F). Suurimman IFN-aktiivisuuden tuottava klooni valitaan ja sille annetaan nimi E. coli HB 101 CG-pBR(AP)/LycIFN- $\alpha$ -1. Aktiivisuudeksi saadaan 40 000 (IU/ml), joka merkitsee 1300-kertaista parannusta verrattuna alkuperäiseen klooniin E. coli HB 101 CG-pBR322/HLycIFN-1'b.

Kloonin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -1 yhdistelmäplasmidi eristetään viljelmästä edelläkuvatulla tavalla (vaihe 3c) ja tunnistetaan määrittämällä cDNA-liitännäisen (IFN-geeni) ja  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen nukleotidisekvenssi. Saadun tuloksen yhteenveto on esitetty kuvassa 16.

## II. Yhdistelmäplasmidin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 rakentaminen

Kloonin E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub>:n IFN-spesifisiä proteiinisaantoja parannetaan seuraavalla tavalla (ks. kuva 17):

- a. Sellaisen DNA-palasen valmistus, joka sisältää CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -1:n  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen.

CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -1-DNA (100  $\mu$ g) katkaistaan Hind III:lla (Biolabs) ja Bgl II:lla (Biolabs). Uutetaan fenolilla ja saostetaan etanolilla ja leikattu DNA-palane erotetaan sakkaroosigradianttisentrifugoinnilla (5-23%) liuoksessa, jossa on 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. Sentrifugointi suoritetaan nopeudella 58 000 1/min TST 60-roottorissa (Kontron AG) 15<sup>o</sup>C:ssa 4 tunnin kuluessa. Kerätään 0,2 ml jakeet edelläkuvatulla tavalla. Pienen palan sisältävät jakeet (Hind III - Bgl II) yhdistetään ja DNA saostetaan etanolilla tavalliseen tapaan. Sakka liuotetaan uudestaan 80  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA. Näin saadaan 16  $\mu$ g DNA, kun mitataan optinen tiheys.

DNA-palane (Hind III-Bgl II) (4  $\mu$ g) katkaistaan Sau 3A:lla (Biolabs) ja katkaisutuotteet fraktioidaan 6% polyakryyliamidigeelissä Tris-boraatti-EDTA:ssa edelläkuvatulla tavalla. DNA-palaset värjätään EtBr:ssä (0,5  $\mu$ g/ml), Hind III-Sau 3A-DNA-palane (239 bp) uutetaan ja ersitetään edelläkuvatulla tavalla. DNA saostetaan etanolilla tavalliseen tapaan. Sakka liuotetaan uudestaan 20  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA.

b. cDNA-liitännäisen valmistus

cDNA-liitännäinen leikataan irti yhdistelmäplasmidista CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub> edelläkuvatulla tavalla (kohta Ia).

cDNA-liitännäinen (2 $\mu$ g) katkaistaan 2,5 yksiköllä Sau 3A (Biolabs) käyttämällä 10  $\mu$ g/ml EtBr ja inkuboidaan 60 minuuttia 37<sup>o</sup>C:ssa. Katkaisutuotteet uutetaan fenolilla ja DNA saostetaan etanolilla edelläkuvatulla tavalla. DNA-palaset fraktioidaan 1,2 % agarosigeelissä liuoksessa, jossa on 50 mM Tris, 50 mM boorihappoa, 1 mM EDTA ja 0,5  $\mu$ g/ml etidiumbromidia.

Toiseksi suurin DNA-palane (Sau 3A-Pst I: 693 bp) uutetaan geelistä ja puhdistetaan kohdassa Ia) kuvatulla

tavalla. DNA liuotetaan uudestaan 20  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA.

c. Hind III-Sau 3A-DNA-palasen liittäminen cDNA-liittämissä (Sau 3A-PstI)

Yhtä suuret määrät molempia DNA-palasia (n. 50 ng) inkuboidaan liuoksessa, jossa on 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP ja 30 yksikköä/ $\mu$ l T4 DNA-ligaasia (Biolabs) 15°C:ssa 3 tuntia. Seosta inkuboidaan 15 minuuttia 80°C:ssa ja pitoisuus säädetään määrään 50 mM NaCl. DNA-seosta hajotetaan 0,5 yksiköllä PstI (Biolabs) ja 1 yksiköllä Hind III (Biolabs) 20 minuuttia 37°C:ssa. DNA uutetaan fenolilla, saostetaan etanolilla ja liuotetaan uudestaan 20  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA.

Puolet saadusta liuoksesta liitetään plasmidin pBR 322 suureen Hind III-PstI-DNA-palaseen (n. 100 ng) liuoksessa, jossa on 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0,5 mM ATP ja 30 yksikköä/ $\mu$ l T4 DNA-ligaasia (Biolabs), 2 tuntia 15°C:ssa.

1/10 liuoksen tilavuudesta käytetään E. coli HB 101:n transformointiin kohdassa D) kuvatulla tavalla. Transformoituneiden pesäkkeiden IFN-aktiivisuus tutkitaan edellä kuvatulla tavalla (ks. vaihe F).

Suurimman IFN-aktiivisuuden syntetisoiva kloonin valitaan ja sille annetaan nimitys E. coli HB 101 CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -3.

IFN-aktiivisuus määritetään edellä kuvatulla tavalla (vaihe F). Näin saadaan aktiivisuudeksi 70 000 IU/ml, joka vastaa 700-kertaista parannusta verrattuna alkuperäiseen kloonin E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8<sub>1</sub>.

Kloonin CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 yhdistelmäplasmidi eristetään viljelmästä edellä kuvatulla tavalla (vaihe Cc) ja tunnistetaan määrittämällä cDNA-liittämissä (IFN-geeni) ja  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen nukleotidisekvenssi. Tuloksesta on esitetty yhteenveto kuvassa 18.

Plasmidin CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 rakentamisjärjestystä voidaan käyttää kaikkien  $\alpha$ -IFN-cDNA-geenien tai sopivasti leikattujen kromosomaalisten  $\alpha$ -IFN-geenien rakentamiseen yleensä.

Esimerkiksi lähtemällä plasmidista CG-pBR 322/HlycIFN-5<sub>1</sub> saadaan plasmidi CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -2 aivan samalla tavalla kuin plasmidin CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 kohdalla on kuvattu. Tämä uusi plasmidi sisältää CG-pBR 322/HlycIFN-5<sub>1</sub>:n DNA-liitännäisen ja  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -1:stä. Edelläkuvatulla tavalla valitaan klooni E. coli HB 101 CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -2. IFN-aktiivisuudeksi saadaan 50 000 IU/ml, joka vastaa 5-kertaista kohoamista alkuperäiseen E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN-5<sub>1</sub>-kantaan verrattuna. cDNA-liitännäisen  $\beta$ -laktamaasin ohjausalueen nukleotidisekvenssi plasmidissa CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -2 määritetään edelläkuvatulla tavalla ja se on esitetty kuvassa 19.

### III. Valmistettujen mikro-organismien taltiointi

Esimerkissä 10 kuvatulla tavalla valmistetuista mikro-organismeista ja yhdistelmä-DNA-molekyyleistä on taltioitu näytteet kokoelmaan Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 14. syyskuuta 1981, ja niille on annettu kokoelmanumerot:

E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN- $\beta$ <sub>1</sub>; NRRL B-12528  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN-4<sub>1</sub>; NRRL B-12529  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN-1'b; NRRL B-12530  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN-5<sub>1</sub>; NRRL B-12531  
E. coli HB 101 CG-pBR 322/HlycIFN-8<sub>1</sub>; NRRL B-12532

Esimerkki 11: E. coli-plasmidien CG-pBR 322/HlycIFN-1'b ja -5<sub>1</sub> (ks. esimerkki 10) lymfoblastoidista IFN-1'b:tä ja IFN-5<sub>1</sub>:tä koodittavat alueet voidaan alakloonata plas-

midiin p30 (ks. esimerkki 4) vastaavasti kuin IFN-8<sub>1</sub>'n kohdalla on kuvattu esimerkeissä 5 ja 6. Tällöin tarvitaan osittainen hajotus restriktioendonukleaasilla Hae III. Tällä tavalla saadut hiivan yhdistelmäplasmidit ovat p30IFN2(1'b), p30IFN2'(1'b), p30IFN2(5<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(5<sub>1</sub>).

Saatuja yhdistelmäplasmideja voidaan käyttää *Saccharomyces cerevisiae* RH971-kannan transformointiin esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Voidaan valita seuraavat pesäkkeet, jotka sisältävät yhdistelmäplasmidin, jossa on lymfoblastoidisen IFN:n cDNA-liitännäinen.

- S. cerevisiae RH971/p30IFN2(1'b)
- S. cerevisiae RH971/p39IFN2'(1'b)
- S. cerevisiae RH971/p39IFN2(5<sub>1</sub>)
- S. cerevisiae RH971/p30IFN2'(5<sub>1</sub>)

Esimerkki 12: Esimerkissä 9 kuvatulla tavalla voidaan saada seuraavat hiivan yhdistelmäplasmidit lähtemällä plasmideista p30IFN2(1'b), -(5<sub>1</sub>), -(8<sub>1</sub>) ja p30IFN2'(1'b), -(5<sub>1</sub>), vastaavasti:  
 pJDB207/IFN2(1'b), pJDB207/IFN2'(1'b), pJDB207/IFN2(5<sub>1</sub>), pJDB207/IFN2'(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IFN2(8<sub>1</sub>).

Nämä yhdistelmäplasmidit voidaan transformoida *S. cerevisiae* RH971-kantaan valitsemalla leusiinin suhteen prototrooppiset pesäkkeet. Näin saadaan seuraavat pesäkkeet, joissa on yhdistelmäplasmidi, jossa on lymfoblastoidisen IFN:n cDNA-liitännäinen:

- S. cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(1'b)
- S. cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2'(1'b)
- S. cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(5<sub>1</sub>)
- S. cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2'(5<sub>1</sub>)
- S. cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(8<sub>1</sub>)

Esimerkki 13: Sellaisen ilmentämisplasmidin rakentaminen, jossa on PHO5-promoottori ja PHO5:n transkription päätös-signaali (ks. kuva 20)

a) EcoRI-katkaisukohtien poisto plasmidista p30:

Kuvissa 20-22 kaaviollisesti esitetty toimintatapa vaatii plasmidissa p30 sijaitsevan ainoan EcoRI-katkaisukohtien poistamista. 5 µg p30-DNA:ta (ks. esimerkki 4) katkaistaan täysin restriktioendonukleasilla EcoRI (Boehringer). Syntyneiden lomittaisten päiden täyttämiseksi 1 µg EcoRI:llä hajotettua p30-DNA:ta käsitellään 50 µl:ssa liuosta, jossa on 50 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,25 mM dATP ja 0,25 mM dTTP, 30 minuuttia 37°C:ssa 1 yksiköllä DNA-polymeraasia (Klenow, suuri palanen, BRL). Etanolisaostuksella saatu DNA liitetään tavalliseen tapaan ja sillä transformoidaan tätä varten käsitellyt E. coli HB 101-solut esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Kloonit, jotka ovat vastustuskykyisiä EcoRI:llä tapahtuvalle katkaisulle, nimitetään p30/EcoRI<sup>R</sup>:ksi.

b) PHO5:n transkription päättämisen Sau3A-PstI-palasan (0,37 kb) eristäminen

PHO5-transkripti on kartoitettu S1-nukleasikartoituksella (48). Transkription päätöksen signaalien on osoitettu sijaitsevan PHO5-geenin Sau3A-PstI-palassessa (0,37 kb). Sau3A-PstI-palasan nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 21.

5 µg pJDB207/PHO5,PHO3-DNA:ta (ks. esimerkki 2) katkaistaan täysin restriktioendonukleaseilla Sau3A ja PstI. Katkaisutulokset erotetaan vertikaalisessa 1,5% matalalla sulavassa agarosigeelissä TBE-puskurissa. 0,37 kb sisältävä Sau3A-PstI-palanen paikannetaan etidymbromidivärjäyksellä ja tämän DNA-palasan sisältävä



geelikohta leikataan irti mahdollisimman tarkasti.

c) Sau3A-PstI-PHO5-palasan kloonaminen M13mp9:ään

M13mp9-fagi-DNA on hyödyllinen vektori, jossa on kimppu ainoita katkaisukohtia (49). 5 µg M13mp9-DNA:ta katkaistaan täysin restriktioendonukleaaseilla BamHI ja PstI. Suurempi 7,2 kb:n DNA-palanen erotetaan hyvin pienestä palasesta (8 bp) 0,8% matalalla sulavassa agarosigeelissä. Suuren DNA-palasan sisältävä geelikohta leikataan irti. Geelikohdat, joissa on 0,37 kb:n Sau3A-PstI-palanen pJDB207/PHO5,PHO3:sta (ks. esimerkki 13b) ja 7,2 kb:n BamHI-PstI-palanen M13mp9:stä, nesteytetään 65°C:ssa, sekoitetaan keskenään suunnilleen ekvimolaarisina määrinä ja laimennetaan vedellä agarosipitoisuuden alentamiseksi 0,3%:iin. Liittäminen suoritetaan 200 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris.HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP ja 600 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs). Tätä varten käsiteltyjen E. coli JM101 (Ca<sup>++</sup>)-solujen transduktio suoritetaan käsikirjan "M13-kloonaus ja DNA-sekvenssinmääritysjärjestelmä" mukaan, jonka on julkaissut New England Biolabs. Useista valkoisista täplistä kasvatetaan faageja ja niiden DNA-liitännäisen koko analysoidaan katkaisemalla restriktioendonukleaaseilla EcoRI ja PstI.

M13mp9:stä johdettu klooni, jossa on Sau3A-PstI-PHO5-transkription päätöspalanen eristetään ja sille annetaan nimi M13mp9/PHO5(Sau3A-PstI).

d) PHO5:n transkription päätöspalasan kloonaus plasmidiin p30/EcoRI<sup>R</sup>:

Alkuperäinen PHO5:n transkription päätöspalanen, joka on kloonattu faagiin M13mp9 (M13mp9/PHO5(Sau3A-PstI)), kloonataan HaeIII-HindIII-palasena plasmidiin p30/EcoRI<sup>R</sup>, joka on katkaistu BalI:llä ja HindIII:lla: M13mp9/PHO5(Sau3A-PstI)-DNA katkaistaan täysin restriktioendonukleaaseilla HaeIII ja Hind III. Saadut kaksi DNA-palasta erotetaan toisistaan 1,5 % vertikaalisessa matalalla sula-

vassa agarosigeelissä TBE-puskurissa. 0,39 kb:n palanen eristetään geelistä leikatusta palasesta. p30/EcoRI<sup>R</sup>-DNA katkaistaan BalI:llä ja HindIII:lla. Suuri 3,98 kb:n palanen erotetaan 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä TBE-puskurissa ja eristetään leikkaamalla irti tämän DNA-palasen sisältävä geelipala.

Geelipalat, joissa on 0,39 kb:n HaeIII-HindIII PHO5:n transkription päätöspalanen ja 0,39 kb:n BalI-HindIII-palanen p30/EcoRI<sup>R</sup>:stä, sulatetaan ja sekoitetaan keskenään suunnilleen ekvimolaarisina määrinä. Liittäminen ja kypsien *E. coli* HB101-solujen transformointi suoritetaan Esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Transformoituneiden solujen DNA analysoidaan katkaisemalla BalI:llä ja HaeIII:lla. Klooni, jossa on PHO5:n transkription päätösjakso, analysoidaan tarkemmin ja sille annetaan nimi p31 (ks. kuva 20).

Ilmentämisplasmidi p31 sisältää PHO5:n promoottori-alueen ja osan PHO5:n signaalisekvenssiä ja siihen liittyneenä DNA-jakson, jossa on PHO5:n transkription päätössiinaalit. Tämän vektorin ilmentämäksi tarkoitettuja vieraita kooditussekvenssejä voidaan helposti liittää promoottorin ja transkription päätössekvenssin väliin.

Esimerkki 14: Lymfoblastoidi-interferoni-5<sub>1</sub>-DNA:n liittäminen plasmidiin p31 (ks. kuva 22)

a) Plasmidin CG-pBR322/HLycIFN-5<sub>1</sub> HaeIII-HpaI-palasten erottaminen

*E. coli*-kantaa HB101 CG-pBR322/HLycIFN-5<sub>1</sub> (ks. esimerkki 10E) kasvatetaan 100 ml:ssa LB-alustaa, johon on lisätty 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja plasmidi-DNA eristetään esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. 10 µg CG-pBR322/HLycIFN-5<sub>1</sub>-DNA:ta hajotetaan täysin restriktioendonukleaseilla PstI ja HpaI. Katkaisutuotteet erotetaan preparatiivisella 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. PstI-

HpaI-palanen (noin 860 bp), jossa on IFN-5<sub>1</sub>:tä koodittava sekvenssi, leikataan irti geelistä ja eluoidaan agarosi-geelistä esimerkissä 4a kuvatulla tavalla ja puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografisesti esimerkissä 5a kuvatulla tavalla.

PstI-HpaI-palasesa on 3 HaeIII-kohtaa: kohdissa 41, 65 ja 146 (ATG:sta lähtien) IFN-5<sub>1</sub>:tä koodittavassa sekvenssissä. Osittainen HaeIII-katkaisu johtaa kolmeen HaeIII-HpaI-palaseen, joiden pituudet ovat vastaavasti 699 bp, 780 bp ja 804 bp. HaeIII-katkaisu säädetään huolellisesti niin, että saadaan suunnilleen yhtä suuret määrät kaikkia kolmea palasta. Palasten seos uutetaan fenolilla, saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudelleen 10 mM Tris:iin (pH 8) väkevyyteen 0,1 mg/ml.

b) BalI:llä katkaistun, defosforyloidun plasmidin p31 valmistus

6 µg p31-DNA:ta (ks. esim. 13d) katkaistaan täysin restriktioendonukleasilla BalI (BRL). Fenoliuuton ja etanolisaostuksen jälkeen DNA liuotetaan uudestaan 100 µl:aan liuosta, jossa on 50 mM Tris pH 8,0, ja lasketaan 50 µl:n kerroksen läpi tasapainotettua Chelex 100 (BioRAD) silikonoidussa Pasteur-pipetissä. Läpi virrannut määrä ja 450 µl sen jälkeistä pesuliuosta yhdistetään. Lisätään 0,4 yksikköä vasikan sisäelinten emäsfosfataasia (Boehringer). Kun on inkuboitu 1 tunti 37°C:ssa, entsyymi inaktivoidaan 65°C:ssa 1,5 tunnin kuluessa. Inkuboidun seoksen NaCl-pitoisuus säädetään määrään 150 mM. Linearisoitu, defosforyloitu p31-DNA puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografisesti (ks. esimerkki 5a). Etanolisaostuksen jälkeen DNA suspendoidaan uudestaan 10 mM Tris:iin pH 8 väkevyyteen 0,3 mg/ml.

c) Linearisoidun, defosforyloidun p31-DNA:n liittäminen IFN-5<sub>1</sub>-DNA:n HaeIII-HpaI-palasiin

0,6 µg defosforyloitua p31-vektori-DNA:ta, joka on katkaistu BalI:llä, liitetään 0,5 µg:aan IFN-5<sub>1</sub>-DNA:n osittaisia HaeIII-HpaI-palasia (ks. esimerkki 14a). Liittäminen suoritetaan 10 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP ja 300 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs), yön yli huoneenlämpötilassa. 1 µl:n erä liitosseosta lisätään 50 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikypsiä E. coli HB 101-soluja. Transformointimenetelmä on selostettu esimerkissä 4a.

Transformoituneita amp<sup>R</sup>-pesäkkeitä kasvatetaan yksittäisesti LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan Holmes et al:n menetelmällä (50) ja analysoidaan hajottamalla restriktioendonukleasilla BstEII (yksi ainoa kohta PHO5-promoottorissa).

20 kloonina, joissa on IFN-5<sub>1</sub>-liitännäinen tutkitaan tarkemmin BstEII-EcoRI-kaksoiskatkaisulla liitännäisen suunnan ja koon määrittämiseksi. 8 kloonista, joissa liitännäinen on oikeassa suunnassa, löydetään kaikki 3 odotettua liitännäiskokoa. Koko vastaa niitä kolmea HaeIII<sub>1-3</sub>-HpaI-palasta, jotka saatiin suorittamalla osittainen IFN-5<sub>1</sub>-geenin HaeIII-hajotus (ks. esimerkki 14a). Klooneille annetaan nimet p31/IF1(5<sub>1</sub>), p31/IF2(5<sub>1</sub>) ja p31/IF3(5<sub>1</sub>), joiden sisältämät IFN-5<sub>1</sub>-liitännäiset ovat 804 bp:n (HaeIII<sub>1</sub>-HpaI-liitännäinen), 780 bp:n (HaeIII<sub>2</sub>-HpaI) ja 699 bp:n (HaeIII<sub>3</sub>-HpaI) vastaavasti.

Esimerkki 15: Lymfoblastoidi-interferoni-1'b-DNA:n liittäminen plasmidiin p31 (ks. kuva 22)

a) Plasmidin CG-pBR322/HLycIFN-1'b:n HaeIII-RsaI-palasten eristäminen

10 µg CG-pBR322/HLycIFN-1'b:n DNA:ta (ks. esimerkki 10E) katkaistaan restriktioendonukleaseilla PstI ja RsaI. Katkeamistuotteet erotetaan 0,8% matalalla sulavassa aga-

roosigeelissä. Geelistä eristetään PstI-RsaI-palanen, jonka koko on noin 870 bp, ja puhdistetaan edelläkuvulla tavalla (esimerkki 14a).

PstI-RsaI-palanen sisältää kolme HaeIII-kohtaa: kohdissa 13, 37 ja 118 IFN-1'b:tä koodittavan sekvenssin ATG:stä lukien. Osittainen HaeIII-katkaisu johtaa kolmeen HaeIII-RsaI-palaseen, joiden pituudet ovat 735 bp, 816 bp ja 840 bp vastaavasti. Palasten seos uutetaan fenolilla, saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudelleen 10 mM Tris:iin pH 8,0 väkevyyteen 0,1 mg/ml.

b) Linearisoidun, defosforyloidun p31-DNA:n liittäminen IFN-1'b-DNA:n HaeIII-RsaI-palasiin

0,6 µg defosforyloitua p31-vektorin DNA:ta, joka on katkaistu BalI:llä (ks. esimerkki 14b), liitetään 0,5 µg:aan IFN-1'b-DNA:n osittaisia HaeIII-RsaI-palasia. Liittäminen, kypsien E. coli HB 101-solujen transformointi liitoseksella ja transformoituneiden amp<sup>R</sup>-pesäkkeiden valinta suoritetaan esimerkissä 14c kuvatulla tavalla. Plasmidi-DNA valmistetaan menetelmällä Holmes et al. (50) ja analysoidaan hajottamalla restriktioendonukleasilla BstEII.

7 kloonina, joissa on IFN-1'b-liitännäinen analysoidaan BstEII-PvuII-kaksoiskatkaisulla. Löytyy kaksi kloonina, joissa HaeIII<sub>2</sub>-RsaI-palanen (816 bp) on oikeassa suunnassa. Tälle rakenteelle annetaan nimi p31/IF2(1'b).

Esimerkki 16: Lymfoblastoidi-interferoni-8<sub>1</sub>'-DNA:n liittäminen plasmidiin p31 (ks. kuva 23)

a) Plasmidin p30IFN1(8<sub>1</sub>') Sali-EcoRI-palasen (1,46 kb) eristäminen

5 µg p30IFN1(8<sub>1</sub>')-DNA:ta (ks. esimerkki 5d) katkaistaan restriktioendonukleaseilla Sali ja EcoRI. 1,46 kb:n Sali-EcoRI-palanen, joka sisältää PHO5-promoottorin liittyneenä IFN-8<sub>1</sub>'-proteiinia koodittavaan alueeseen, eristetään 0,8% matalalla sulavassa agarosigeelissä. DNA-kaista pai-

kannetaan etidiumbromidivärjäyksellä ja leikataan irti geelistä.

b) Plasmidin p31 SalI-EcoRI-palasen (3,5 kb) eristäminen

5 µg p31-DNA:ta (ks. esimerkki 13d) katkaistaan täysin restriktioendonukleaaseilla SalI ja EcoRI. 3,5 kb:n vektoripalanen, joka sisältää PHO5:n transkription päätöksen sekvenssin erotetaan 0,8 % matalalla sulavalla agarosi-geelillä ja DNA leikataan irti.

c) p30IFN1(8<sub>1</sub>):n SalI-EcoRI-palasen (1,46 kb) liittämisen p31:n SalI-EcoRI-palaseen (3,5 kb)

Geelipalat, joissa on 0,67 µg p31:n SalI-EcoRI-palasta (3,5 kb) ja 0,5 µg p30IFN1(8<sub>1</sub>):n SalI-EcoRI-palasta (1,46 kb), liitetään 240 µl:n reaktiutilavuudessa esimerkiksi 4a kuvatulla tavalla 15°C:ssa yön yli. 10 µl liitoseosta käytetään transformointikypsien E. coli HB101-solujen transformointiin.

Transformoituneita, amp<sup>R</sup>-pesäkkeitä kasvatetaan yksitellen LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan menetelmällä Holmes et al. (50) ja analysoidaan katkaisemalla restriktioendonukleaasilla BstEII (yksi ainoa kohta PHO5-promoottosissa).

Joukko klooneja, joissa on IFN-8<sub>1</sub>-liitännäinen, analysoidaan BstEII-PvuII-kaksoiskatkaisulla. Ne kaikki sisältävät 1,46 kb:n SalI-EcoRI-palasen. Identtisille klooneille annetaan nimitys p31/IF(8<sub>1</sub>).

Esimerkki 17: Geenirakenteiden alakloonaus suuren kopiomäärän tuottavaan hiivavektoriin pJDB207

Esimerkeissä 14-16 kuvatut rakenteet sisältävät PHO5-promoottorin, eri interferoneja koodittavat alueet ja PHO5:n transkription päätössignaali peräkkäin ryhmitettyinä ja kaikki sisällytettyinä pBR322:sta johdettuun vektoriin. Hiivassa tapahtuvaa ilmentämistä varten koko liitännäis-

nen alakloonataan hiivavektoriin pJDB207 (28), jolloin voidaan valita leusiinin suhteen prototrofiset pesäkkeet (ks. esimerkki 9 ja kuva 6).

p31/IF(8<sub>1</sub>) DNA, p31/IF1(5<sub>1</sub>) DNA, p31/IF2(5<sub>1</sub>) DNA, p31/IF3(5<sub>1</sub>) DNA ja p31/IF2(1'b) DNA, 2 µg kutakin, katkaistaan restriktioendonukleasaaseilla SalI ja HindIII. Katkaisutuotteet erotetaan toisistaan preparatiivisella 0.8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. Kustakin katkaisutuotteesta leikataan pieni jae (n. 2 kb) irti geelistä.

10 µg pJDB207-DNA:ta katkaistaan restriktioendonukleasaaseilla SalI ja HindIII. Suuri 6,2 kb:n palanen eristetään preparatiivisesta 0,8% matalalla sulavasta agarosigeelistä. Geelipalat, joissa on DNA-jaksot, nesteytetään 65°C:ssa ja laimennetaan vedellä niin, että agarosipitoisuus laskee noin 0,3 %:iin.

Kukin plasmidien p31/IF(8<sub>1</sub>), p31/IF1(5<sub>1</sub>), p31/IF2(5<sub>1</sub>), p31/IF3(5<sub>1</sub>) ja p31/IF2(1'b) 2 kb:n SalI-HindIII-jakeista sekoitetaan ekvimolaariseen määrään 6,2 kb:n HindIII-SalI-jaetta, joka on saatu pJDB207:stä. Liittämiset suoritetaan 100 µl:n reaktiotilavuuksissa 4 tunnissa 15°C:ssa. 10 µl:lla kutakin liitosseosta transformoidaan transformointikypsät *E. coli* HB101-solut esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. Useita kustakin kokeesta saatuja amp<sup>R</sup>-pesäkkeitä kasvatetaan erikseen LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampisilliiniä. Plasmidi-DNA:n sisältämän liitännäisen koko analysoidaan restriktioendonukleasaaseilla HindIII ja SalI. Saaduille klooneille, joissa on oikeat liitännäiset, annetaan nimet pJDB207/IF(8<sub>1</sub>), pJDB207/IF1(5<sub>1</sub>), pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) (ks. kuva 27), pJDB207/IF3(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) (ks. kuva 27).

Esimerkki 18: *Saccharomyces cerevisiae* AH220:n transformointi ja interferonituotannon aikaansaaminen

Kukin plasmideista pJDB207/IF(8<sub>1</sub>), pJDB207/IF1(5<sub>1</sub>),

pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>), pJDB207/IF3(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) siirretään *Saccharomyces cerevisiae*-kantaa AH220 (a, trp1, leu-2, leu2-112, his3, pho5, pho3) käyttämällä transformoinnissa Hinnen et al. kuvaamaa menetelmää (1).

Transformoituneet hiivasolut valitaan hiivan minimaalista kasvualustaa sisältäviltä levyiltä, joissa ei ole leusiinia. Yksittäiset transformoituneet hiivapesäkkeet poimitaan ja niitä kasvatetaan esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Eri hiivapesäkkeille annetaan seuraavat nimet:

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF(8'<sub>1</sub>),

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF1(5<sub>1</sub>),

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>),

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF3(5<sub>1</sub>) ja

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(1'b)

Esimerkki 19: Hiivasolu-uutteiden valmistus ja interferonitiitterin määrittäminen

Solu-uutteet valmistetaan ja interferoniaktiivisuus määritetään esimerkissä 8 kuvatulla tavalla.

Saaduista tuloksista on esitetty yhteenveto taulukossa 3.



Taulukko 3:

Saccharomyces cerevisiae-kannan AH220 interferoniaktiivisuus sen jälkeen kun se on transformoitunut yhdistelmäplasmideilla:

Plasmidit	Interferoniaktiivisuus yksikköä/ ml hiivasolu-uutetta
pJDB207/IF (8'₁)	$1 \cdot 10^7$
pJDB207/IF1 (5₁)	$7 \cdot 10^5$
pJDB207/IF2 (5₁)	$5 \cdot 10^5$
pJDB207/IF3 (5₁)	$3 \cdot 10^3$
pJDB207/IF2 (1'b)	$4 \cdot 10^3$

Esimerkki 20: Hepatitis B-viruksen pinta-antigeenin (HBVs) ilmentäminen hiivan PHO5-promoottorin ohjauksen alaisena

a) Liitoksen rakentaminen PHO5-promoottorin ja HBVs-proteiinia koodittavan alueen välille

5 µg plasmidin pHBV130 DNA:ta (51) katkaistaan restriktioendonukleasilla AvaI valmistajan suosittelemalla tavalla (New England Biolabs). Näin saadaan 1336 emäsparia sisältävä jakso, joka sisältää koko HBVs-proteiinia koodittavan alueen, mukaanlukien potentiaalisen esi-HBVs-sekvenssin 27 emäsparia. (ks. kuva 2 viitteessä 51: AvaI-jakso ulottuu DNA-palasessa Xho-kohdasta AvaI-kohtaan 62 emäsparia BamHI-kohdan yli, joka sijaitsee pintaa koodittavan ja ydintä koodittavan alueen välissä). 1336 emäsparia sisältävä jakso puhdistetaan pehmeäagarosielektroforeesilla (0,8% agarosigeeli) kuten esimerkissä 4a on kuvattu.

5 µg plasmidia pBR322/PHO5Bam-Sal (ks. kuva 1) leikataan restriktioendonukleaaseilla SalI ja AvaI (pBR322:n kohta 1424) ja saatu 3,9 kb:n vektoripalanen, joka sisältää pBR322-sekvenssit yhdessä PHO5 Bam-Sal-jakson kanssa puhdistetaan pehmeäagarosielektroforeesilla edelläkuvatulla tavalla.

1 µg 1336 emäsparia sisältävää jaksoa liitetään 3 µg:aan 3,9 kb sisältävään vektorijaksoon 50 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 60 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP ja 600 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs), 15°C:ssa 4 tuntia. E. coli HB101:n transformointi ampisilliinin suhteen vastustuskykyiseksi ja plasmidin eristäminen suoritetaan esimerkissä 4a kuvatulla tavalla.

Plasmidin oikea rakenne todetaan restriktioanalyysillä. Näin rakennetun uuden plasmidin nimi on pBR322/PHO5/HBVs (ks. kuva 24).

b) PHO5-promoottorin asentaminen tarkoin HBVs-proteiinia koodittavaan alueeseen

Edelläkuvattu liitos saa aikaan kuvassa 25 esitetyn DNA-sekvenssiryhmitelmän. Emäsjärjestystiedot on otettu kuvasta 3 (PHO5) ja julkaisusta Pasel et al. (52; HBVs). mRNA:n aloituskohta määritetään tavanomaisella S1-kartotuksella (48) käyttämällä pBR322/PHO5 Bam-Sal:n BamHI-SalI-palasta (kuva 1). Jotta voitaisiin eliminoida plasmidissa pBR322/PHO5/HBVs oleva PHO5-proteiinia koodittava alue, 5 µg plasmidia katkaistaan KpnI-restriktioendonukleaasilla (valmistajan ohjeiden mukaan), jolloin saadaan linearisoitu plasmidi.

4 µg linearisoitua plasmidia katkaistaan 1 yksiköllä eksonukleaasia Bal31 (Bethesda Research Laboratory) 30°C:ssa 45 sekunnin ajan kokonaistilavuudessa 100 µl reaktiosesta, jossa on 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,1. Reaktio pysäytetään fenoli-

uutolla edelläkuvatulla tavalla. Etanolisaostuksen jälkeä DNA suspendoidaan uudestaan 5  $\mu$ l:aan TE-liuosta.

1  $\mu$ g:sta DNA:ta muodostetaan uudestaan rengasliittämällä yhteen T4-DNA-ligaasilla 20  $\mu$ l:n tilavuudessa (olosuhteet esimerkin 4a mukaiset). Kun *E. coli* HB101 on transformoitu ampicilliinin suhteen vastustuskykyiseksi (ks. esimerkki 4a), plasmidi-DNA eristetään edelläkuvatulla tavalla ja yksittäiset plasmidivalmisteet analysoidaan restriktioanalyysillä seuraavilla entsyymeillä: HaeIII, PstI, BstEII ja HhaI. Tämä analyysi mahdollistaa HhaI-kohdan läsnäolon määrittämisen (6 emäsparia ennen HBVs-proteiinia koodittavan alueen alkua) ja antaa mitan poistetun kohdan koolle. Liitoskohdan DNA-sekvenssi määritetään Maxamin ja Gilbertin menetelmällä (15) (radioaktiivinen merkitseminen BstEII-kohdassa, jonka paikka on -374, ks. kuva 3). Yhteen plasmidiin syntyneet poiston päätekohdat on merkitty kuvaan 24. Tämän plasmidin nimi on pBR322/PHO5/HBVs $\Delta$ 14.

c) PHO5-HBVs-liitännäisen siirto hiivaplasmiin pJDB207 (ks. kuva 26)

5  $\mu$ g plasmidin pBR322/PHO5/HBVs 14 DNA:ta katkaistaan restriktioendonukleasilla BamHI (New England Biolabs, valmistajan kuvaamissa olosuhteissa). 1,8 kb:n BamHI-palane valmistetaan pehmeäagarosigeelielektroforeesilla (0,8 % agarosii) esimerkissä 4a kuvatulla tavalla.

2  $\mu$ g hiivavektoria pJD207 katkaistaan samalla entsyymillä. 1  $\mu$ g katkaistua plasmidia pJDB207 ja 1  $\mu$ g 1,8 kb:n BamHI-restriktiopalasta liitetään yhteen 20  $\mu$ l:n kokonaisuudessa käyttämällä esimerkissä 20a kuvattuja olosuhteita. *E. coli* HB101:n transformointi ampicilliinin suhteen vastustuskykyiseksi ja plasmidi-DNA:n eristäminen suoritetaan edelläkuvatulla tavalla (esimerkki 4a). Yksittäiset plasmidit analysoidaan restriktioanalyysillä (BamHI) ja liitetyn BamHI-palasan suunta määritetään HindIII/BstEII-kaksoiskatkaisulla. Rakentaminen on esi-

tetty kaaviollisesti kuvassa 26. Kuten kuvassa 26 on merkitty, plasmidin nimi on pJDB207/PHO5/HBVs $\Delta$ 14

Plasmidi transformoidaan hiivakantaan AH220 esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Transformoituneet hiivasolut valitaan, inkuboidaan nestemäisessä alustassa ja kasvatetaan esimerkissä 7 kuvatuissa tuotannon päällekytkävissä olosuhteissa. Yhdelle transformoituneelle hiivapötkökeelle annetaan nimi *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/HBVs $\Delta$ 14.

Solu-uute valmistetaan esimerkissä 8 kuvatulla tavalla ja tuotettu proteiinimäärä määritetään Abbottin radioimmuunimäärityksellä (51). Olettaen, että hiivan tuottama HBVs-antigeeni reagoi samalla tavalla kuin ihmisen seerumin antigeeni, löytyy päälle kytketyissä olosuhteissa 2  $\mu$ g HBVs-antigeeniä per ml hiivauutetta. Pois kytketyissä olosuhteissa tiitteri on alle 0,001  $\mu$ g/ml.

d) PHO5-HBVs-liitännäisen siirto sellaiseen hiivaplasmiin, jossa on PHO5:n transkription päätössekvenssi

5  $\mu$ g plasmidin pJDB207/IF(8<sub>1</sub>) DNA:ta (esimerkki 17) katkaistaan BamHI:llä edelläkuvatulla tavalla ja 6,9 kb:n vektoriosa eristetään pehmeäagarosielektroforeesilla (0,8% agarosii) kuten esimerkissä 4a on kuvattu. 5  $\mu$ g pBR322/PHO5/HBVs $\Delta$ 14:ta katkaistaan BamHI:llä edelläkuvatulla tavalla ja 1,8 kb:n BamHI-palane eristetään pehmeäagarosigeelielektroforeesilla. 1  $\mu$ g 6,9 kb:n vektorinpalasta ja 1  $\mu$ g 1,8 kb:n BamHI-palasta liitetään yhteen 20  $\mu$ l:n kokonaistilavuudessa käyttämällä esimerkissä 20a kuvattuja olosuhteita. *E. coli* HB101:n transformointi ampisilliinin suhteen vastustuskykyiseksi ja plasmidin eristäminen suoritetaan esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. Plasmidianalyysi suoritetaan restriktioendonukleaasikatkaisulla. Kuvan 26 mukaiselle plasmidille annetaan nimi pJDB207/PHO5/HBVs $\Delta$ 14t. Hiivakannan AH220 transformointi ja transformoituneiden solujen valinta suoritetaan esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Yhdelle

transformoituneelle hiivapesäkkeelle annetaan nimi  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/HBVsA14t.

Esimerkki 21:

Hepatiitti B-viruksen (HBV) DNA-sekvenssit, jotka on leikattu irti plasmideista

pBR322-PstI dG:HBV-KpnI dC;

pBR322-PstI dG: HBV-BamHI dC;

pBR322-PstI dG: HBV-Bg1II dC;

pBR322-PstI dG: HBV-EcoRI dC;

pBR322-BamHI:: HBV-BamHI;

pBR322-EcoRI: HBV-EcoRI;

pBR322-PstI dG:HBV-KpnI dC,

pBR322-PstI' dG:pHBV114-PstI dC;

(pBR322-EcoRI HindIII: Lac promoottorisekvenssi-HindIII: sidoksenmuodostajat)-BamHI,

pUR2-EcoRI: HBV114-HhaI EcoRI sidoksenmuodostajat,

pUR2-EcoRI: HBV114-HhaI EcoRI sidoksenmuodostajat,

pBR322-PstI dG:pHBV114-AcaI dC, ja

pBR322-PstI dG:pHB114-Taq dC,

kuten eurooppalaisessa patenttihakemuksessa 13828 on kuvattu, voidaan liittää (mielellään päiden sopivan muotoilun jälkeen) plasmidiin p30 tai p31 esimerkkien 5, 14 tai 15 mukaisesti ja sen jälkeen plasmidiin pJDB207 esimerkin 17 mukaisesti. *S. cerevisiae*n transformointi suoritetaan esimerkin 18 mukaisesti. Sellaisten polypeptidien ilmentyminen, joilla on HBV-antigeenisuus, määritetään esimerkin 20c mukaisesti.

Esimerkki 22: 3'-pään luetaan osallistumattomien DNA-sekvenssien poisto plasmideista pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) (ks. kuvat 27 ja 28)

Plasmidien pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) (ks. esimerkki 17) syntyi suhteellisen pitkät 3'-pään luentaan osallistumattomat jaksot, joiden pituudet olivat noin 440 bp ja 480 bp vastaavasti. Jotta rakennettujen plasmidien tämä alue saataisiin lyhemmäksi, DNA katkaistaan eksonukleaasilla Bal31 tämän alueen keskellä sijaitsevasta yhdestä ainoasta SmaI-kohdasta. Liitetään Xho-sidoksenmuodostajat ja DNA:sta muodostetaan rengas yhteenliittämällä.

a) SmaI:llä katkaistujen plasmidien pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) Bal31-hajotus

20 µg kutakin plasmidi-DNA:ta katkaistaan restriktioendonukleaasilla SmaI. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, DNA saostetaan etanolilla. DNA suspendoidaan uudestaan 10 mM Tris:iin pH 8,0 väkevyyteen 0,5 mg/ml. 10 µg SmaI:llä katkaistua DNA:ta kutakin hajotetaan 2 yksiköllä Bal31-endonukleaasia (BRL) 100 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 CaCl<sub>2</sub> ja 1 mM EDTA. 3 µg:n DNA-erät otetaan sen jälkeen, kun on inkuboitu 90, 120 ja 150 sekuntia 30°C:ssa, ja sekoitetaan välittömästi seokseen, jossa on 50 µl fenolia ja 60 µl TNE-liuosta. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, suoritetaan saostus etanolilla ja DNA suspendoidaan uudestaan 10 mM Tris:iin pH 8,0 väkevyyteen 100 µg/ml. Bal31:n eksonukleolyytin hajotuksen analysoimiseksi 0,7 µg kutakin ajankohdasta saatua DNA-näytettä hajotetaan kutakin HindIII/EcoRI:llä, kun on kyseessä plasmidista pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) johdetut näytteet, ja PvuII/HindIII:lla, kun on kyseessä plasmidista pJDB207/IF2(1'b) johdetut näytteet. Jatkokokeissa käytetään DNA-näytteitä, jotka on otettu 90 sekunnin kohdalla.

b) XhoI-sidoksenmuodostajien lisääminen Bal31:llä käsiteltyihin DNA-molekyyleihin

2,2 µg kutakin plasmidi-DNA:ta pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) ja pJDB207/IF2(1'b) inkuboidaan 90 sekunnin Bal31-hajotuksen jälkeen (ks. esimerkki 22a) 1 tunti 37°C:ssa 2,8 yksikön kanssa Klenow-DNA-polymeraasia (polymeraasi I:n suuri palanen, BRL) 35 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> ja 0,1 mM dNTP-laatuja.

3 µg XhoI-sidoksenmuodostajia (5'-CCTCGAGG-3', Collaborative Research) kinasoidaan 50 µl:ssa 6 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM DTT, 0,5 mM ATP ja 35 U T4 polynukleotidikinaasia (Boehringer), 30 minuuttia 37°C:ssa.

0,67 µg kinasoituja XhoI-sidoksenmuodostajia ja 0,4 µg Bal31:llä käsiteltyä tylppäpäistä plasmidin pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) tai pJDB207/IF2(1'b) DNA:ta liitetään yhteen yön ajan huoneenlämpötilassa 25 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 3,5 mM ATP ja 450 U T4 DNA-ligaasia. Yhteenliitetty DNA erotetaan ylimääräisistä sidoksenmuodostajista isopropanolisaostuksella, seoksessa jossa on 10 mM EDTA, 0,3 M natriumasettaattia pH 6,0 ja 0,54 tilavuutta isopropanolia. Kun on inkuboitu 35 minuuttia huoneenlämpötilassa, DNA sedimentoidaan sentrifugoimalla. Pelletit kuivataan ilmassa ja suspendoidaan uudestaan 17 µl:aan seosta, jossa on 6 mM Tris pH 7,9, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> ja 6 mM merkaptetaanolia. DNA:han liitetyt XhoI-sidoksenmuodostajat katkaistaan XhoI:llä, DNA saostetaan isopropanolilla edelläkuvatulla tavalla ja muodostetaan rengas yhteenliittämällä. Kun on liitetty yhteen 6 tuntia 15°C:ssa 50 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP ja 600 U T4 ligaasia, lisätään 10 µl kutakin liittämisseosta 100 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikypsä E. coli HB101-soluja (ks. esimerkki 4a).

72 transformoitunutta amp<sup>R</sup>-pesäkettä, jotka sisältävät plasmidin, jossa on IFN-5<sub>1</sub>-liitännäinen, kasvatetaan

yksittäisesti LB-seoksessa, jossa on 100 mg/l ampicilliiniä. Plasmidi-DNA-analysoidaan HaeIII-hajotuksella. Restriktiokartasta voidaan arvioida sen poistuman koko, jonka Bal31 on saanut aikaan. Kaksi kloonia tutkitaan tarkemmin ja niiden interferoniaktiivisuus määritetään. Niille annetaan nimet pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)<sup>Δ</sup>72 ja pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)<sup>Δ</sup> 82.

Kuvassa 28 on esitetty sen uuden liitoksen (XhoI-sidoksenmuodostaja) molemmilla puolilla oleva nukleotidisekvenssi, joka liitos on IFN-5<sub>1</sub>-geenin 3'-pään luentaan osallistumattoman alueen ja PHO5:n transkription päätösalueen välissä.

Vastaavalla tavalla kasvatetaan yksittäisesti 60 amp<sup>R</sup>-pesäkettä, joissa in IFN-1'b-liitännäinen, LB-alustassa, jossa on 100 mg/l ampicilliiniä. Plasmidi-DNA analysoidaan edelläkuvatulla tavalla. Valitaan yksi kloonin ja sen IFN-aktiivisuus määritetään. Sille annetaan nimi pJDB207/IF2(1'b)<sup>Δ</sup>.

Esimerkki 23: Sellaisten yhdistelmäplasmidien rakentaminen, jotka sisältävät siirrettäviä IFN-5<sub>1</sub>:n, -8<sub>1</sub>:n ja -1'b:n cDNA-liitännäisiä, joita voidaan käyttää kypsän lymfoblastoidi-IFN:n suoraan ilmentämiseen (ks. kuvat 29 ja 30).

#### a) cDNA-liitännäisten valmistus

cDNA leikataan yhdistelmäplasmideista CG-pBR322/HLycIFN-8<sub>1</sub>, CG-pBR322/HLycIFN-1'b, CG-pBR322/HLycIFN-5<sub>1</sub> katkaisemalla 150 µg kutakin plasmidi-DNA:ta PstI:llä (Biolabs) valmistajan ehdottamalla menetelmällä. Kun on uutettu fenolilla ja saostettu etanolilla, leikatut liitännäiset eristetään sakkaroositiheysgradienttisentrifugoinnilla (5-23%) liuoksessa, jossa on 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. Sentrifugointi suoritetaan nopeudella 35 000 1/min TST 41-roottorissa (Kontron AG) 15<sup>o</sup>C:ssä 16 tunnin ajan. 0,3 ml:n jakeet kerätään ISCO-



gradientinkerääjällä nopeudella 1 ml/min. Jakeet, joissa on pieni palanen (so. liitännäinen), yhdistetään. DNA saostetaan etanolilla tavalliseen tapaan ja sakka sentrifugoidaan talteen HB-4-roottorissa (Sorvall) nopeudella 10 000 1/min 0°C:ssa 10 minuutin ajan. Sakka liuotetaan uudestaan 60 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA. Näin saadaan 30 µg DNA:ta, kun mitataan optinen tiheys.

2 µg kutakin cDNA-liitännäistä hajotetaan 2,5 yksiköllä Sau3A:ta (Biolabs) 10 µg/ml:ssa EtBr ja inkuboidaan 37°C:ssa 60 minuuttia. Katkaisutuotteet uutetaan fenolilla ja DNA saostetaan etanolilla edelläkuvatulla tavalla. DNA-palaset fraktioidaan 1,2% agarosigeelissä liuoksessa, jossa on 50 mM Tris, 50 mM boorihappoa, 1 mM EDTA ja 0,5 µg/ml etidiumbromidia.

Kunkin kolmen hajotustuotteen toiseksi suurin DNA-jakso (Sau3A-PstI) leikataan irti geelistä, puristetaan ohuen neulan läpi ruiskulla 5 ml:aan 0,15 M NaCl, 50 mM Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA ja eluoidaan yön yli ravistelemalla. Eluaatti lasketaan 100 µl:n DE-52 (Whatman) Pasteur-pipettipylvään läpi DNA:n adsorboimiseksi. Pylväs pestään 2 ml:lla samaa puskuria ja DNA eluoidaan 400 µl:lla liuosta, jossa on 1,5 M NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. DNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia -20°C:ssa yön yli. Sakka sentrifugoidaan talteen Eppendorf-sentrifugilla ja liuotetaan uudestaan 10 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,8) ja 0,05 mM EDTA.

b) Vastaanottajaplasmidi-DNA-jakson valmistaminen

1. Plasmidin pBR322 katkaisu EcoRI:llä ja S<sub>1</sub>:llä

10 µg plasmidin pBR322 DNA:ta katkaistaan 15 yksiköllä EcoRI:tä (Biolabs) 60 minuuttia 37°C:ssa valmistajan ohjeiden mukaan. Uutetaan fenolilla ja saostetaan etanolilla ja DNA liuotetaan uudestaan 25 µl:aan vettä ja lomittaiset päät poistetaan käsittelemällä DNA 20 yksi-

köllä  $S_1$ -endonukleaasia (P-L Biochemicals) 350  $\mu$ l:ssa liuosta, jossa on 250 mM NaCl, 30 mM natriumasettaattia (pH 4,5) ja 1 mM  $ZnSO_4$ , 30°C:ssa 30 minuuttia. Reaktio pysäytetään lisäämällä EDTA:ta (pH 7,5) määrään 10 mM. DNA uutetaan fenolilla, väkevöidään etanolisaostuksella ja liuotetaan uudestaan 50  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,8), 0,05 mM EDTA.

2. Kemiallisesti syntetisoidun DNA-sidoksenmuodostajan liittäminen pBR322:een, joka on katkaistu EcoRI:llä ja  $S_1$ :llä

Seuraavien kaavojen mukaiset kaksi oligodeoksinukleotidia

5'-AATTCTATGTGT-3' ja

5'-GATCACACATAGAATT-3'

syntetisoidaan esimerkin 10 Ea mukaisesti.

Synteettiset oligodeoksinukleotidit fosforyloidaan 5'-päistään inkuboimalla 80 pmol kumpaakin oligodeoksinukleotidia 20  $\mu$ Ci:n kanssa  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP:tä (6700 Ci.mmol<sup>-1</sup>, Amersham) 80  $\mu$ l:ssa reaktioseosta, jossa on 0,1 mM rATP (Sigma), 50 mM Tris.HCl (pH 9,5), 10 mM  $MgCl_2$ , 5 mM DTT ja 20 yksikköä  $T_4$  polynukleotidikinaasia (P-L Biochemicals), 30 minuuttia 37°C:ssa. Reaktio pysäytetään jäädyttämällä seos -80°C:een.

Saatu radioaktiivisesti fosforyloitua sidoksenmuodostajaa, jonka kaava on



inkuboidaan sen jälkeen 6  $\mu$ g:n kanssa pBR322:ta, joka on katkaistu EcoRI:llä ja  $S_1$ :llä (ks. edellä) 200  $\mu$ l:n reaktiutilavuudessa, jossa on 0.5 mM rATP (Sigma), 0,1 mM DTT (Calbiochem), 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM  $MgCl_2$  ja  $4 \cdot 10^3$  yksikköä  $T_4$  DNA-ligaasia (Biolabs), 2 tuntia 15°C:ssa.

Liuos deproteinisoidaan uuttamalla fenolilla ja DNA väkevöidään etanolisaostuksella. DNA liuotetaan uudestaan

100  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,05 mM EDTA, ja sentrifugoidaan sakkaroosigradientin läpi (5-23%) liuoksessa, jossa on 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) ja 1 mM EDTA. Sentrifugointi suoritetaan nopeudella 60 000 1/min TST 60-roottorissa (Kontron AG) 15°C:ssa 2,5 tunnissa. 0,2 ml:n jakeet kerätään ISCO-gradientin-keräyslaitteessa nopeudella 1 ml/min. Jakeet, joissa on  $\lambda$ -<sup>32</sup>P7:llä merkitty plasmidi-DNA (jakeet 11-14 kaikkiaan 22 jakeesta) yhdistetään, DNA saostetaan etanolilla ja hajotetaan 12 yksiköllä BclI:ta (Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaan. Fenoliuuton ja etanolisaostuksen jälkeen hajotettu DNA käsitellään 10 yksiköllä PstI:tä (Biolabs) valmistajan ohjeiden mukaan. Fenolilla uutettu katkaisutuote sentrifugoidaan sen jälkeen sakkaroositiheysgradientin (5-23%) läpi 15 tunnin ajan nopeudella 35 000 1/min 15°C:ssa TST 41-roottorissa (Kontron AG). 0,3 ml:n jakeet kerätään (ks. edellä) ja jakeet, joissa on suuri  $\lambda$ -<sup>32</sup>P7-merkitty BclI-PstI-DNA-jakso (jakeet 27-31 kaikkiaan 42 jakeesta) yhdistetään ja väkevöidään etanolisaostuksella. DNA liuotetaan uudestaan 20  $\mu$ l:aan liuosta, jossa on Tris.HCl pH 7,8 ja 0,05 mM EDTA.

c) Vastaanottajaplasmidin liittäminen cDNA-liitännäisiin

2  $\mu$ l vastaanottajaplasmidin DNA-jaksoa (n. 100 ng) (ks. edellä) inkuboidaan 5  $\mu$ l:n kanssa kutakin cDNA-liitännäistä (n. 20 ng) reaktiutilavuudessa, jossa on 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM rATP, 0,1 mM DTT ja 400 yksikköä T<sub>4</sub> DNA-ligaasia 10  $\mu$ l:ssa 3 tuntia 15°C:ssa.

Sitten 5  $\mu$ l reaktioseoksia lisätään seokseen, jossa on 150  $\mu$ l kalsiumilla käsiteltyä E. coli HB101 200  $\mu$ l:n kokonaistilavuudessa, jossa on 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> ja 10 mM Tris.HCl (pH 7,5).

Seosta jäähdytetään jäällä 20 minuuttia, kuumennetaan 42°C:een 1 minuutiksi ja inkuboidaan 20°C:ssa 10 minuuttia.

Lisätään 1 ml tryptonialustaa (tryptonialusta sisältää 10 g Bacto-Tryptonia (Difco); 1 g hiivauutetta (Difco); 1 g glukoosia; 8g NaCl ja 294 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1 litrassa tislattua vettä) ja saatua seosta inkuboidaan 30 minuuttia  $37^\circ\text{C}$ :ssa ravistelemalla nopeudella 300 1/min. Seos levitetään 2 agarlevylle (McConkey-agar, Difco; 0,6 ml/levy), joihin on lisätty 10 g/ml tetrasykliiniä (Sigma). Levyjä inkuboidaan 12-17 tuntia  $37^\circ\text{C}$ :ssa. Transformointiseosta kohti saadaan noin 1000 pesäkettä. Kustakin transformointiseoksesta poimitaan 4 pesäkettä jatkotutkimuksia varten.

d) Yhdistelmäplasmidien restriktioanalyysi

Kiinnostavien yhdistelmäplasmidien tarkempaa tutkimista varten plasmidi-DNA eristetään 12 pesäkkeestä (4 kustakin kolmesta liitosseoksesta, ks. edellä).

Yhdistelmäplasmidi-DNA eristetään seuraavalla tavalla: 1 pesäkkeellä siirrostetaan 10 ml tryptonialustaa, johon on lisätty 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tetrasykliiniä kuten edellä, 25 ml:n Erlenmeyer-pullossa. Viljelmää ravistellaan 15-18 tuntia  $37^\circ\text{C}$ :ssa nopeudella 300 1/min. Solut sentrifugoidaan talteen (Sorvall, HS-4-roottori, 10 minuuttia, 4000 1/min,  $4^\circ\text{C}$ ). Näin saadaan noin 0,1 g soluja ja ne suspendoidaan uudestaan 1 ml:aan liuosta, jossa on 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). 0,25 ml lysotsyymiliuosta (10 mg/ml 50 mM Tris.HCl: ssa (pH 8,0), lysotsyymi hankittu Sigmalta) lisätään ja, kun on inkuboitu 10 minuuttia  $0^\circ\text{C}$ :ssa, lisätään 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5). Kun seosta on pidetty 10 minuuttia  $0^\circ\text{C}$ :ssa, lisätään 60  $\mu\text{l}$  2% Triton X-100 (Merck). Kun on pidetty 30 minuuttia  $0^\circ\text{C}$ :ssa, näytettä sentrifugoidaan 30 minuuttia nopeudella 15 000 rpm  $4^\circ\text{C}$ :ssa Sorvall SA-600-roottorissa. Emäliuos deproteinisoidaan 1 tilavuudella fenolia (kyllästetty TNE-liuokseen). Faasit erotetaan sentrifugoimalla (Sorvall HB-4-roottori) 10 minuuttia nopeudella 5000 1/min  $4^\circ\text{C}$ :ssa. Ylempi faasi uutetaan kahdesti 1 tilavuudella kloroformia. Haiman RNAaasia (Sigma; 10 mg/ml TNE:ssä, esikuumennettu 10 minuuttia  $85^\circ\text{C}$ :ssa) lisä-

tään lopulliseen väkevyyteen 25 µg/ml ja seosta inkuboidaan 40 minuuttia 37°C:ssa. Sitten seoksen väkevyyttä säädetään määrään 1 M NaCl ja 10 % polyetyleeniglykolia 6000 (Fluka, autoklavoitu 20 minuuttia 120°C:ssa) ja inkuboidaan 2 tuntia -10°C:ssa. Sakka kerätään Sorvall HB-4-roottorilla (20 minuuttia nopeudella 10 000 1/min, 0°C) ja liuotetaan uudestaan 100 µl:aan TNE-liuosta. DNA-liuos uutetaan 1 tilavuudella fenolia ja DNA saostetaan 2 tilavuudella etanolia -80°C:ssa 10 minuuttia. Sakka otetaan talteen Eppendorf-sentrifugilla ja DNA liuotetaan uudestaan 20 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) ja 0,5 mM EDTA. 10 ml:sta viljelmää saadaan 8-10 µg yhdistelmäplasmidi-DNA:ta.

Kaikki plasmidi-DNA-laadut analysoidaan seuraavilla kaksoiskatkaisuilta: 0,5 µg kutakin DNA:ta katkaistaan HindIII:lla (Biolabs) ja PvuII:lla (Biolabs), HindIII:lla ja PstI:llä (Biolabs), HindIII:lla ja BamH<sub>1</sub>:llä (Biolabs), EcoRI:llä (Biolabs) ja PstI:llä tavalliseen tapaan ja fraktioidaan 1,5 % agarosigeelissä koon mukaan liuoksessa, jossa on 40 mM Tris.asettaattia (pH 7,8), 1 mM EDTA ja 0,5 µg/ml EtBr.

Valitaan sellaiset yhdistelmäplasmidit, joilla on haluttu restriktioentsyymikartta. Tuloksesta on esitetty yhteenveto kuvissa 29 ja 30. Plasmidi-DNA-tyypeille, joissa on pBR322/HLycIFN-8<sub>1</sub>:stä tai pBR322/HLycIFN-5<sub>1</sub>:stä tai pBR322/HLycIFN1'b:stä johdettu liitännäinen nimetään vastaavasti CG-pBR322/HLycIFN(α-3)-252 ja CG-pBR322/HLycIFN(α-2)-261 ja CG-pBR322/HLycIFN(α-1)-258.

Jotta saataisiin varmistetuksi tarkemmin sen liitoskohdan rakenne, joka on synteettisen sidoksenmuodostajan ja IFN-cDNA-laatuksen koodausalueen alun välissä, nukleotidisekvenssi määritetään tältä alueelta. Tarkemmin sanottuna 2 µg eristettyä plasmidin CG-pBR322/HLycIFN(α-1)-258 DNA:ta katkaistaan EcoRI:llä, merkitään 5'-päistään ja katkaistaan PstI:llä. DNA-palaset fraktioidaan 6 % polyakryyliamidigeelillä ja EcoRI\*-PstI-DNA-jakso (9,4 bp)

uutetaan edelläkuvatulla tavalla. DNA-palaselke suori-  
tetaan sekvenssianalyysi Maxamin ja Gilbertin (15) mukaan.

Sidoksenmuodostajan ja IFN-cDNA-laatuja koodaavan  
alueen alun välisen liitoskohdan rakenne määritetään  
vastaavalla tavalla plasmideista CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -2)-  
261 ja CG-pBR-322/HLycIFN( $\alpha$ -3)-252.

Plasmideissa CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258, ( $\alpha$ -2)-261  
ja ( $\alpha$ -3)-252 edeltää interferonia koodittavaa sekvenssiä  
seuraava nukleotidijakso, jossa on EcoRI-katkaisukohta.

<u>EcoRI</u>	<u>Sau3A</u>
-NGAATTCTATGTGTGATC.....	
-NCTTAAGATACACACTAG.....	

—————>  
IFN geeni

Esimerkki 24: PHO5-signaalisekvenssin poisto ilmentämis-  
plasmidista p31 (ks. kuva 31)

Ilmentämisplasmidi p31 sisältää PHO5-promoottorisek-  
venssin mukaanlukien mRNA:n aloituskohdat, happofosfataa-  
sin luennan aloituskodonin ATG ja lisäksi 40 nukleoti-  
dia, jotka koodittavat osaa happofosfataasin signaali-  
sekvenssistä. Tässä rakentamistoimenpiteessä signaali-  
sekvenssin nukleotidit ja ATG eliminoidaan Bal31-hajo-  
tuksella. EcoRI-sidoksenmuodostajat liitetään, jotta  
voidaan yhdistää PHO5-promoottori haluttuihin kypsiin  
koodaussekvensseihin (esim. interferonigeeneihin).

a) BalI:llä katkaistun plasmidin p30 hajotus Bal31:llä

20  $\mu$ g p30-DNA:ta (ks. esimerkki 4b) katkaistaan rest-  
riktioendonukleasilla BalI, jolloin saadaan 2 palasta,  
joiden koot ovat 3,7 ja 5,1 kb. Kun on uutettu fenolil-

la ja kloroformilla, DNA saostetaan etanolilla. DNA suspendoidaan uudestaan 10 mM Tris:iin pH 8,0 väkevyyteen 0,5 µg/ml. 9 µg BalI:llä katkaistua p30-DNA:ta katkaistaan 2 yksiköllä eksonukleaasia Bal31 (BRL) 100 µl:ssa liuosta, jossa on 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM CaCl<sub>2</sub> ja 1 mM EDTA. 2 µg:n näytteet otetaan 15, 30, 45 ja 60 sekunnin kuluttua inkuboitessa 30°C:ssa ja kukin näyte sekoitetaan välittömästi seokseen, jossa on 50 µl fenolia ja 60 µl TNE. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, DNA saostetaan uudestaan 10 mM Tris:iin pH 8,9 väkevyyteen 100 µg/ml. Jotta saataisiin selville eksonukleolyyttisen Bal31-katkaisun aste, 0,5 µg kunakin ajankohtana otettua DNA:ta katkaistaan endonukleaasilla BamHI ja analysoidaan 1,5 % agarosigeelillä Tris-boraattipuskurissa pH 8,3. Keskimäärin 70 bp poistuu palasen kustakin päästä 45 sekunnin kuluttua Bal31-hajotuksessa. Jatkotutkimuksissa käytetään DNA:ta, joka on saatu 45 sekunnin kohdalla.

b) EcoRI-sidoksenmuodostajien liittäminen Bal31:llä käsiteltyyn DNA:han

Kaksi A<sub>260</sub>-yksikköä EcoRI-sidoksenmuodostajia (5'-GGAATTCC-3', BRL) suspendoidaan uudestaan 250 µl:aan liuosta, jossa on 10 mM Tris pH 8 ja 1 mM EDTA. 2 µg EcoRI-sidoksenmuodostajia kinasoidaan 75 µl:ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM DTT, 10 µM ATP ja 33 U T4 polynukleotidikinaasia (Boehringer). Kun seosta on pidetty 1 tunti 37°C:ssa, sen annetaan jäähtyä huoneenlämpötilaan ja sen jälkeen sitä säilytetään -20°C:ssa.

Yhdistetyt, kaksisäikeiset EcoRI-sidoksenmuodostajat liitetään tylpistä päistään Bal31:llä käsiteltyihin DNA-palasiin. Puoli mikrogrammaa Bal31:llä käsiteltyä DNA:ta (ks. esimerkki 24a) inkuboidaan 16 tuntia huoneenlämpötilassa 50-kertaisen ylimäärän kanssa kinasoitaja EcoRI-sidoksenmuodostajia 20 µl:ssa liuosta, jossa on

60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 4 mM ATP ja 600 U T4 DNA-ligaasia (Biolabs). Kun T4 DNA-ligaasi on inaktivoitu (10 min 65°C:ssa) EcoRI-sidoksenmuodostajien ylimäärä katkaistaan 50 yksiköllä EcoRI (Boehringer) 50 µl:n tilavuudessa. DNA uutetaan fenolilla ja kloroformilla, saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris ja 1 mM EDTA.

Restriktioendonukleaasi EcoRI katkaisee päihin lisätyt EcoRI-sidoksenmuodostajat molemmissa Bali-palasisissa (3,7 kb ja 5,1 kb) ja myös 5,1 kb:n palasen sisäisessä EcoRI-kohdassa, jolloin syntyy 3,9 kb:n ja 1,2 kb:n palanen. 3,7 kb:n ja 3,9 kb:n palanen erotetaan 1,2 kb:n palasesta 0,8% matalalla sulavassa agarosigeelissä (Sigma) liuoksessa, jossa on 90 mM Tris.HCl pH 8,3, 90 mM boorihappoa ja 2,5 mM EDTA. DNA-kaistat värjätään etidiumbromidilla ja tehdään näkyviksi pitkäaaltoisella UV-valolla aallonpituudella 366 nm. Kahta suurta 3,7 kb:n ja 3,9 kb:n DNA-palasta ei eroteta toisistaan. Ne leikataan irti geelistä yhtenä geelipalana ja uutetaan esimerkissä 4a kuvatulla tavalla.

Lineaariset palaset, jotka päättyvät EcoRI-päihin, muodostetaan renkaiksi yhteenliittämällä. Noin 0,25 µg palasia liitetään yhteen 100 µl:ssa reaktioliuosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP ja 600 yksikköä T4 DNA-ligaasia 4 tuntia 15°C:ssa.

10 µl:n erät liitosseosta lisätään 100 µl:aan kalسيومilla käsiteltyjä transformaatiokelpoisia E. coli HB101-soluja (ks. esimerkki 4a). 35 transformoitunutta amp<sup>R</sup>-pesäkettä kasvatetaan yksittäisesti LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan menetelmällä Holmes et al. (50) ja analysoidaan EcoRI/BamHI-kaksoiskatkaisulla.

c) Nukleotidisekvenssianalyysi EcoRI-sidoksenmuodostajan liittymäkohdan paikan määrittämiseksi

Useimmat 35 kloonina eroavat toisistaan sen kohdan



suhteen, jossa EcoRI-sidoksenmuodostaja on liittynyt PHO5-promoottorialueeseen, riippuen siitä määrästä, jossa Bal31 on hajottanut yksittäisiä DNA-molekyylejä. Nukleotidisekvenssianalyysiä varten plasmidi-DNA katkaistaan EcoRI:llä. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, katkaistu DNA saostetaan etanolilla. DNA defosforyloidaan ja 5'-päättimerkitään radioaktiivisesti esimerkissä 10Ed kuvatulla tavalla. Merkityt DNA-palaset katkaistaan toisella restriktioendonukleaasilla, BamHI. Tuotteet erotetaan 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. 0,5-0,6 kb:n pituinen 5'-merkitty EcoRI-BamHI-palaneen ersitetään matalalla sulavasta agarosista esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. EcoRI-sidoksenmuodostajan vieressä olevan nukleotidisekvenssin määrittämiseksi eri DNA-palaset hajotetaan kemiallisesti ja tuotteet erotetaan polyakryyliamidigeelielektroforeesilla Maxamin ja Gilbertin (15) kuvaamalla tavalla.

Taulukossa 4 (ks. myös kuva 32) on lueteltu eri kloonit ja vastaavasti PHO5-sekvenssin viimeisen nukleotidin (jota seuraa EcoRI-sidoksenmuodostaja) sijainti.

Taulukko 4

klooni	PHO5-sekvenssin viimeisen nukleotidin sijainti
pE	+25
pG	+16
p <sup>e</sup>	+15
p <sup>d</sup>	+12
p <sup>Y</sup>	-4
p <sup>R</sup>	-10
p <sup>P</sup>	-16
p <sup>V</sup>	-18
p <sup>L</sup>	-21
p <sup>N</sup>	-22

p <sup>C</sup>	-24
p <sup>H</sup>	-27
p <sup>S</sup>	-28
p <sup>k</sup>	-29
p <sup>l</sup>	-38
p <sup>M</sup>	-50
p <sup>O</sup>	-53
p <sup>F</sup>	-59
p <sup>m</sup>	-67
p <sup>K</sup>	-73
p <sup>i</sup>	-81
p <sup>h</sup>	-137

d) 0,53 kb:n BamHI-EcoRI-palasen eristäminen, jossa on PHO5/R-promoottori

Plasmidi pR sisältää PHO5/R-promoottorin 534 bp:n BamHI-EcoRI-palassessa. Kuvan 3a numeroinnin mukaan palanen kattaa PHO5-promoottorisekvenssit nukleotidista -541 (BamHI-kohta) nukleotidiin -10. EcoRI-sidoksenmuodostaja, joka on liitetty nukleotidiin -10 (ks. esimerkki 24b), antaa kaksi G-tähdettä EcoRI-katkaisun jälkeen.

Plasmidi pR katkaistaan restriktioendonukleaaseilla BamHI ja EcoRI. 0,53 kb:n BamHI-EcoRI-palanen erotetaan 0,8% matalalla sulavassa agarosigeelissä esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. Nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 33.

Vastaavalla tavalla katkaistaan plasmidi pY ja 0,53 kb:n BamHI-EcoRI-palanen eristetään, jossa on PHO5/Y-promoottori. Nukleotidisekvenssi on esitetty kuvassa 34.

e) SalI-EcoRI-palasen korvaaminen uusien rakenteiden SalI-EcoRI-palassella plasmidissa p31

5 µg plasmidia p31 (ks. esimerkki 13d) katkaistaan restriktioendonukleaasilla SalI. Katkaistu DNA saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudestaan 50 µl:aan liuosta, jossa on 100 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl ja 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

DNA hajotetaan EcoRI:llä täydellisesti. Katkaisutuotteet erotetaan toisistaan 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä Tris-boraatti-EDTA-puskurissa pH 8,3. 3,5 kb:n DNA-palanen eristetään pienenä geelipalaseksi, jossa on DNA-kaista.

5 µg kutakin kloonin pR ja pY (ks. taulukko 4 ja kuva 32) katkaistaan Sali:llä ja EcoRI:llä, kuten edellä on kuvattu. 0,8 kb:n palaset eristetään pieninä palasina matalalla sulavasta agarosigeelistä.

0,67 µg vektorin p31 Sali-EcoRI-palasta (3,5 kb) liitetään 0,34 µg:aan plasmidin pR tai pY 0,8 kb:n Sali-EcoRI-palasta vastaavasti. Vastaavat geelipalat, joissa on DNA-jaksot, sekoitetaan keskenään ja sulatetaan 65°C:ssa. Nesteytetty geeli laimennetaan kolminkertaisesti. Liittäminen suoritetaan 240 µl:n kokonaistilavuudessa, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP ja 750 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs), yön yli 15°C:ssa. 2 µl:n erä kutakin liitosseosta lisätään 100 µl:aan kaliumilla käsiteltyjä, transformointikelpoisia E. coli HB101-soluja (ks. esimerkki 4a).

8 transformoitunutta, amp<sup>R</sup>-pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliinia. Plasmidi-DNA analysoidaan katkaisuanalyysillä. Kunkin ryhmän kloonit ovat identtisiä. Kustakin otetaan yksi kloonin jatkokäyttöön, ja niille annetaan vastaavasti nimet p31/R ja p31/Y (kuva 31).

Esimerkki 25: Lymfoblastoidi-interferoni-α-3-DNA:n liittäminen plasmidiin p31/R tai p31/Y (ks. kuva 35)

Tässä rakentamisessa liitetään PH05-promoottorialueeseen, joka koodittaa kypsää interferoni-α-3:a. Ei PH05:n eikä interferonin signaalisekvenssejä ole läsnä, mutta liitoskohdassa on liitettyä EcoRI-sidoksenmuodostajaa.

Plasmidi p31/R (ks. esimerkki 24e) sisältää PH05-promoottorisekvenssin, joka päättyy 9 nukleotidia ennen hap-pofosfataasigeenin ATG-kodonia EcoRI-sidoksenmuodosta-

jaan 5'-GGAATTCC-3'. Plasmidin CG-pBR322/HlycIFN( $\alpha$ -3)-252 lyfoblastoidi-interferoni- $\alpha$ -3-geeni (ks. esimerkki 23) on erityisesti sovitettu liitettäväksi PHO5-promoottorissa olevaan EcoRI-sidoksenmuodostajaan. Kypsää interferoni- $\alpha$ -3:a koodittavan sekvenssin 5'-päässä olevat lisänukleotidit antavat EcoRI-katkaisukohtaan ja ATG-kodonin, jotka tarvitaan interferonigeenin luennassa (ks. kuva 29). Oleellisesti ottaen sama rakentaminen tehdään myös plasmidilla p31/Y (ks. esimerkki 24e).

a) EcoRI:llä katkaistun, defosforyloidun plasmidin p31/R rakentaminen

5  $\mu$ g plasmidia p31/R katkaistaan restriktioendonukleaasilla EcoRI (Boehringer) täydellisesti. Kun on uutettu fenolilla ja kloroformilla, DNA saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudestaan 100  $\mu$ l:aan 50 mM Tris-liuosta pH 8,0. DNA lasketaan Chelex 100-pylvään (BioRAD) läpi, defosforyloidaan naudan sisäelinten emäsfosfataasilla (Boehringer) ja defosforyloitu DNA puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografisesti esimerkissä 14b kuvatulla tavalla. DNA suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris.HCl pH 7,5 ja 1 mM EDTA, väkevyyteen 0,2 mg/ml.

b) Plasmidin CG-pBR322/HlycIFN( $\alpha$ -3)-252 EcoRI-palasen (0,6 kb) eristäminen, jossa on IFN- $\alpha$ -3:a koodittava sekvenssi

10  $\mu$ g plasmidia CG-pBR322/HlycIFN( $\alpha$ -3)-252 katkaistaan restriktioendonukleaasilla EcoRI. Näin saadaan kaksi palasta, joiden koot ovat 3,8 kb ja 0,6 kb. 0,6 kb:n palanen sisältää interferoni- $\alpha$ -3:a koodittavan alueen. Palanen eristetään 0,6 % matalalla sulavassa agarosi-geelissä Tris-boraatti-EDTA-puskurissa. Geelipala, jossa on 0,6 kb:n DNA-jakso, leikataan irti geelistä ja käytetään liittämässä.

c) Linearisoidun, defosforyloidun p31/R-DNA-palasen ja IFN- $\alpha$ -3-DNA:n EcoRI-palasen (0,6 kb) liittäminen yhteen

1,5  $\mu\text{g}$  defosforyloitua p31/R-vektori-DNA:ta, joka on katkaistu EcoRI:llä, liitetään 0,19  $\mu\text{g}$ :aan IFN- $\alpha$ -3:n 0,6 kb:n EcoRI-palasta. Viimeksimainittu palanen on pienessä, matalallasulavassa agarosigeelileikkeessä, joka sulatetaan 65 $^{\circ}\text{C}$ :ssa. Nesteytetty geeli laimennetaan kaksinkertaisesti. Liittäminen suoritetaan kokonaisuudessaan 220  $\mu\text{l}$ ; jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM ATP ja 8000 yksikköä T4 DNA-ligaasia (Biolabs), yön yli 15 $^{\circ}\text{C}$ :ssa. 10  $\mu\text{l}$ :n erä liitosseosta lisätään 100  $\mu\text{l}$ :aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikelpoisia *E. coli* HB101-soluja (ks. esimerkki 4a).

6 transformoitunutta, amp<sup>R</sup>-pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-alustassa, jossa on 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicilliiniä. Plasmidi-DNA valmistetaan Holmes et al:n menetelmällä (50) ja analysoidaan BglII/BstEII-kaksoiskatkaisulla liitännäisen suunnan ja koon määrittämiseksi. Yhdelle näistä klooneista annetaan nimi p31R/IF( $\alpha$ -3).

Sama rakentaminen tehdään p31/Y:llä (ks. esimerkki 24e). 6 transformoituneen, amp<sup>R</sup>-pesäkkeen plasmidit analysoidaan. 2 kloonissa on liitännäinen oikeassa suunnassa. Yhdelle niistä annetaan nimi p31Y/IF( $\alpha$ -3).

Esimerkki 26: Lymfoblastoidi-interferoni- $\alpha$ -2-DNA:n liittäminen plasmidiin p31/R (ks. kuva 36)

Tässä rakentamisessa yhdistetään PH05-promoottori kypsää interferoni- $\alpha$ -2:ta koodittavaan alueeseen.

a) Vektorin p31/R 3,9 kb:n HindIII-EcoRI-palasen eristäminen

10  $\mu\text{g}$  vektoria p31/R katkaistaan täysin HindIII:lla. Puskurointi säädetään 0,1 tilavuudella 1 M Tris pH 7,5. Sitten HindIII:lla katkaistu p31/R-DNA hajotetaan EcoRI:llä. 3,9 kb:n HindIII-EcoRI-palanen eristetään 0,8 % matalalla sulavasta agarosigeelistä leikkaamalla geelipala irti geelistä.

b) Plasmidin JDB207/IF2(5<sub>1</sub>) XbaI-HindIII-palasen (0,9 kb) eristäminen

5 µg plasmidia pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) (ks. esimerkki 17) katkaistaan täysin HindIII:lla. Puskurointi säädetään 0,1 tilavuudella 1M Tris pH 7,9. Sitten HindIII:lla katkaistu plasmidi katkaistaan XbaI:llä. 0,9 kb:n XbaI-HindIII-palanen sisältää osan interferoni-α-2:ta koodittavasta sekvenssistä ja alapuolella olevan PHO5:n transkription päätössignaali. 0,9 kb:n palanen erotetaan 0,8 % matalalla sulavassa agarosigeelissä ja leikataan irti geelistä.

c) 252 bp:n EcoRI-XbaI-palasen erottaminen plasmidista CG-pBR322/HlycIFN(α-2)-261, jossa palasessa on IFN-α-2:ta koodittava sekvenssi

10 µg plasmidia CG-pBR322/HlycIFN(α-2)-261 (ks. esimerkki 23) katkaistaan XbaI:llä 100 µl:ssa reaktioseosta, jossa on 6 mM Tris pH 7,9, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> ja 6 mM merkaptoetanolia. Kun on suoritettu katkaisu kokonaan XbaI:llä, linearisoitu plasmidi-DNA hajotetaan osittain 3 yksiköllä EcoRI:tä (Boehringer). 20 minuutin kuluttua 37°C:ssa hajotus pysäytetään jäädyttämällä seos -70°C:een. DNA-palaset analysoidaan 1,5 % agarosigeelillä Tris-Boraatti-EDTA-puskurissa pH 8,3. EcoRI-XbaI-palanen sisältää kypsää interferoni-α-2:ta koodittavan sekvenssin 5'-osan (XbaI-kohtaan asti) sekä erityisen sidoksenmuodostajan PHO5-promoottorin liittämistä varten. 252 bp:n palanen eristetään pienestä geelileikkeestä 0,8% matalalla sulavasta agarosigeelistä.

d) DNA-palasten liittäminen

Esimerkeissä 26 a-c kuvatut kolme DNA-palasta, joissa on tarvittavat lomittaiset päät, liitetään yhteen yhdessä reaktiossa:

0,67 µg 3,9 kb:n HindIII-EcoRI-palasta, joka on saatu vektorista p31/β, 0,16 µg 0,9 kb:n XbaI-HindIII-palasta, joka on saatu plasmidista pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) ja noin 70 ng 250 bp:n EcoRI-XbaI-palasta, joka on saatu plasmidista CG-pBR322/HlycIFN(α-2)-261, liitetään yhteen. Kaikki

kolme DNA-palasta ovat pienissä matalalla sulavan agarosin palasissa. Kyseiset kolme agarosigeelipalasta yhdistetään, sulatetaan 65°C:ssa ja laimennetaan kolminkertaisesti. Liittäminen suoritetaan 450 µl:n kokonaisuudessa, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP ja 1200 yksikköä T4 DNA-ligaasia, 15°C:ssa 16 tunnin kuluessa. 10 µl:n erä liitosseosta lisätään 100 µl:aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikyksiä *E. coli* HB101-soluja (ks. esimerkki 4a).

12 transformoitunutta, amp<sup>R</sup>-pesäkettä kasvatetaan erikseen LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA erotetaan Holmes et al. menetelmällä (50) ja analysoidaan BamHI/HindIII-kaksoiskatkaisulla. Kaikilla klooneilla on identtinen katkeamiskartta. Yhdelle annetaan nimi p31R/(α-2).

Plasmidin pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) XbaI-HindIII-palasen (0,9 kb) tilalla voidaan liittämiseen käyttää plasmidista pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ72 tai plasmidista pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ82 saatua 0,5 kb:n XbaI-HindIII-palasta (ks. esimerkki 22). Vektorin p31/R HindIII-EcoRI-palasen (3,9 kb) sijasta liittäminen suoritetaan myös vektorin p31/Y HindIII-EcoRI-palaseen (3,9 kb).

DNA-palasten liittäminen ja *E. coli* HB101:n transformointi suoritetaan edelläkuvatulla tavalla.

Kustakin liittämisseoksesta kasvatetaan 12 transformoitunutta, amp<sup>R</sup>-pesäkettä yksittäisesti LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampicilliiniä. Plasmidi-DNA analysoidaan BamHI/HindIII-kaksoiskatkaisulla. Saaduille klooneille annetaan nimet p31R/IF(α-2)Δ72, p31R/IF(α-2)Δ82, p31Y/IF(α-2), p31Y(α-2)Δ72 ja p31Y/IF(α-2)Δ82.

Esimerkki 27: Lymfoblastoidi-interferoni-α-1:n liittämisen plasmidiin p31/R (ks. kuva 37)

a) Vektorin p31/R HindIII-EcoRI-palasen (3,9 kb) erottaminen

10 µg vektoria p31/R hajotetaan HindIII:lla ja EcoRI:llä esimerkissä 26a kuvatulla tavalla. Saadut 0,4 kb:n ja 3,9 kb:n palaset erotetaan preparatiivisella 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. 3,9 kb:n HindIII-EcoRI-palanen eluoidaan geelistä esimerkissä 4a kuvatulla tavalla. DNA puhdistetaan DE52-ioninvaihtokromatografisesti (Whatman) (ks. esimerkki 5a), saostetaan etanolilla ja suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris pH 8,0 ja 1 mM EDTA, väkevyyteen 0,1 mg/ml.

b) Plasmidin pJDB207/IF2(1'b) PvuII-HindIII-palasen (0,9 kb) erottaminen

5 µg plasmidia pJDB207/IF2(1'b) (ks. esimerkki 17) katkaistaan PvuII:lla ja HindIII:lla. Saadut 0,9 kb:n ja 7,3 kb:n palaset erotetaan preparatiivisella 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. 0,9 kb:n palanen eluoidaan geelistä ja puhdistetaan esimerkissä 27a kuvatulla tavalla. DNA suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris pH 8,0 ja 1 mM EDTA, väkevyyteen 0,05 mg/ml.

c) Plasmidin CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258 EcoRI-PvuII (286 bp) palasen eristäminen, jossa on IFN- $\alpha$ -1:tä koodittava sekvenssi

10 µg plasmidia CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258 (ks. esimerkki 23) katkaistaan PvuII:lla ja EcoRI:llä. 286 bp:n katkaisutuote erotetaan 4,2 kb:n palasesta preparatiivisella 0,8% matalalla sulavalla agarosigeelillä. 286 bp:n EcoRI-PvuII-palanen eluoidaan geelistä ja puhdistetaan esimerkissä 27a kuvatulla tavalla. DNA suspendoidaan uudestaan liuokseen, jossa on 10 mM Tris pH 8,0 ja 1 mM EDTA, väkevyyteen 0,03 mg/ml.

d) DNA-palasten liittäminen

0,5 µg 3,9 kb:n HindIII-EcoRI-palasta, joka on saatu vektorista p31/R, 0,25 µg 0,9 kb:n PvuII-HindIII-palasta, joka on saatu plasmidista pJDB207/IF2(1'b), ja



0,1  $\mu\text{g}$  286 bp:n EcoRI-PvuII-palasta, joka on saatu plasmidista CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258, liitetään yhteen 15  $^{\circ}\text{C}$ :ssa 20  $\mu\text{l}$ :ssa liuosta, jossa on 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 4 mM ATP ja 600 yksikköä DNA-ligaasia. 3  $\mu\text{l}$ :n erä liitosseoksesta lisätään 100  $\mu\text{l}$ :aan kalsiumilla käsiteltyjä, transformointikelpoisia *E. coli* HB101-soluja (ks. esimerkki 4a).

12 transformoitunutta,  $\text{amp}^{\text{R}}$ -pesäkettä kasvatetaan yksittäisesti LB-alustassa, jossa on 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampisilliiniä. Plasmidi-DNA analysoidaan BamHI/HindIII-kaksoiskatkaisulla. Yksi kloni, joka antaa 1,4 kb:n BamHI-palasan ja 390 bp:n BamHI-HindIII-palasan, tutkitaan tarkemmin ja sille annetaan nimi p31R/IF( $\alpha$ -1).

Vektorin p31/R HindIII-EcoRI-palanen (3,9 kb) voidaan korvata vektorin p31/Y HindIII-EcoRI-palaselalla. Myös liittämisesssä voidaan käyttää plasmidista pJDB207/IF2(1'b) saadun 0,9 kb:n PvuII-HindIII-palasan tilalla plasmidista pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$  saatua 0,45 kb:n PvuII-HindIII-palasta. Saadut kloonit analysoidaan edelläkuvatulla tavalla. Kloonille annetaan nimet p31R/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ , p31Y/IF( $\alpha$ -1) ja p31Y/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ .

Esimerkki 28: Geenirakenteiden alakloonaus suuren kopiomäärän tuottavaan hiivavektoriin pJDB207 (ks. kuva 38)

Esimerkeissä 25-27 kuvatuissa rakenteissa on PHO5-promoottori, eri interferoneja koodittava alue ja PHO5:n transkription päätössignaali peräkkäisessä järjestyksessä kaikki plasmidista pBR322 johdettuun vektoriin liitettyinä. Sali-HindIII-palaset, jotka sisältävät koko ryhmitelmän liitetään 6,2 kb:n Sali-HindIII-palaseen, joka on saatu pJDB207:stä, esimerkissä 27 kuvatulla tavalla.

2  $\mu\text{g}$  plasmidia p31R/IF( $\alpha$ -3) katkaistaan restriktioendonukleaseilla Sali ja HindIII. Katkaisutuotteet erotetaan toisistaan preparatiivisella 0,8% matalalla sulaval-

la agarosigeelillä. Geelistä leikataan irti pieni palanen (koko 1,8 kb).

Plasmidi pJDB207 katkaistaan restriktioendonukleaa-  
seilla Sali ja HindIII ja suuri 6,2 kb:n palanen ero-  
tetaan esimerkissä 17 kuvatulla tavalla.

DNA-palasten liittäminen ja transformointikypsien  
E. coli HB101-solujen transformointi suoritetaan esimer-  
kissä 17 kuvatulla tavalla. 8 amp<sup>R</sup>-pesäkettä kasvate-  
taan yksittäisesti LB-alustassa, jossa on 100 µg/ml ampi-  
silliiniä. Plasmidi-DNA analysoidaan liitännäisen liitän-  
näisen koon mukaan katkaisemalla restriktioendonukleaa-  
seilla HindIII ja Sali. Yksi kloni, jossa on oikea lii-  
tännäinen, valitaan ja sille annetaan nimi pJDB207R/IF  
(α-3).

Vastaavalla tavalla lähtemällä plasmideista p31Y/IF  
(α-3), p31R/IF(α-2), p31R/IF(α-2)Δ72, p31R/IF(α-2)Δ82,  
p31Y/IF(α-2), p31Y/IF(α-2)Δ72, p31Y/IF(α-2)Δ82,  
p31R/IF(α-1), p31R/IF(α-1)Δ, p31Y/IF(α-1) ja p31/IF(α-1)Δ  
saadaan seuraavat kloonit, joissa on oikeat liitännäi-  
set:

pJDB207Y/IF(α-3),  
pJDB207R/IF(α-2),  
pJDB207R/IF(α-2)Δ72,  
pJDB207R/IF(α-2)Δ82,  
pJDB207Y/IF(α-2),  
pJDB207Y/IF(α-2)Δ72,  
pJDB207Y/IF(α-2)Δ82,  
pJDB207R/IF(α-1),  
pJDB207R/IF(α-1)Δ,  
pJDB207Y/IF(α-1), ja  
pJDB207Y/IF(α-1)Δ.

Esimerkki 29: *Saccharomyces cerevisiae* AH220:n transformointi ja interferonituotannon aikaansaaminen

Plasmidit pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 72, pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 82, pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$ , pJDB207R/IF( $\alpha$ -3), pJDB207Y/IF( $\alpha$ -3), pJDB207R/IF( $\alpha$ -2), pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72, pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82, pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2), pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72, pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82, pJDB207R/IF( $\alpha$ -1), pJDB207R/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ , pJDB207(/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$  ja pJDB207(/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$  (ks. esimerkit 22 ja 28)

vastaavasti) siirretään kukin *Saccharomyces cerevisiae* AH220-kantaan (a, trp1, leu2-3, leu2-112, his3, pho5, pho3) käyttämällä Hinnen et al. kuvaamaa transformointimenetelmää (1). Transformoituneet hiivasolut valitaan hiivan minimaalista kasvualustaa sisältäviltä levyiltä, joissa ei ole leusiinia. Yksittäiset transformoituneet pesäkkeet poimitaan ja niitä kasvatetaan esimerkissä 7 kuvatulla tavalla. Eri hiivapesäkkeille annetaan nimet

*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$ ,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -3),  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -3),  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2),  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2),  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -1),  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ ,  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1), ja  
*Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ .

Esimerkki 30: *Saccharomyces cerevisiae* GRF18-kannan transformointi ja interferonituotannon aikaansaaminen

*Saccharomyces cerevisiae* GRF18-kanta ( $\alpha$ , his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can<sup>R</sup>) transformoidaan esimerkissä 29 luetelluilla plasmideilla esimerkissä 29 kuvatulla tavalla. Eri hiivapesäkkeille annetaan nimet

*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$ ,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -3),  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -3),  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2),  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2),  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pKDB207R/IF( $\alpha$ -1),  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ ,  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1) ja  
*Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$ .

Esimerkki 31: Hiivasolu-uutteiden valmistus ja interferonitiitterin määrittäminen

50 ml:sta kasvualustaa, jossa solutiheys on  $1-2 \times 10^7$ /ml, kootaan solut sentrifugoimalla 10 minuuttia nopeudella 3000 1/min. Solut suspendoidaan uudestaan 2 ml:aan 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 ja sentrifugoidaan huoneenlämpötilassa 5 minuuttia nopeudella 3000 1/min. Sedimentoituneet solut suspendoidaan uudestaan 1,2 ml:aan jääkylmää lysointi-seosta [ $\bar{0}$ ,1M kaliumfosfaattipuskuri pH 7,4, 1% (tilavuusosina) Triton X-100, 1 mM PMSF (Merck)] ja siirretään

30 ml:n Corex-putkeen. 1,6 g lasikuulia lisätään (hal-  
kaisija 0,4 mm) soluihin ja saatua suspensiota ravistel-  
laan Vortex Mixerissä (Scientific Instruments Inc., USA)  
täydellä nopeudella 30 sekuntia ja sen jälkeen jäähyte-  
tään 1 minuutti jäähauteella. Tämä ravistelutoimenpide  
toistetaan 5-10 kertaa, kunnes yli 90% soluista on rik-  
koutunut (tarkistetaan valomikroskoopilla).

Rikkoutuneet solujätteet ja lasikuulat poistetaan  
liuoksesta sentrifugoimalla 10 minuuttia nopeudella  
8000 1/min 4°C:ssa Sorvall HB-4-roottorilla. Emälius  
siirretään Eppendorf-putkiin, jäädytetään nestemäisessä  
tyydessä ja säilytetään -60°C:ssa. Interferoniaktiivisuus  
määritetään Armstrongin menetelmällä (32) käyttämällä  
ihmisen CCL-23-soluja ja rakkulastomatiittivirusta (VSV)  
ärsytysviruksena. Saaduista tuloksista on esitetty yh-  
teenveto taulukossa 5.

*S. cerevisiae*-kantojen AH220 ja GRF18 interferoni-  
aktiivisuus on yleensä identtinen sen jälkeen, kun ne  
ovat transformoituneet yhdistelmäplasmidilla. Taulu-  
kossa 6 on esitetty molempien kantojen interferoniaktii-  
visuuden vertailu, kun ne on transformoitu esimerkkeinä  
luetelluilla plasmideilla.

Taulukko 5

*S. cerevisiae*-kannan AH220 interferoniaktiivisuus, kun se on transformoitunut seuraavilla yhdistelmäplasmideilla:

Plasmidit	Esi- merkki	Interferoniaktiivisuus ilmaistuna	
		yksikköinä/ml hiivasolu- uutetta	yksikköinä/l hiiva- soluviljelmää
pJDB207/IF(8' <sub>1</sub> )	17	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -3)	28	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -3)	28	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$
pJDB207/IF1(5' <sub>1</sub> )	17	$7 \cdot 10^5$	$1.4 \cdot 10^7$
pJDB207/IF2(5' <sub>1</sub> )	17	$5 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^7$
pJDB207/IF3(5' <sub>1</sub> )	17	$3 \cdot 10^3$	$6.3 \cdot 10^4$
pJDB207/IF2(5' <sub>1</sub> ) $\Delta$ 72	22	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$
pJDB207/IF2(5' <sub>1</sub> ) $\Delta$ 82	22	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -2)	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2)	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 72	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207/IF2(1'b)	17	$4 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^4$
pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$	22	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -1)	28	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$	28	$4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^5$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1)	28	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
pJDB207Y/IF( $\alpha$ -1) $\Delta$	28	$4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^5$

Taulukko 6: *S. cerevisiae*-kantojen AH220 ja GRF18 interferoniaktiivisuus, kun ne ovat transformoituneet seuraavilla yhdistelmäplasmideilla:

Plasmidit	Interferoniaktiivisuus (yksikköä/l hiiva-soluviljelmää)	
	AH220	GRF18
pJDB207/IF(8 <sub>1</sub> )	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -3)	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$
pJDB207/IF2(5 <sub>1</sub> )	$1 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^6$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -2)	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$
pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$

Esimerkki 32: Interferoni- $\alpha$ -2:n tuottaminen hiivan *Saccharomyces cerevisiae* yhdistelmäkannalla 300 l:n mitataavassa

*Saccharomyces cerevisiae*-kanta GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) $\Delta$ 82 kantaa plasmidia, jossa on leusiinimerkki, joka mahdollistaa plasmidin selektiivisen ylläpidon isäntäorganismissa, ihmisen interferoni- $\alpha$ -2:n rakennegeeni ja happofosfataasin PHO5-promoottori, joka mahdollistaa IFN- $\alpha$ -2-geenin ilmentymisen kasvualustoissa, joissa on rajoitettava määrä epäorganista fosfaattia.

Kantaa ylläpidetään agarvinopintaviljelmissä, joissa on määriteltä kasvualustaa ilman leusiinia, jotta voidaan varmistaa plasmidin pysyvyys. Juurisiirrostettuja vinopintoja inkuboidaan 24 tuntia 30°C:ssa. Yhden vinopinnan pintakasvusto suspendoidaan uudestaan 3 ml:aan esikasvatusalustaa, joka sitten siirretään ensimmäiseen ravistelupullossa tapahtuvaan esikasvatukseen. 500 ml:n

pullossa on yksi ohjauslevy ja se sisältää 100 ml esikasvatusalustaa, jonka koostumus on seuraava (määrät g/l): hiivauutetta (Difco) 10,0; L-asparagiinia 6,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0; L-histidiiniä 0,02 ja D-glukoosia (monohydraatti) 33,0. Kasvualusta on valmistettu käyttämällä deionoitua vettä ja sen pH on noin 6,0. Glukoosi steriloidaan erikseen. Ensimmäistä esiviljelmää inkuboidaan 24 tuntia  $30^\circ\text{C}$ :ssa orbitaalisekoittimessa, jossa on 5 cm:n heilahdus ja nopeus 250 kierrosta minuutissa.

Ensimmäisestä esikasvatuspullosta saadaan siirrostetut toisiin esikasvatuspulloihin. Pulloihin laitetaan siirrostetta 1% tilavuusosina. Kasvualusta ja inkubointiolosuhteet ovat samat kuin ensimmäisessä esikasvatuksessa. 36 tällaisesta pullosta saadut kasvuliemet yhdistetään niin, että saadaan 1% (tilavuusosina) siirrostetta päätuotantofermentorin.

Tuotantofermentorin kokonaistilavuus on noin 500 l ja se sisältää 4 ohjauslevyä ja yksisiipisen levyturbiinisekoittimen, jonka halkaisija on 230 mm. Sekoitusnopeus on 450 kierrosta minuutissa ja ylipaine 0,3 bar ja ilmastusnopeus 1 tilavuus/tilavuus/minuutti. Fermentorin sisältää 300 l kasvualustaa, jolla on seuraava koostumus (määrät g/l): L-asparagiini 2,0; L-histidiini 0,02;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,03;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5; NaCl 0,1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1; KCl 1,0; D-glukoosi (monohydraatti) 20,0; vitamiiniliuos 5 ml/l ja hivenaineliuos 5 ml/l. Kasvualunstan pH säädetään arvoon 7,2 lisäämällä natriumhydroksidia ennen sterilointia. Glukoosi, vitamiinit ja hivenaineet steriloidaan erikseen ja lisätään kasvualustaan. Vitamiinien ja hivenaineiden varastoliuoksilla on seuraavat koostumukset: vitamiinit - biotiini 0,0002; kalsium-D-pantotenaatti 0,04; foolihappo 0,0002; nikotiinihappo 0,04; p-aminobentsoehappo 0,02; pyridoksiinihydrokloridi 0,04; riboflaviini 0,02; tiamiinihydrokloridi 0,04; ja inositoli 0,2; 1 l:ssa deionoitua vettä; hivenaineet - boorihappo 0,05;  $\text{CuSO}_4$ .



$5\text{H}_2\text{O}$  0,004; KI 0,01;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,04;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,02 ja  $\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,04; 1 l:ssa deionoitua vettä. Fermentointilämpötila on  $30^\circ\text{C}$ . pH laskee alueelle noin 4,0 - 4,2, mutta sitä voidaan haluttaessa pitää välillä olevassa arvossa natriumhydroksidia lisäämällä. Maksimaalinen interferonimäärä saavutetaan, kun on fermentoitu 18 tuntia. Optinen tiheys, joka saavuttaa noin 2,0 yksikköä, ja happofosfataasiaktiivisuus ovat hyödyllisiä indikaattoreita fermentaation etenemiselle. Käymisseos voidaan jäähdyttää  $10^\circ\text{C}$ :een ennen hiivasolujen talteenottoa.

Esimerkki 33: HlyIFN- $\alpha$ -2:n eristäminen ja talteenotto

a) Polypeptidiliuoksen valmistus monoklonaalista vasta-ainepepylvästä varten

Kaikkiaan 600 l kasvatusseosta, jonka pH on 4,1, jäähdytetään  $10^\circ\text{C}$ :een. Solut erotetaan käyttämällä Alfa-Laval BRPX-207 lietteenpoistosentrifugia. Kirkkaassa emäliuoksessa ei ole lainkaan IFN-aktiivisuutta. Solujen pidättämä emäliuosjännös poistetaan pesemällä 20 litralla lysispuskuria A (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 500 mM NaCl, 0,1 % (tilavuusosina) Triton X-100<sup>R</sup> ja 0,1 mM PMSF-liuosta, pH säädetty arvoon 7,5 kaliumhydroksidilla). Sentrifugikulhon sisältö (7 l) otetaan talteen kokonaan ja lietteenpoistolaite pestään kerran 5 litralla lysispuskuria A. Saatu solumassa liuotetaan puskurilla A 60 litraksi ja sen pH:ksi tulee 7,3. Suspensio jäähdytetään  $5-10^\circ\text{C}$ :een ja lasketaan DYNOR<sup>R</sup>-Mill'in (tyyppi KD5) läpi syöttönopeudella 100 l/h. Mylly on varustettu polyuretaanisekoitinkiekoilla ja 4200 ml:lla lasihelmiä, joiden halkaisija on 0,5 - 0,75 mm, ja sitä käytetään nopeudella 1625 kierrosta/minuutti. Rikottujen solujen suspensio (pH n. 7,3) sentrifugoidaan edelläkuvatulla tavalla. Emäliuos (75 l) väkevöidään 3 litraksi ultrasuodatuksella. Erä (300 ml) tästä polypeptidiliuoksesta

lasketaan H1P100 Hollow filter-makasiinin läpi käyttämällä Amicon DC-2 Hollow Fibre Systemiä. Suotimeen lisätään vielä 2 l puskurisysteemiä B (30 mM Tris.HCl, 500 mL NaCl, pH säädetty arvoon 8,5). Suodos ja pesuliuokset (2 l) yhdistetään ja väkevöidään 100 ml:ksi H1P10 Hollow filter-makasiinin avulla. Konsentraatti adsorboidaan DEAE-Trisacryl<sup>R</sup>M DEAE (LKB Ltd.)-pylväeseen. Pylväs pestään ja eluoidaan sen jälkeen puskurilla C (200 mM NaCl, 25 mM Tris.HCl, pH 8,5). Eluaatin interferoniaktiivisuus on  $1,4 \times 10^6$  IU/mg polypeptidiä, kun määrittäminen suoritetaan Armstrongin menetelmällä (32). Eluaattia säilytetään  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa ennen monoklonaalisessa vasta-ainepylväessä tapahtuvaa jatkopuhdistusta.

b) Ihmisen LyIFN- $\alpha$ -2:n puhdistaminen monoklonaalisessa vasta-ainepylväessä

Monoklonaalinen vasta-ainepylväs NK2 (toimittaja CELLTECH U.K.) (pakatun kolonnin tilavuus 20 ml) tasapainotetaan liuoksella, jossa on 20 mM Na-fosfaattia ja 154 mM NaCl, pH 7,4, ja edellävalmistettua polypeptidiliuosta lisätään pylväeseen huoneenlämpötilassa virtausnopeudella 50 ml/h. Ensimmäiset jakeet, jotka sisältävät adsorboitumattomat polypeptidit ja 100 ml PBR-pesuliuoksia, heitetään pois. Muut epäspesifiset sitoutuneet polypeptidit eluoidaan 110 ml:lla PBS-liuosta, jossa on 0,5 M NaCl ja 0,2 % Triton X-100<sup>R</sup>. Pylväs pestään 200 ml:lla liuosta, jossa on 20 mM Na-fosfaattia ja 0,3 M NaCl, pH 7,4, jonka jälkeen spesifisesti adsorboituneet polypeptidit eluoidaan 50 ml:lla puskuria D (0,1 M sitruunahappoa ja 0,3 M NaCl, pH 2). Tämän liuoksen pH säädetään arvoon 6,3 2N natriumhydroksidilla ja väkevöidään  $4^{\circ}\text{C}$ :ssa upotettavan-CX<sup>TM</sup>-molekyylierottimen avulla (Millipore<sup>R</sup>). Konsentraatti lisätään Sephadex G-25<sup>R</sup>-hienopylväeseen (2,6x34 cm, pakatun kolonnin tilavuus 200 ml), joka on tasapainotettu 0,025 M histidiini.HCl:lla, pH 6,3. Pylväs eluoidaan samalla histidiini-HCl-

puskurilla 4°C:ssa virtausnopeudella 42 ml/h. Kerätään 20 jaeetta, joiden kunkin suuruus on 10,5 ml. Polypeptidipitoiset jakeet erotetaan optisen adsorption perusteella aallonpituudella 280 nm. Jakeet 7 ja 8 sisältävät sen polypeptidin, jolla on IFN-aktiivisuus, kun määrittäminen suoritetaan Armstrongin menetelmällä (32). Aktiivisia jakeita, joissa on LyIFN- $\alpha$ -2, varastoidaan -20°C:ssa jatkokäyttöä varten. Jakeiden IFN-aktiivisuus on  $1,8 \cdot 10^8$  IU/mg polypeptidiä (32).

Kun edelläsaadut jakeet lyofilisoidaan, saadaan 1 ml:sta liuosta 20-40  $\mu$ g polypeptidiä.

SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi (ks. (53)) osoittaa, että saadun LyIFN- $\alpha$ -2:n molekyylipaino on noin 18 kDaltonia.

Esimerkki 34: Transformoituneiden hiivasolujen tuottaman interferonin erittyminen kasvuliukseen

Jotta saataisiin määritetyksi N-pään proteiinin signaalisekvenssin vaikutus proteiinin erittymiseen, hiivakantaa *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207/IF(8<sub>1</sub>) (jossa on yhdistelmäsignaalisekvenssi, ks. esimerkki 17) ja hiivakantaa *S. cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -2) (ilman signaalisekvenssiä) kasvatetaan esimerkissä 28 kuvatulla tavalla. Kasvuliukseen tuotetun interferonin määrä sekä se interferonimäärä, joka on solu-uutteissa (valmistettu esimerkissä 31 kuvatulla tavalla), määritetään ja saadut tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7: Vertailu transformoituneiden *S. cerevisiae* GRF18-kantojen kasvuliukseen erittämien interferonimäärien välillä

S. cerevisiae-kanta	Interferoniaktiivisuus (yksikköä/1 hiivasoluviljelmää)	
	solu-uute	kasvuliuos
GRF18/pJDB207R/IF( $\alpha$ -3)	$1.5 \cdot 10^9$	$< 3 \cdot 10^4$
GRF18/pJDB207/IF(8 <sub>1</sub> )	$2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^7$

Viitteet

1. A. Hinnen et al., "Transformation of yeast", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)
2. J.D. Beggs, "Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid", Nature 275, 104 (1978)
3. J. Hicks et al., "Properties of yeast transformation", Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol. 43, 1305 (1979)
4. K.Struhl et al., "High-frequency transformation of yeast; autonomous replication of hybrid DNA molecules", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035 (1979)
5. R.A. Hitzeman et al., "Expression of a human gene for interferon in yeast", Nature 293, 717 (1981)
6. J.D. Beggs et al., "Abnormal expression of chromosomal rabbit  $\beta$ -globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*", Nature 283, 835 (1980)
7. R. Axel, "The use of eukaryotic promoter sequences in the production of proteinaceous materials", PCT-patentihakemus 81/02425.
8. J.A. Carbon et al., "DNA capable of replication and stable mitotic maintenance in a host eukaryote, method of preparation thereof and eukaryotic cell containing same", Eurooppa-patentihakemus 48081 (The regents of the University of California)
9. D.T. Stinchcomb et al., "Eukaryotic autonomously replicating segment", Eurooppa-patentihakemus 45573 (The board of trustees of Leland Stanford Junior University)
10. "Plasmidvektoren, Hybridplasmide und ihre Verwendung zur Herstellung von Proteinen", DE-hakemusjulkaisu 2 923 297 (Institut Pasteur)

11. "Procédé de production de protéines par expression des gènes correspondants dans des microorganismes et vecteurs susceptibles d'être mis en oeuvre dans de tels procédés", FR-patenttikemus 2 458 585 (Institut Pasteur)
12. M. Aigle et al., "Nouveaux plasmides hybrides et microorganismes les contenant". Eurooppa-patenttikemus 11562 (Agence nationale de valorisation de la recherche)
13. A. Schurr et al., J. Gen. Microbiol. 65, 291 (1971) and A. Tohe et al., Mol. Gen. Genet. 162, 139 (1978)
14. P. Mildner et al., Biochim. Biophys. Acta 429, 274 (1976)
15. A.M. Maxam et al. in "Methods in Enzymology", vol. 65, p.499, New York 1980
16. A. Hinnen et al., "Vectors for cloning in yeast", Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96, 101 (1982)
17. A. Hinnen et al. in "Eukaryotic Gene Regulation", vol. 14, p. 43, New York 1979
18. "Genetic Engineering" (ed. A.M. Chakrabarty), West Palm Beach 1978
19. J. Lodder, "The Yeasts", Amsterdam 1971
20. M. Grunstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. A. Jimenez et al., Nature 287, 869 (1980)
22. T. Staehelin et al., J. Biol. Chem. 256, 9750 (1981)
23. M.V. Olson et al., J. Mol. Biol. 132, 387 (1979)
24. H. Meyer, FEBS Lett. 90, 341 (1978)
25. B. Hohn et al. in "Genetic Engineering", vol. 2, p. 169, New York 1980
26. B. Hohn in "Methods in Enzymology", vol. 68, p. 299, New York 1979
27. N. Mantei et al., Gene 10, 1 (1980)
28. J.D. Beggs in "Genetic Engineering", vol. 2, p. 175, New York 1981

29. M. Mandel et al., *J. Mol. Biol.* 53, 159 (1970)
30. J.H. Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor 1972
31. A. Toh-e et al., *J. Bacteriol.* 113, 727 (1973)
32. J.A. Armstrong, *Appl. Microbiol.* 21, 723 (1971)
33. J.B. Gurdon, *J. Embryol. Exp. Morph.* 20, 401-414 (1968)
34. Barth, *J. Embryol. Exp. Morph.* 7, 210-222 (1959)
35. A. Colman, *Cell* 17, 517 (1979)
36. A. Efstratiadis et al., *Cell* 4, 367-378 (1975)
37. T. Maniatis et al., *Cell* 8, 163-182 (1976)
38. J.H.J. Hoeijmakers et al., *Gene* 8, 391-417 (1980)
39. A.C. Peacock et al., *Biochemistry* 6, 1818 (1967)
40. K. Itakura et al., *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7327 (1975)
41. J.F.M. de Rooij et al., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 98, 537-548 (1979)
42. W. Mueller et al., *J. Mol. Biol.* 124, 343 (1978)
43. D.V. Goeddel et al., *Nature* 290, 20 (1981)
44. C. Weissmann, Eurooppa-patentihakemus No.32134 (Biogen N.V.)
45. T. Taniguchi et al., *Gene* 10, 11 (1980)
46. M. Streuli et al., *Science* 209, 1343 (1980)
47. Perlman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 781 (1982)
48. A.J. Berk et al., *Cell* 12, 721-732 (1977)
49. J. Messing, In the 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA (ed. A. Walton), Elsevier, Amsterdam 1981, pp. 143-153
50. D.S. Holmes et al., *Anal. Biochem.* 114, 193-197 (1981)

51. N.M. Gough et al., *J. Mol. Biol.* 162, 43-67 (1982)
52. Pasek et al., *Nature* 282, 575-579 (1979).
53. U.K. Laemmli, *Nature* 227, 680-685 (1970).

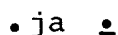


## Liite:

Liitteenä olevien kuvien 10-14 piirrosten symboleilla on seuraavat merkitykset:



vaihtunut aminohappo



vaihtunut nukleotidi



sekvenssi, joka ei ole läsnä ennestään  
tunnetun tiedon mukaan



polyadenyloituneet kohdat ennestään tunnetun  
tiedon mukaan















poistunut nukleotidi



lisätty nukleotidi

Vastaavissa kuvissa viittaavat merkityt symbolit lähimpiin tekniikan tason mukaisiin viitejulkaisuihin, kuten esimerkissä 10 on esitetty.

Muissa liitteenä olevien piirrosten kuvissa käytetyillä symboleilla on seuraavat merkitykset:

-  HBV<sub>s</sub>-geeni
-  pBR322-sekvenssit
-  hiivan kromosomaalinen DNA, joka on johdettu PHO3, PHO5-alueesta
-  hiivan 2μ-plasmidi-DNA
-  hiivan kromosomaalinen DNA, joka on johdettu LEU2-alueesta
-  poistunut katkaisukohta
-  ihmisen lyfoblastoidi-interferonigeeni
-  hiivan kromosomaalinen DNA, joka on johdettu TRP1-alueesta
-  poistunut kohta pBR322:ssa
-  katkaisukohta
-  transkription suunta
-  sidoksenmuodostajan DNA-jakso
- amp<sup>R</sup>** ampisilliinin vastustuskykygeeni
- tet<sup>R</sup>** tetrasykliinin vastustuskykygeeni

Patenttivaatimukset:

1. DNA-restriktiojakso, joka koostuu olennaisesti Saccharomyces cerevisiaen happamen fosfataasin (PHO5) säädeltävissä olevasta promoottorista, t u n n e t t u siitä, että se sisältää nukleotidisekvenssin

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCA  
 CGTTTTCCCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGCTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTCGTACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTCGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTGCAAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA  
 ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT  
 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

ja sen alajaksot, joissa promoottorifunktio on säilynyt.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA-jakso, t u n n e t t u siitä, että sillä on nukleotidisekvenssi

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCA  
 CGTTTTCCCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGCTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTCGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTCCGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA  
 ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT  
 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

ja sen alajaksot, joissa promoottorifunktio on säilynyt.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n n e t -  
 t u siitä, että sillä on sekvenssi

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAGGTTTATAGCCCTTTTTCTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTTAAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTTAAAGAGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTCGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGACGTTACTATGG  
 CTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGGG,

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen DNA-jakso, t u n -  
 n e t t u siitä, että sillä on sekvenssi

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

CGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTTAAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTTAAAGAGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG.

5. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukaisen DNA-jakson valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että  
 (A) valmistetaan happamen fosfataasin (PHO5) geeni täydentämällä happamen fosfataasin PHO5 suhteen vajaa Saccharomyces cerevisiae-hiivakanta suorittamalla transformointi plasmidi-DNA:lla, joka on saatu mainitun geenin villityyppikopion sisältävästä S. cerevisiae-geenikirjastosta, ja eristetään mainittu geeni,  
 (B) valmistetaan saadun geenin alaklooneja ja  
 (C) identifioidaan promoottorialueen sijainti edellämainituissa alaklooneissa ja eristetään restriktioentsyymikatkaisulla DNA-palaset, jotka olennaisesti koostuvat happamen fosfataasin (PHO5) promoottorista, ja alajaksojen valmistamiseksi saadut DNA-jaksot lyhennetään katkaisemalla restriktioendonukleaasilla tai eksonukleaasilla.

6. Hiiva-yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää DNA-jakson, joka olennaisesti koostuu jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukaisesta säädeltävissä olevasta Saccharomyces cerevisiae happamen fosfataasin (PHO5) promoottorista ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavasta alueesta, jota mainittu promoottori ohjaa.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdistelmävektori,

t u n n e t t u siitä, että hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue koodittaa ihmisen interferonia.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue koodittaa hepatiitti B-viruksen antigeeniä.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää hiivageenin transkription päätössignaaleja.

10. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittavaa aluetta edeltää signaali-sekvenssi.

11. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdistelmävektori, t u n n e t t u siitä, että hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue liittyy happamen fosfataasin (PHO5) promoottorialueeseen happamen fosfataasin (PHO5) pää-mRNA:n alun ja happanta fosfataasia (PHO5) koodittavan alueen ATG:n välissä.

12. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksista 6-11 mukaisen yhdistelmävektorin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että siinä liitetään vektori-DNA:han DNA-jakso, joka koostuu olennaisesti jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukaisesta säädeltävissä olevasta happamen fosfataasin (PHO5) promoottorista, ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, jota mainittu promoottori ohjaa.

13. Menetelmä Saccharomyces cerevisiae-kannan valmistamiseksi, joka on transformoitu hiiva-yhdistelmävektorilla, jossa on DNA-jakso, joka sisältää jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukaisen säädeltävissä olevan happamen fosfataasin (PHO5) promoottorin, ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, jota mainittu promoottori ohjaa, t u n n e t t u siitä, että Saccharomyces cerevisiae-kanta transformoidaan patenttivaatimuksen 6 mukaisella yhdistelmävektorilla.

14. Menetelmä hiivaperäisen tai hiivaan kuulumattoman polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että (1) viljellään Saccharomyces cerevisiae-kantaa, joka on transformoitu hiiva-yhdistelmävektorilla, jossa on DNA-jakso, joka koostuu olennaisesti jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukaisesta säädeltävissä olevasta happamen fosfataasin (PHO5) promoottorista, ja hiivaperäistä tai hiivaan kuulumatonta polypeptidiä koodittava alue, jota mainittu promoottori ohjaa, ja

(2) eristetään ja puhdistetaan polypeptidi.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on ihmisen interferoni.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on IFN- $\alpha$ -1.

17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on IFN- $\alpha$ -2.

18. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on IFN- $\alpha$ -3.

19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polypeptidi on hepatiitti B-viruksen antigeeni.

Patentkrav:

1. DNA-restriktionsfragment, som väsentligen består av den reglerbara promotorn av Saccharomyces cerevisiae surt fosfatas (PHO5), k ä n n e t e c k n a t därav, att det innehåller nukleotidsekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATCGTACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTCCGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTGCAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTCATCTCTCATGACAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA  
 ATGTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT  
 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

och dess subfragment, i vilka promotorfunktionen är bevarad.

2. DNA-fragment enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det har nukleotidsekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG



CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTCGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATAACCCATTTCCGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATACAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA  
 ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT  
 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

och dess subfragment, i vilka promotorfunktionen är bevarad.

3. DNA-fragment enligt patentkravet 2, k ä n n e -  
 t e c k n a t därav, att det har sekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA  
 GGTAAGGTTTCATAGCCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAAGAAATATATATTAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACCCTGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTCATTAAGAGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT  
 CAAATTCGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATAACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGACGTTAGTATGG  
 CTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGGG,

4. DNA-fragment enligt patentkravet 2, k ä n n e -  
 t e c k n a t därav, att det har sekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT  
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

GGTAAAAGGTT CATAGCGCTTTTCTTTGTCTGCACAAAAGAAATATATATTAATAATTAGCA  
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGGTT  
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG  
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTA  
 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT  
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG  
 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG.

5. Förfarande för framställning av ett DNA-fragment enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

- (A) framställer surt fosfatas(PHO5)-genen genom att komplettera en Saccharomyces cerevisiae-jäststam, som är defekt beträffande surt fosfatas (PHO5), genom att utföra transformation med plasmid-DNA, som erhållits från ett Saccharomyces cerevisiae-genbibliotek, som innehåller en vildtypkopia av den nämnda genen, och isolerar den nämnda genen,
- (B) framställer subkloner av den erhållna genen, och
- (C) identifierar läget av promotorområdet i de ovannämnda subklonerna och isolerar genom restriktionsenzymklyvning de DNA-fragment, som väsentligen består av surt fosfatas(PHO5)-promotorn,

och de för framställning av subfragment erhållna DNA-fragmenten förkortas genom att klyva med ett restriktionsendonukleas eller ett exonukleas.

6. Jäst-hybridvektor, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller ett DNA-fragment, som väsentligen består av den reglerbara Saccharomyces cerevisiae surt fosfatas(PHO5)-promotorn och en en jäst- eller icke-jäst-polypeptid kodande region, som kontrolleras av den nämnda promotorn.

7. En hybridvektor enligt patentkravet 6, k ä n n e -

t e c k n a d därav, att den en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande regionen kodar för människointerferon.

8. En hybridvektor enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a d därav, att den en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande regionen kodar för hepatitis B virusantigen.

9. En hybridvektor enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a d därav, att den innehåller terminationssignaler för transkription av en jästgen.

10. En hybridvektor enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a d därav, att en signalsekvens föregår den en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande regionen.

11. En hybridvektor enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a d därav, att den en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande regionen är bunden till promotorregionen av surt fosfatas (PHO5) mellan början av huvud-mRNA av surt fosfatas (PHO5) och ATG av den surt fosfatas (PHO5) kodande regionen.

12. Förfarande för framställning av en hybridvektor enligt något av patentkraven 6-11, k ä n n e t e c k n a t därav, att man däri inför i ett vektor-DNA ett DNA-fragment, som väsentligen består av den reglerbara surt fosfatas- (PHO5)-promotorn enligt något av patentkraven 1-4, och en en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande region, som kontrolleras av den nämnda promotorn.

13. Förfarande för framställning av en Saccharomyces cerevisiae-stam, som är transformerad med en jäst-hybridvektor innehållande ett DNA-fragment, som innehåller den reglerbara surt fosfatas(PHO5)-promotorn enligt något av patentkraven 1-4, och en en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid kodande region, som kontrolleras av den nämnda promotorn, k ä n n e t e c k n a t därav, att en Saccharomyces cerevisiae-stam transformeras med en hybridvektor enligt patentkravet 6.

14. Förfarande för framställning av en jäst- eller icke-jäst-poly-peptid, k ä n n e t e c k n a t därav, att man (1) odlar en Saccharomyces cerevisiae-stam, som transforme-

rats med en jäst-hybridvektor, som väsentligen består av den reglerbara surt fosfatas(PHO5)-promotorn enligt något av patentkraven 1-4, och en en jäst- eller icke-jäst-polypeptid kodande region, som kontrolleras av den nämnda promotorn, och

(2) isolerar och renar polypeptiden.

15. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a t därav, att polypeptiden är människointerferon.

16. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a t därav, att polypeptiden är IFN- $\alpha$ -1.

17. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a t därav, att polypeptiden är IFN- $\alpha$ -2.

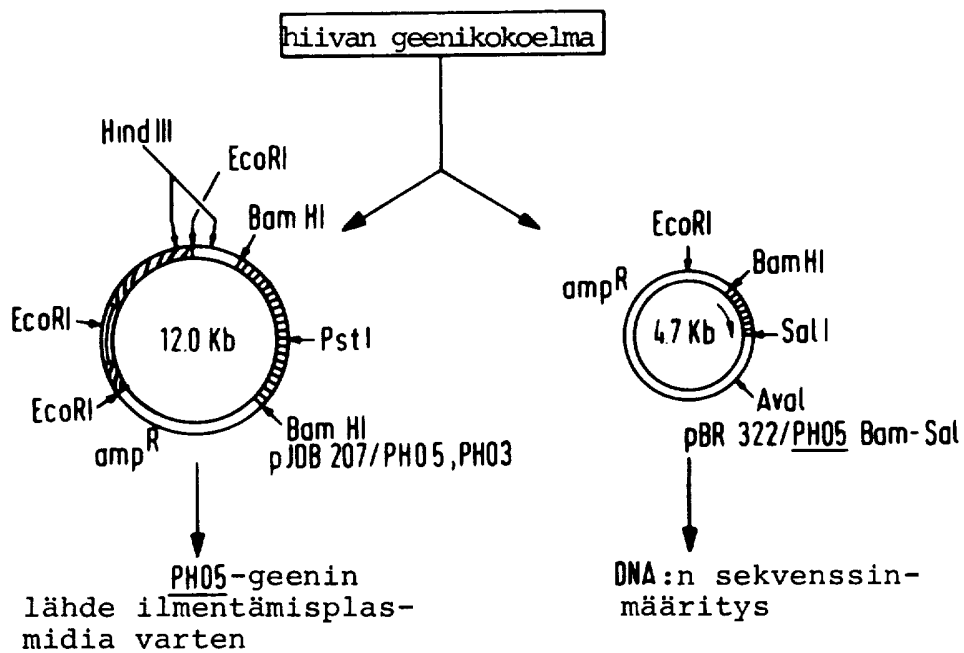
18. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a t därav, att polypeptiden är IFN- $\alpha$ -3.

19. Förfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e - t e c k n a t därav, att polypeptiden är hepatitis B-virusantigen.

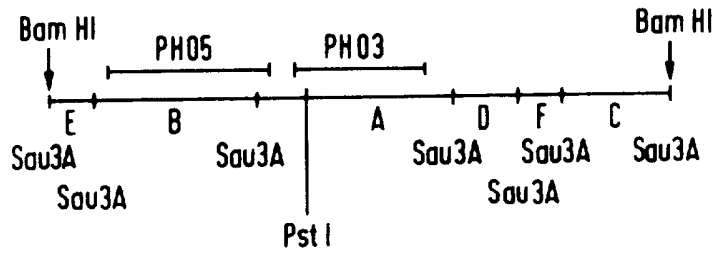
***Fig. 1***

Lähtöplasmidit DNA:n sekvenssinmäärityksen ja ilmentämisplasmidin rakentamiseen

---



Säädeltävissä olevan (PH05) ja rakenteellisen (PH03) happofosfataasin geenin paikantaminen

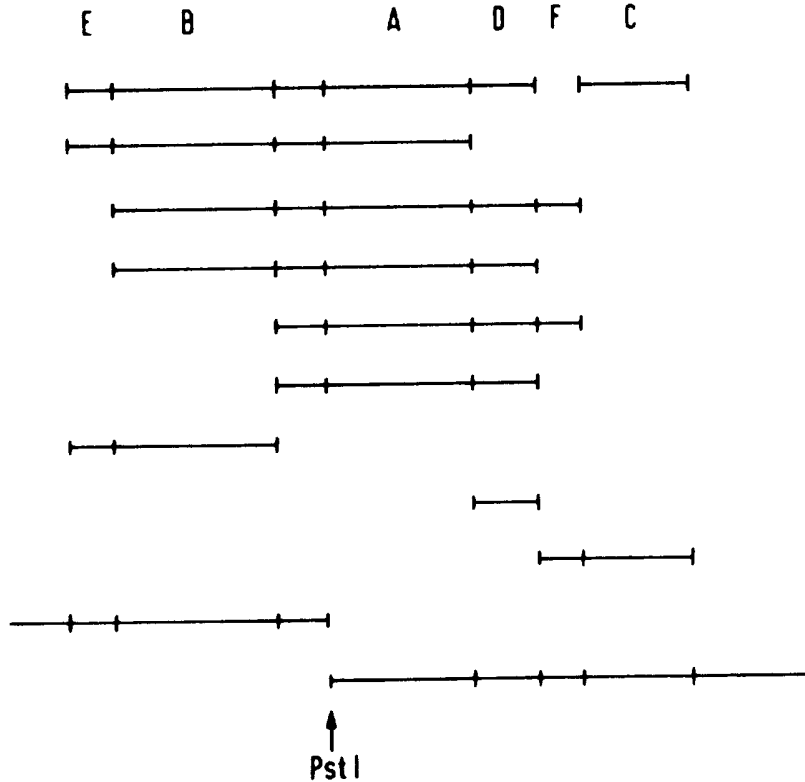


Fosfataasiaktiivisuus  
kytketty pois    kytketty päälle

Kloonatut alajaksot

(+P<sub>i</sub>)    (-P<sub>i</sub>)

- 1. +    ++
- 2. +    ++
- 3. +    ++
- 4. +    ++
- 5. +    +
- 6. +    +
- 7. -    -
- 8. -    -
- 9. -    -
- 10. -    ++
- 11. -    -



***Fig. 3a***

PHO5:n BamHI-SalI-restriktiopalasen nukleotidisekvenssi  
~~PHO5-promoterialue mukaanluettuna~~-----

G

-540

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

-480

ATGTGGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCATAAACTTCAAACGAA

-420

GGTAAAAGGTTATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAGAAATATATATTAATTAAGCA

-360

CGTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGTT

-300

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

-240

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTGGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

-180

CAAATGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

-120

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

-60

CTTCATCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA

+1

ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA GCC GCT TCT TTG GCC <sup>+45</sup>  
 MET PHE LYS SER VAL VAL TYR SER ILE LEU ALA ALA SER LEU ALA

AAT GCA GGT ACC ATT CCC TTA GGC AAA CTA GCC GAT G<sup>+82</sup>  
 ASN ALA GLY THR ILE PRO LEU GLY LYS LEU ALA ASP

***Fig. 3b***

PHO3:n PstI-RsaI-restriktiopalasen nukleotidisekvenssi  
 PHO3-promoterialue mukaanluettuna

---

GA

-360  
 GATATCCGAACAGGTAATGGATGTTTCAATCCCTGTAGTCAGTCAGGAACCCATATTA

-300  
 TATTACAGTATTAGTCGCCGCTTAGGCACGCCCTTAAATAGCAAAATCAAACCTTAAGTG

-240  
 CATAIGCCGTATAAGGGAAACTCAAAGAACTGGCATCCAAAAATGAAAAAAGGAAGAG

-180  
 TGAATAAAAAAAAAATTCAAAGAAATTTACTAAATAATACCACTTTGGGAAATAGTAAAC

-120  
 AGCTITGAGTAGTCCTATGCAACATATATAGTGCTTAAATTTGCTGGATGGAAGTCAAT

- 60  
 TATGCCTTGATTATCATAAAAAAAAAATACTACAGTAAAGAAAGGGCCATTCCAATTACCT

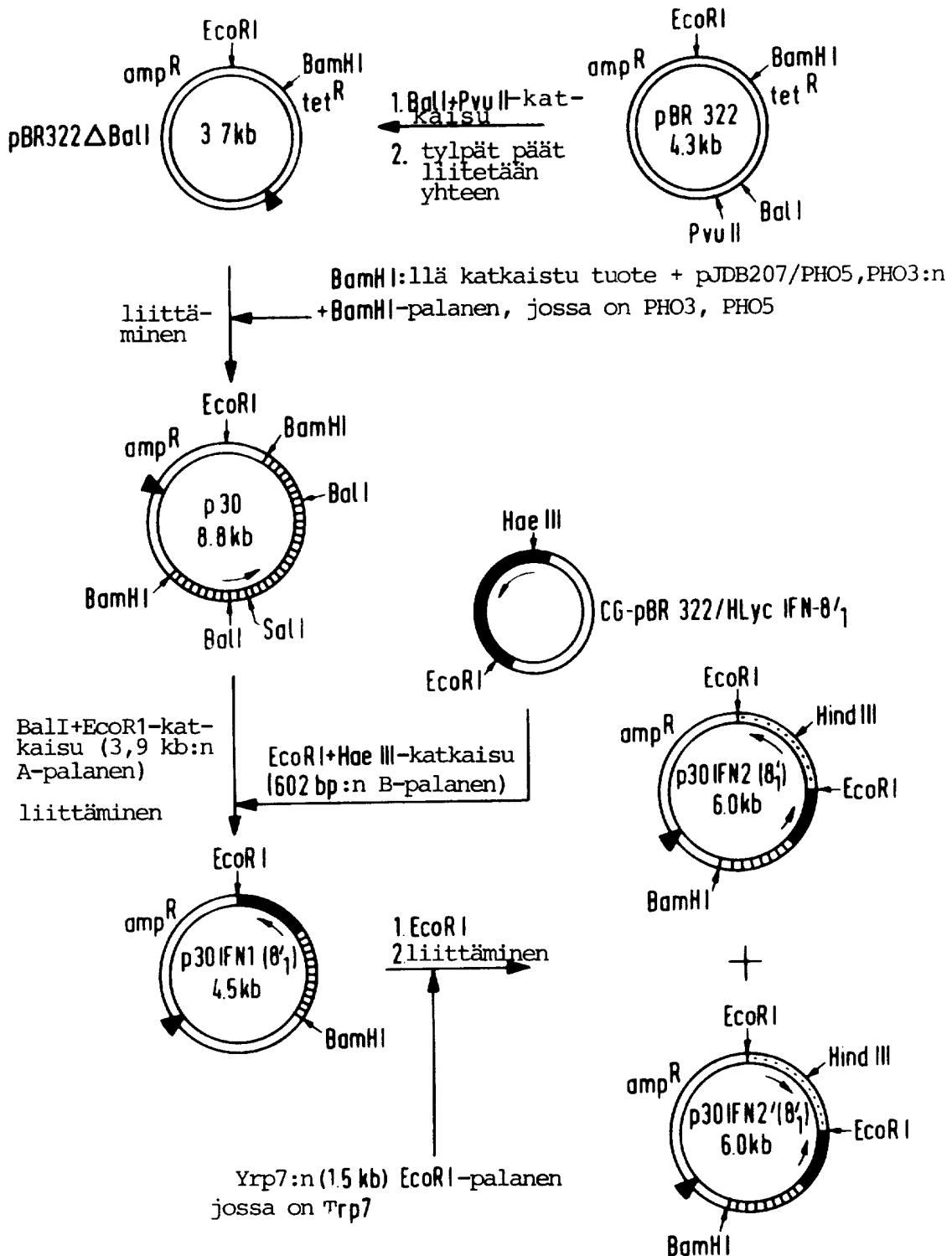
+1  
 ATG TTT AAG TCT GTT GTT TAT TCG GTT CTA GCC GCT GCT ITA GTT +45  
 MET PHE LYS SER VAL VAL TYR SER VAL LEU ALA ALA ALA LEU VAL

AAT GCA GGT +54  
 ASN ALA GLY



**Fig. 4**

Yhdistelmäplasmidien p30IFN2 (8') ja p30IFN2' (8') rakentamiskaavio

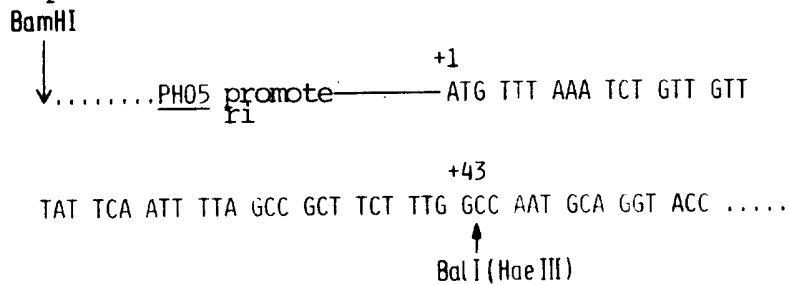


**Fig. 5**

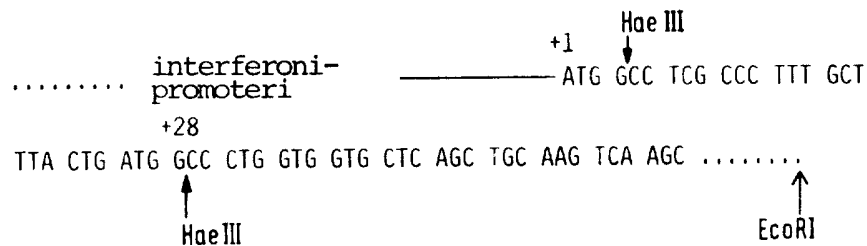
PHO5-promoterin DNA:n liittäminen CG-pBR322/HLycIFN-8<sub>1</sub>:n  
cDNA-liitännäiseen

---

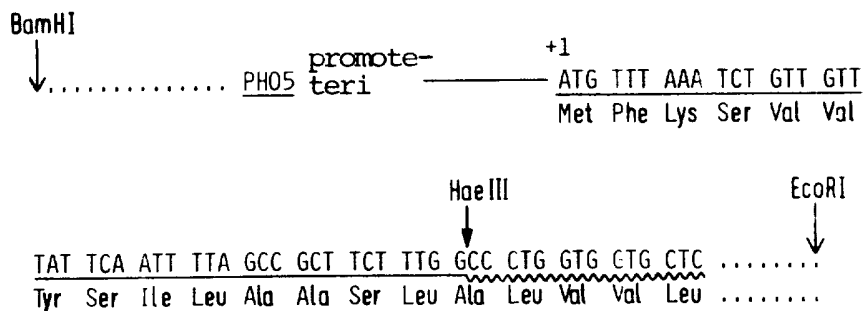
- a. DNA-jakso, joka sisältää PHO5-promoterin ja viereisen proteiinin koodittavan alueen



- b. DNA-jakso, joka sisältää interferonipromoterin ja viereisen proteiinia koodittavan alueen CG-pBR322/HLycIFN-8<sub>1</sub>:ssa

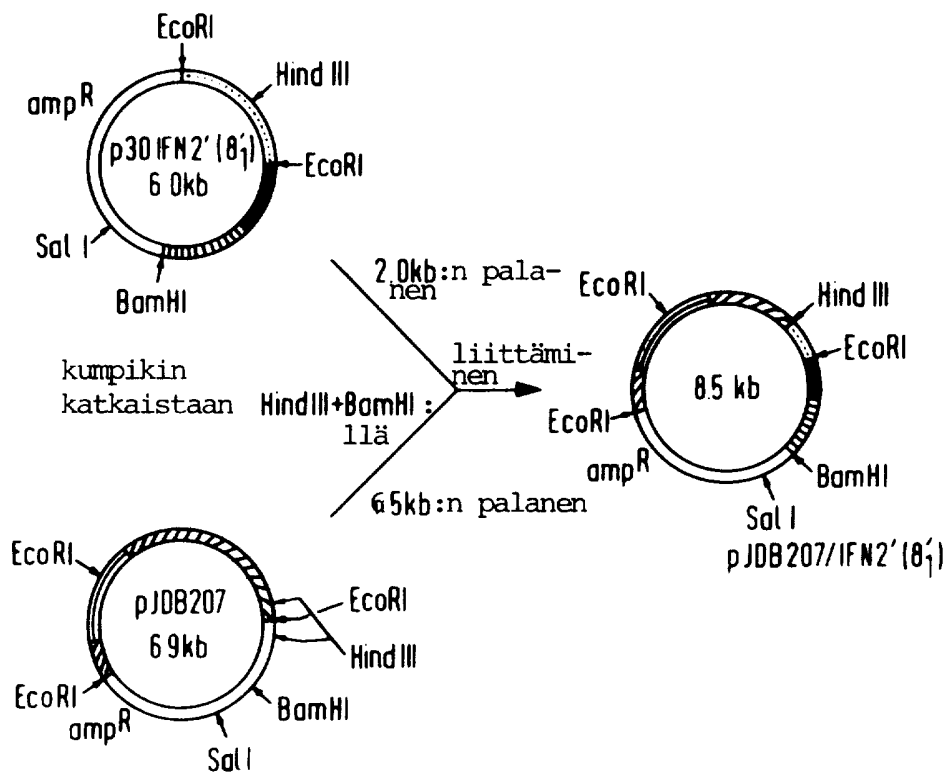


- c. a:n ja b:n yhtymistuotteen DNA-jakso p30IFN1(8<sub>1</sub>):ssä ja syntyvän interferonipolypeptidin N-pään emäsjärjestys

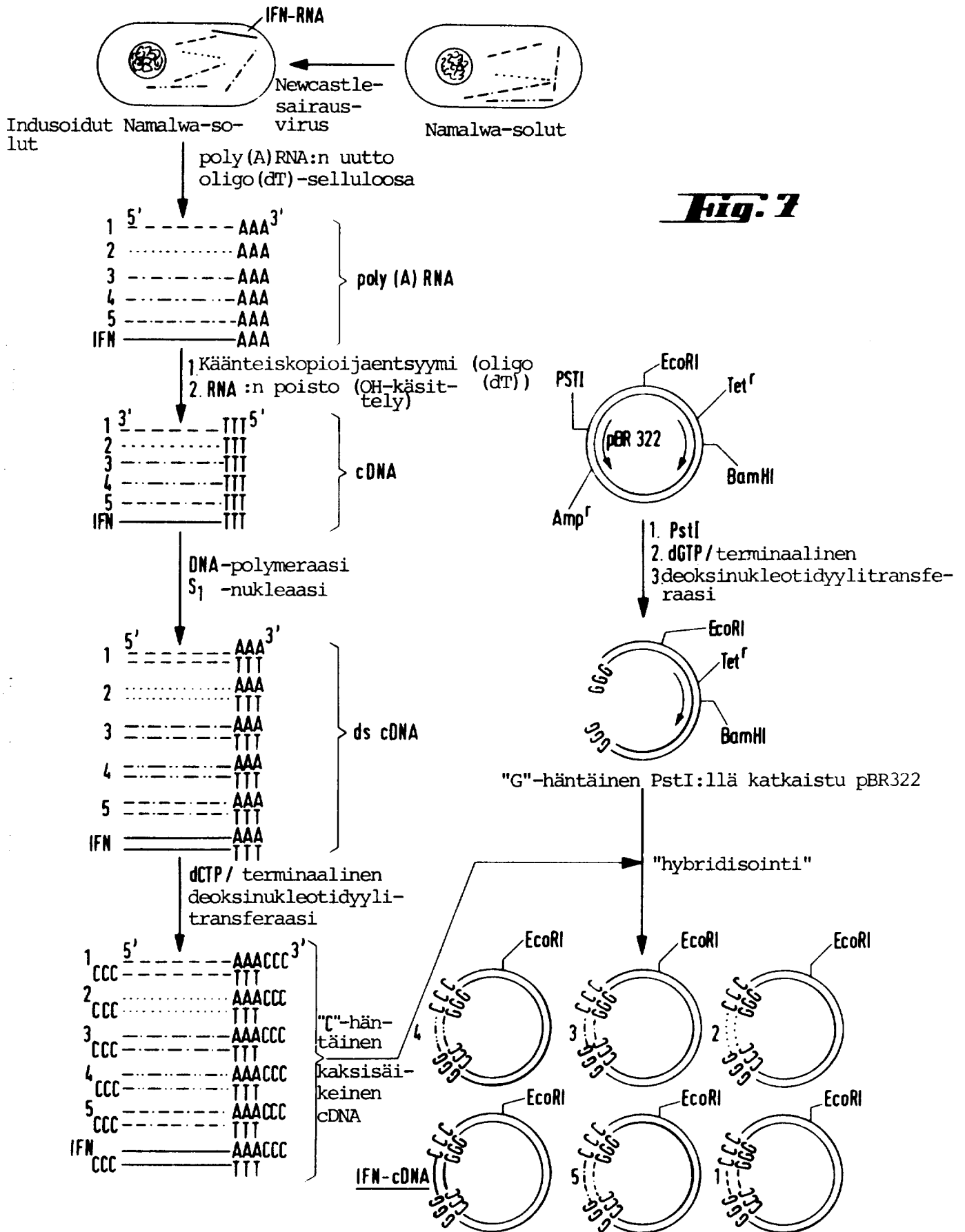


————— PHO5-sekvenssejä

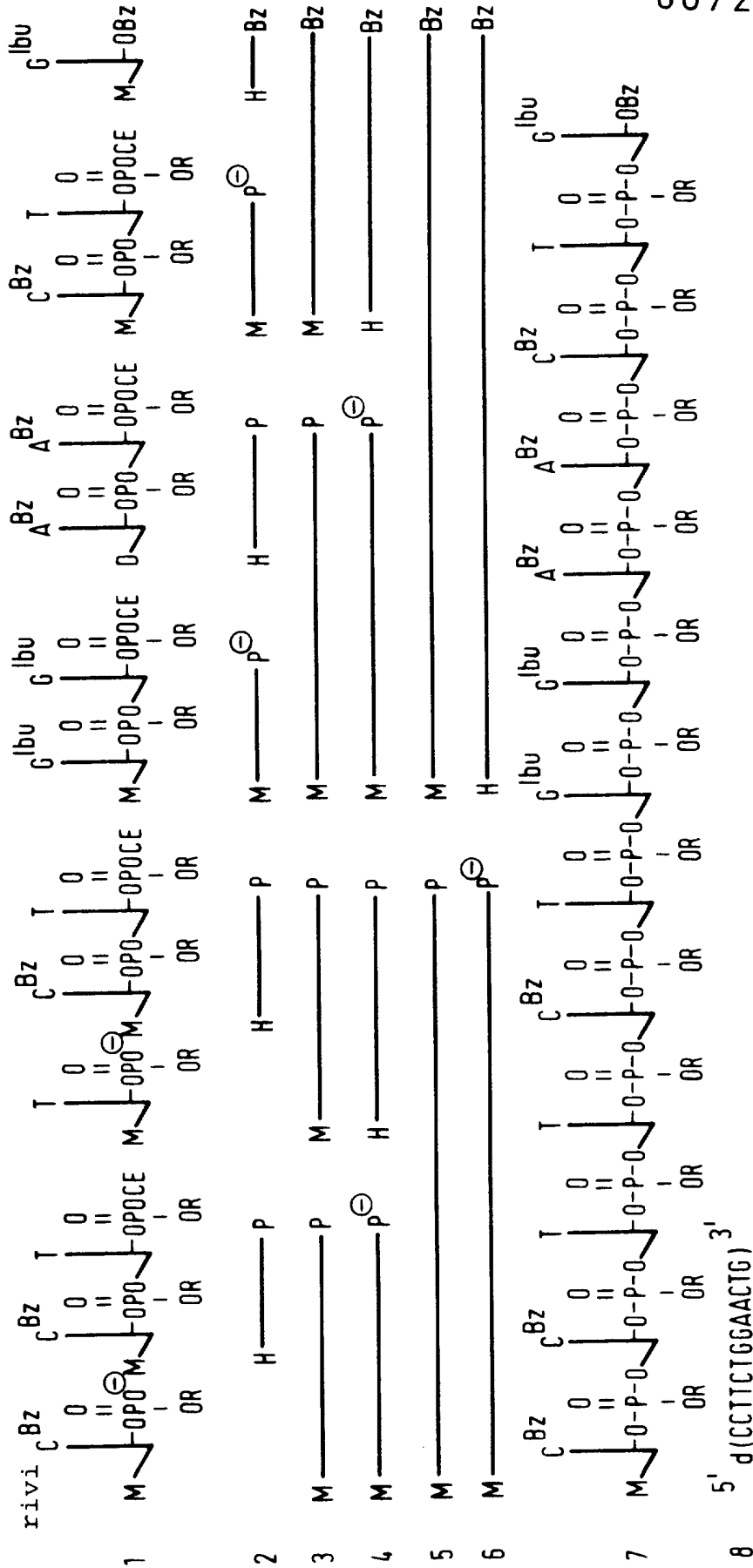
~~~~~ interferonisekvenssejä

**Fig. 6**Plasmidin pJDB207/IFN2'(8') rakentaminen

Kaksisäikeisen Namalwa-cDNA:n synteesi ja yhdistelmä-DNA-molekyylien rakentamiseen



DNA-syntyttimen (13-meeri) synteesi, joka on komplementäärinen  $\alpha_1$ - ja  $\beta$ -IFN mRNA:n suhteeseen



80720

Lyhenteet:

- M = monometoksi-
- trityyli
- R = 2-kloorifenyyli
- CE = 2-syanoetyyli
- lbu = isobutyli
- Bz = bentsoyli
- D = dimetoksitritiyyli
- P = fosfotriesteri
- P<sup>-</sup> = fosfodiesteri
- H = 5'-OH



# Fig. 10

Yhdistelmäplasmidi-DNA:n CG-pBR322/HlyCIFN-1'b sisältämän cDNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi

1  
MET ALA LEU SER PHE SER LEU LEU MET ALA VAL LEU VAL LEU SER TYR LYS SER ILE CYS SER LEU GLY  
ACATCCCA ATG GCC CTG TCC TTT TCT TTA CTG ATG GCC GTG CTG AGC TAC AAA TCC ATC TGT TCT CTG GGC 69  
CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET GLY ARG ILE SER  
TGT GAT CTG CCT CAG ACC CAC AGC CTG GGT AAT AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG GGA AGA ATC CCC 144  
PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE PHE PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS  
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG 219  
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA  
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294  
THR TRP GLU GLN SER LEU LEU GLU LYS PHE SER THR GLU LEU ASN GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL  
ACT TGG GAA CAG AGC CTC CTA GAA AAA TTT TCC ACT GAA CTT AAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGC GTG 369  
ILE GLN GLU VAL GLY VAL GLU THR PRO LEU MET ASN VAL ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS TYR PHE GLN  
ATA CAG GAG GTT GGG GTG GAA GAG ACT CCC CTG ATG AAT GTG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CAA 444  
ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTT TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519  
SER PHE SER LEU SER LYS ILE PHE GLN ARG LEU ARG ARG LYS GLU  
TCC TTC TCT TTA TCA AAA ATT TTT CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TGA AACCTGTTCAACATGGAATGATCTGTATT 601  
GACTAATACACCAGTCACACTTCTATGACTTCTGCCATTTCAAGACTCATTTCTCCTATAACCACCCGATGAGTTGAATCAAAAATTTTCAGATCTTT 700  
TCAGGAGTGAAGGAAACATCATGTTTACCTGTGCGAGGCCACTAGTCCTTACAGATGACCATGCTGATAGATCTAATTAATCTATCTATTGAAAATATTTA 799  
TTTTATTATGATTTAAATTAATTTTTTGTCCATGTAATATATGCTACTTTTACATTTGTGTTATCAAAATATGTTATTATATTATTTAGTCAATATAT 898  
TATTTCTTTTTTAAATTTTACTAATTAACCTTCTATATTATTTGTTTATTG

# **Fig. 11**

Yhdistelmäplasmidi-DNA:n CG-pBR322/HlycIFN- $\beta$ , sisältämän cDNA-liitännäisen nukleo-  
tidisekvenssi-----

SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN  
AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT 138

GLY ARG LEU GLU TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN PHE  
GGG AGG CTT GAA TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT CAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC 213

GLN LYS GLU ASP ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER  
CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT 288

SER THR GLY TRP ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR  
AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA 363

VAL LEU GLU GLU LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR  
GTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT 438

TYR GLY ARG ILE LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE  
TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC 513

LEU ARG ASN PHE TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN  
CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGAAGATCTCCTAGCCTGTGCCCTCTGGGACTGGAC 596

AATTGCTTCAAGCATTCTCAACCAGCAGATGCTGTTTAAAGTGACTGATGGCTAATGCTACTGCATATGAAAGGACACTAGAGATTTTGAATTTTAT 695

TAAATTAIGAGTTATTTTATTTAAATTTTATTTTGGAAAAATAAATTTTGGTGCAAAAGTC

80720



# ***Fig. 12***

Yhdistelmäplasmidi-DNA:n CG-pBR322/HlycIFN-4, sisältämän cDNA-liitännäisen nukleotidisekvenssi

SER SER ALA  
TCA TCT GCT 294

ALA TRP ASP GLU THR LEU LEU ASP LYS PHE TYR THR GLU LEU TYR GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL  
GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG 389

ILE GLN GLY VAL GLY VAL THR GLU THR PRO LEU MET LYS GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN  
ATA CAG GGG GTG GGG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA 444

ARG ILE THR LEU TYR LEU LYS GLU LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519

SER PHE SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU SER LEU ARG SER LYS GLU  
TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGA AAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTCATT 601

GATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTCTGCTATGACCATGACACGATTTTAAATCTTTCAAATGTTTTAG 700

GAGTATTAATCAACATTGTATTGAGCTCTTAAGGCACCTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATT 799

ATTTATTAACATTTATAAAACAACCTATTTTTTGTTCATATTAATGTCATGTCACACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAAAATGTTCTTTGTATT 898

GGTATAITTTATTTTGGTGTTCATTGAACTTTTGGCTATGGAACTTTTGTACTTGTATTCTTTAAATGAAATTTCCAAGCCTAATTTGTGCAACCTGA 997

TTACAGAAATAACTGGTACACTTCATTTATCCATCAATATTATATTCAGATATAAGTAAAAATAAACTTTCTGTAACCAGTTG

80720

Yhdistelmäplasmidi-DNA:n CG-pBR322/HlycIFN-8<sub>1</sub> sisältämän cDNA-liittännäisen nukleotidisekvenssi

CCCAAGGTTTCAGAGTCACCCATCTCAGCAAGCCAGAGCATCTGCAAT

1 MET ALA SER PRO PHE ALA LEU LEU MET ALA LEU VAL VAL LEU SER CYS LYS SER SER CYS SER LEU GLY  
ATCTATG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GCC CTG GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC TGC TCT CTG GGC<sub>69</sub>

Hae III

Hae III

CYS ASP LEU PRO GLU THR HIS SER LEU ASP ASN ARG ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET SER ARG ILE SER  
TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT<sub>144</sub>  
PRO SER SER CYS LEU MET ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU LEU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS  
CCT TCC TCC TGT CTG ATG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG<sub>219</sub>

ALA PRO ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU LEU ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR LYS ASP SER SER ALA  
GCT CCA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG CTG ATC CAG CAG ATC TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT<sub>294</sub>

ALA TRP ASP GLU ASP LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL  
GCT TGG GAT GAG GAC CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG GAA GCC TGT GTG<sub>369</sub>

MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE ARG  
ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG AAT GCC GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CGA<sub>444</sub>

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA<sub>519</sub>

SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU ARG LEU ARG LYS GLU  
TCC CTC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG AAG GAA TAA CACCTGGTCCAAACATGAAACAATTCCTTATTG<sub>601</sub>

ACTCATATACCAGGTCAGGCTTTCATGAATTCCTGCCATTTCAAGACTCTCACCTCTGCTATAACTATGACCATGCTGATAAACTGATTTATCTATTTA<sub>700</sub>

EcoR I

AATATTTATTTAGCTATTATAAGATTTAAATTTATTTTTTGTTCATATAACATCATGTGCATCTTTACACTGTGGTTAGTGAATAAAACATGTTCCCTTA<sub>799</sub>

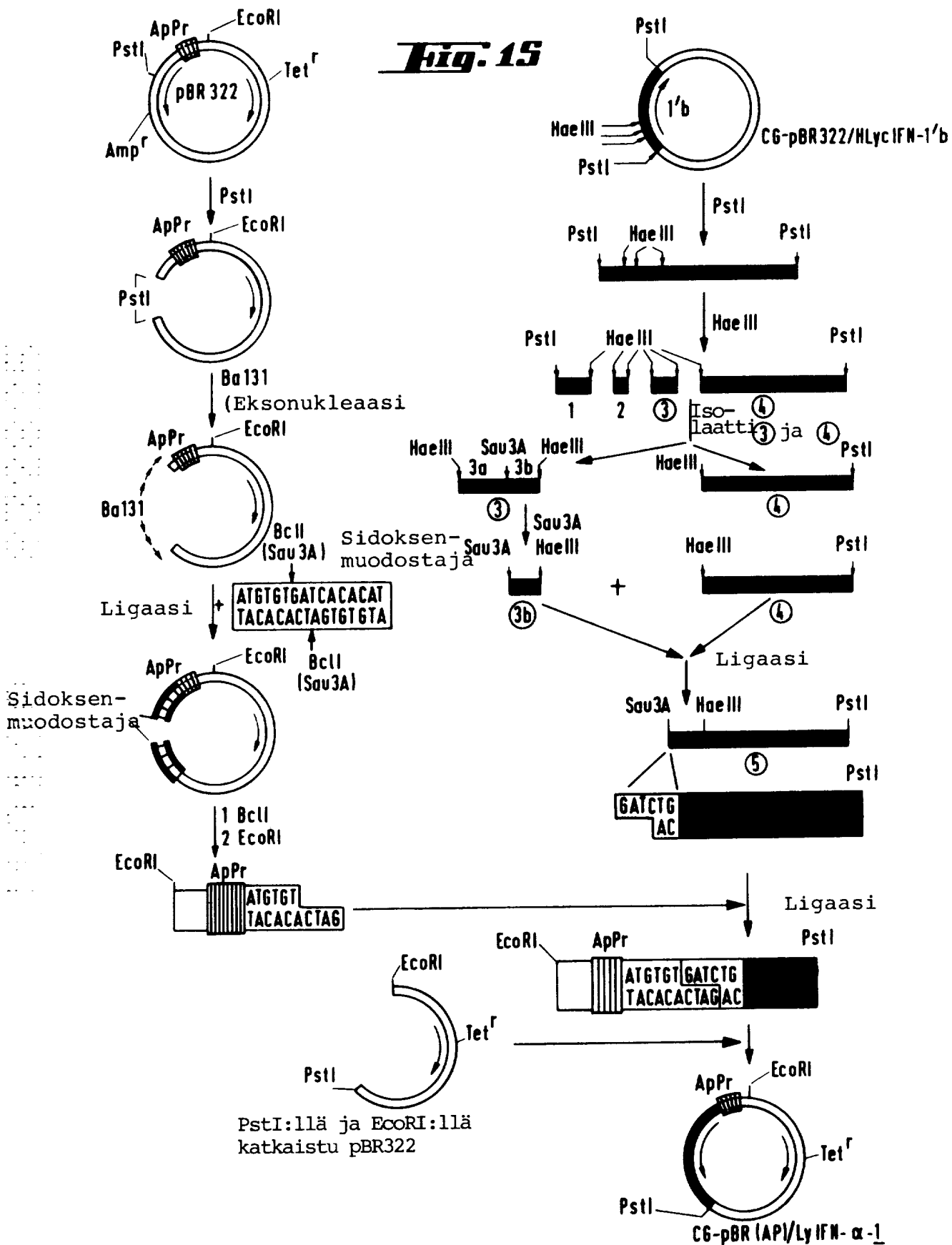
TATTTACTCAAATTCATTATTTA

yhdistelmäplasmidi-DNA:n CG-pBR322/HlycIFN-5, sisältämän cDNA-  
 liittännäisen nukleotidisekvenssi

1 ATCTGAACCAGCTCAGCAGCATCCACAAC  
 MET ALA LEU THR PHE TYR LEU LEU VAL ALA LEU VAL LEU SER TYR LYS SER PHE SER SER LEU GLY  
 ATCTACA ATG GCC TTG ACT TTT TAT TTA CTG GTG GCC CTA GTG GTG CTC AGC TAC AAG TCA TTC AGC TCT CTG GGC 69  
 CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET ARG ARG ILE SER  
 TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG GGC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT 144  
 PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN GLU PHE ASP LYS ASP LYS GLN PHE GLN LYS  
 CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GAA TTC CCC CAG GAG GAG TTT GAT GAT AAA CAG TTC CAG AAG 219  
 ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA  
 GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAC CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294  
 ALA LEU ASP GLU THR LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP GLN LEU ASN ASP LEU LEU GLU SER CYS VAL  
 GCT TTG GAT GAG ACC CTT CTA GAT GAA TTC TAC ATC GAA CTT GAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAG TCC TGT GTG 369  
 MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN  
 ATG CAG GAA GTG GGG GTG ATA GAG TCT CCC CTG ATG TAC GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA 444  
 ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS TYR SER SER CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
 AGA ATC ACT CTA TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC TCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519  
 SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU  
 TCC TTC TCT TTA TCA ATC AAC TTG CAA AAA AGA TTG AAG AGT AAG GAA TGA GACCTGGTACAACACGGAAATGATTCTTATA 601  
 GACTAATACAGCAGCTCACACTCGACAAGTTGTGCTCTTTCAAAGACCCTTTGTTCTGCAAAAACCATGCTATGTTTGAATCAAATGTGTCAAGTGT 700  
 TTTCAGGAGTGTAAAGCAACATCCTGTTTCAGCTGTATGGGCACTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGGATCTATTCATCTATTTTAAATCTT 799  
 TATTAGTTAACATCTATAGGGCTTAAATAGTTTGGTTCATATTATATTATGTAAGCTTTTACATTTGTAATTGTTGTAACAAAAACATGTTCTTTAT 898  
 ATTTATTATTTGCCCTTGTATTAAATTTTACTATAG

CG-pBR (AP) LyIFN- $\alpha$ -1-yhdistelmä-DNA:n rakentaminen  
 ApPr: $\beta$ -laktamaasin ilmentymisen ohjausalue

**Fig. 15**



$\beta$ -laktamaasin promoteri MET

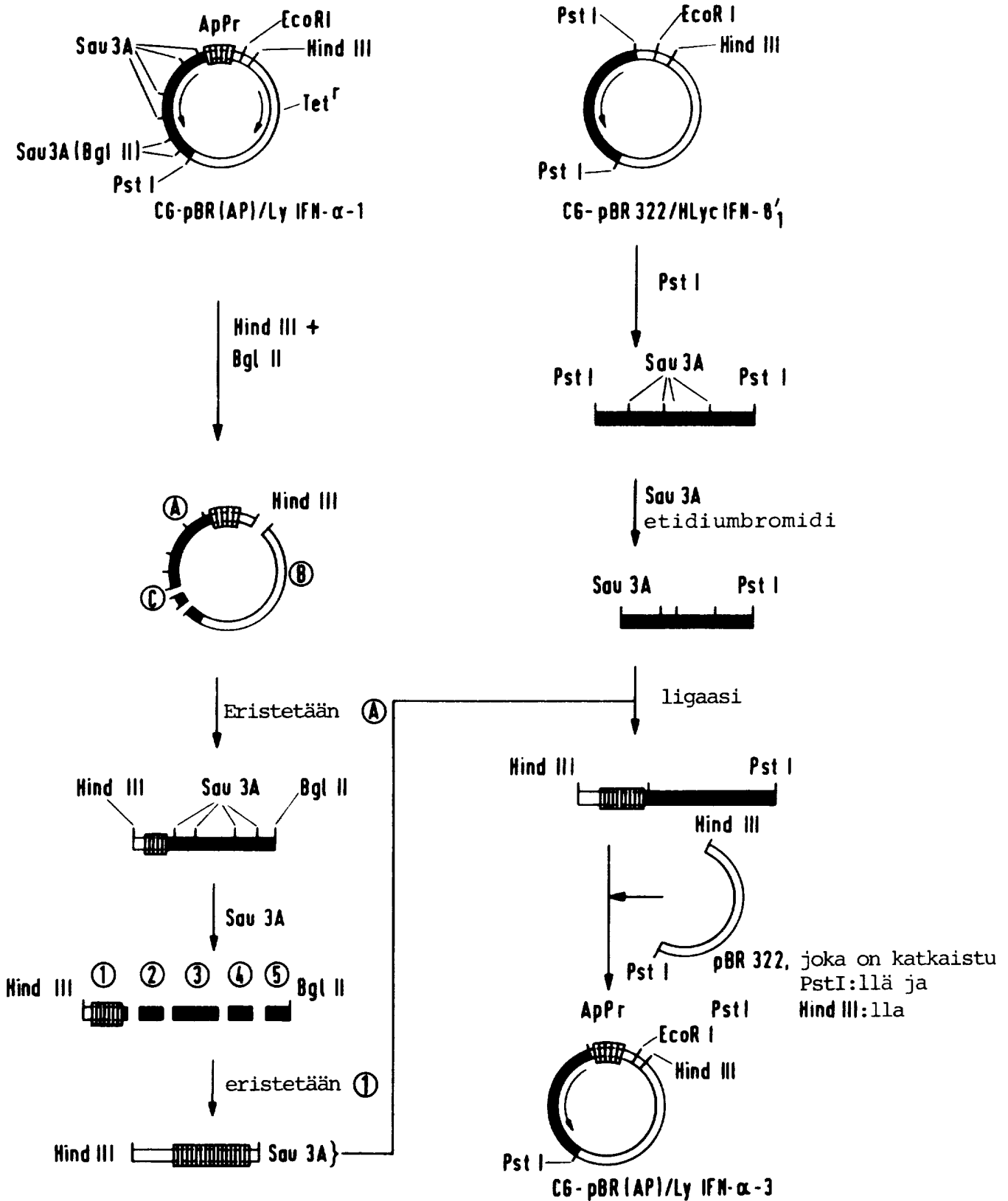
...GAGACAATAACCCCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET GLY ARG ILE SER  
TGT GAT CTG CCT CAG ACC CAC AGC CTG GGT AAT AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG GGA AGA ATC CCC<sup>144</sup>PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS  
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG<sup>219</sup>ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA  
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT<sup>294</sup>THR TRP GLU GLN SER LEU LEU GLU LYS PHE SER THR GLU LEU ASN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL  
ACT TGG GAA CAG AGC CTC CTA GAA AAA TTT TCC ACT GAA CTT AAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGC GTG<sup>369</sup>ILE GLN GLU VAL GLY VAL LEU GLU THR PRO LEU MET ASN VAL ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE GLN  
ATA CAG GAG GTT GGG GTG GAA GAG ACT CCC CTG ATG AAT GTG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CAA<sup>444</sup>ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTT TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA<sup>519</sup>SER PHE SER LEU SER LYS ILE PHE GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU  
TCC TTC TCT TTA TCA AAA ATT TTT CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TGA AACCTGTTTCAACATGGAATGATCTGTATT<sup>601</sup>GACTAATACACCAGTCCACACTTCTATGACTTCTGCCATTTCAAGACTCATTCTCCTATAACCACCCGATGAGTTGAATCAAAAATTTTCAGATCTTT<sup>700</sup>TCAGGAGTGT AAGGAACATCATGTTTACCTGTGCAGGCAGCTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATAGATCAATTAICTAICTATTGAAAATATTTA<sup>799</sup>TTTATTTATTAGATTTAAATTTTGGCCATGTAATATTATGTGACTTTTACATTTGTTTATATCAAAAATGTTTATTATTTAGTCAATATAT<sup>898</sup>

TATTTCTTTTATTAAATTTTACTATTAAAACCTTCTATATTATTTGTTATTG...

**Fig. 17**

Yhdistelmä-DNA-plasmidin CG-pBR (AP)/LyIFN- $\alpha$ -3 rakentaminen



$\beta$  -laktamaasin promote- MET  
II

...GAGACAATAACCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLU THR HIS SER LEU ASP ASN ARG ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET SER ARG ILE SER  
TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT<sup>144</sup>

PRO SER SER CYS LEU MET ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS  
CCT TCC TCC TGT CTG ATG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG<sup>219</sup>

ALA PRO ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU LEU ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR LYS ASP SER SER ALA  
GCT CCA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG CTG ATC CAG CAG ATC TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT<sup>294</sup>

ALA TRP ASP GLU ASP LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU LEU ALA CYS VAL  
GCT TGG GAT GAG GAC CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG GAA GCC TGT GTG<sup>369</sup>

MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE ARG  
ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG AAT GCG GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CGA<sup>444</sup>

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA<sup>519</sup>

SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU  
TCC CTC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG AGG TAA CACCTGGTCCAACATGAACAATTCTTATTG<sup>601</sup>

ACTCATATACCAGGTCACGGCTTTCATGAATTCGGCATTTCGAAGACTTCACCTTCGCTATAACATGACCATGCTGATAAACTGATTTAICTATTTA<sup>700</sup>

AAATATTTATTAGCTATTTCATAGATTTAAATTTTGGTTCATATAACATCATGTCACCTCTTTACACTGTGGTTAGTGTAATAAAACATGTTCCCTTA<sup>799</sup>

TATTTACTCAAATTCATTATTTT...

CG-pBR(AP)/LyIFN- $\alpha$ -2

**Fig. 19**

$\beta$ -laktamaasin promoteri MET

...GAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAAGAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET ARG ARG ILE SER  
TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT<sup>144</sup>

PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP PHE LEU PHE PRO GLN GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS  
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GAA TTC CCC CAG GAG GAG TTT GAT GAT AAA CAG TTC CAG AAG<sup>219</sup>

ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA  
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAC CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT<sup>294</sup>

ALA LEU ASP GLU THR LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL  
GCT TTG GAT GAG ACC CTT CTA GAT GAA TTC TAC ATC GAA CTT GAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAG TCC TGT GTG<sup>369</sup>

MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN  
ATG CAG GAA GTG GGG GTG ATA GAG TCT CCC CTG ATG TAC GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA<sup>444</sup>

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS TYR SER SER CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG  
AGA ATC ACT CTA TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC TCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA<sup>519</sup>

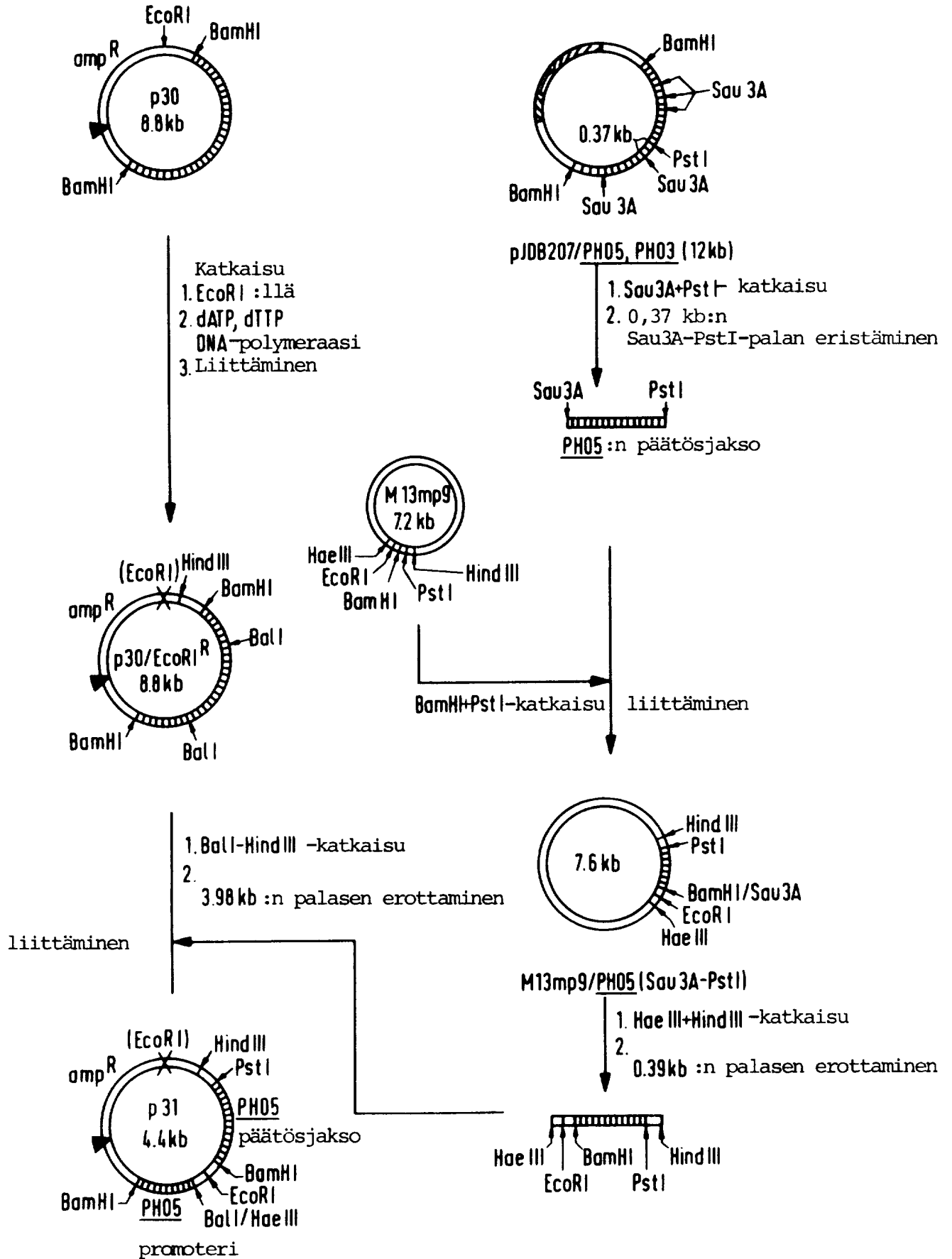
SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU  
TCC TTC TCT TTA TCA ATC AAC TTG CAA AAA AGA TTG AAG AGT AAG GAA TGA GACCTGGTACAACACGGAAATGATCTTATA<sup>601</sup>

GACTAATACAGCAGCTCACACTTCGACAAGTTGTGCTCTTTCAAGACCCTTTGTTCTGCCAAAACCATGCTATGTTTTGAAATCAAATGTGTCAAAGTG<sup>700</sup>  
TTTCAGGAGTGTTAAGCAACATCCTGTTTCAGCTGTATGGGCACTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGGAATCTATTCTATTATTAAATCTT<sup>799</sup>

TATTAGTTAACTATCAGGGCTTAAATAGTTTTGTTTCATATTATATTATGTAACATTTTACATTTGAAATTTGTAACAAAAACATGTTCTTTAT<sup>898</sup>

ATTTATTATTTTGCCTTGTTTATTAAATTTTACTATAG...



**Fig. 20**Ilmentämisplasmidin p31 rakentaminen

***Fig. 21***

Sau3A-PstI-PHO5-transkription päätösjakson nukleotidijärjestys-----

GATCCTGGTACGTTCCCTCAAGGTGCTCGTGTCTACACCGAAAAATCCAATGTTCTAACG

ACACCTACGTCAGATACGTCATTAACGATGCTGTTGTTCCAATTGAAACCTGTTCCACTG

GTCCAGGGTTCCTTGTGAAATCAATGACTTCTACGACTATGCTGAAAAGAGAGTAGCCG

GTACTGACTTCCTAAAGGTCTGTAACGTCAGCAGCGTCAGTAACTCTACTGAATTGACCT

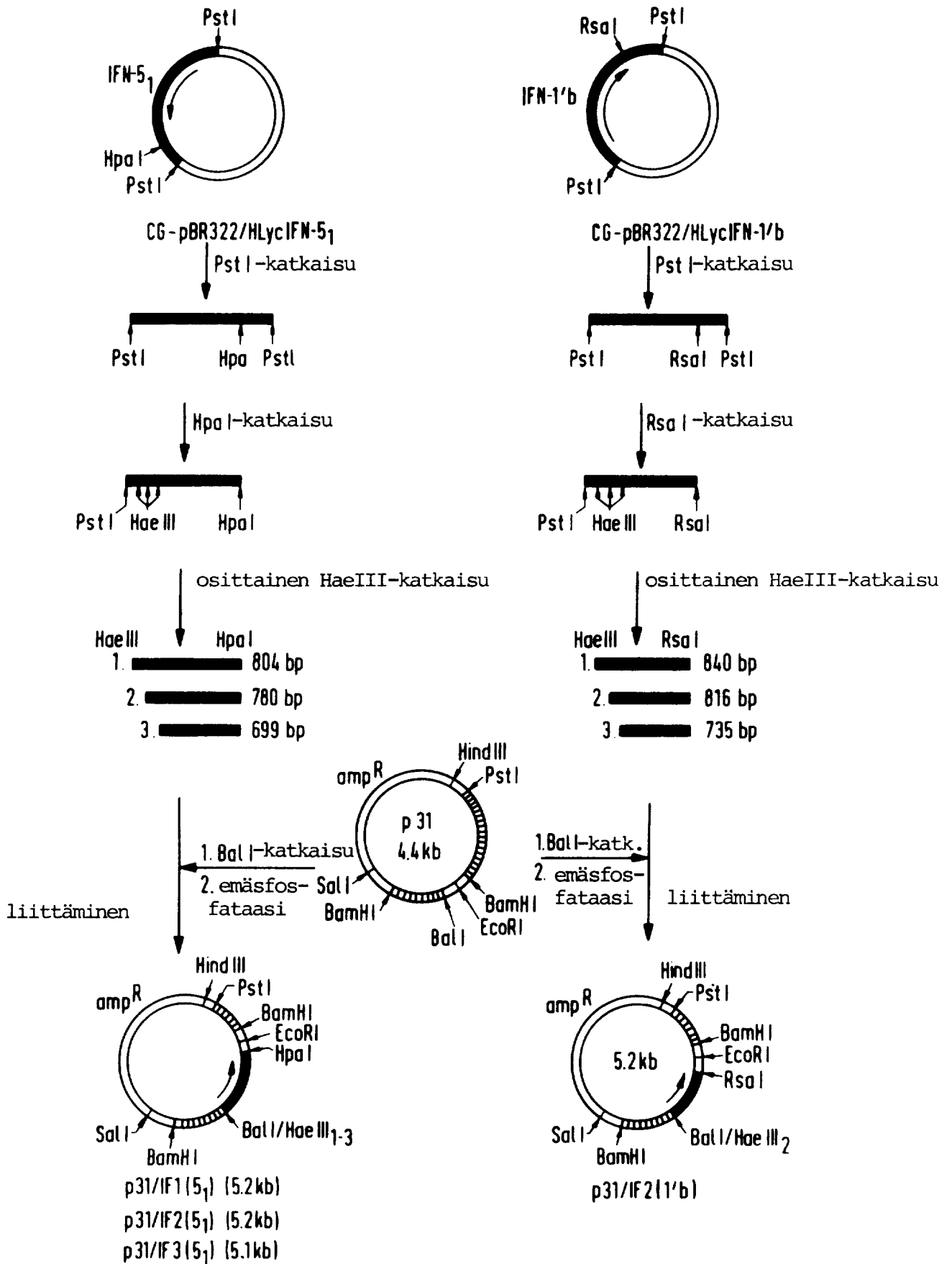
TCTACTGGGACTGGAACACTACTCATTACAACGCCAGTCTATTGAGACAATAGTTTTGTA

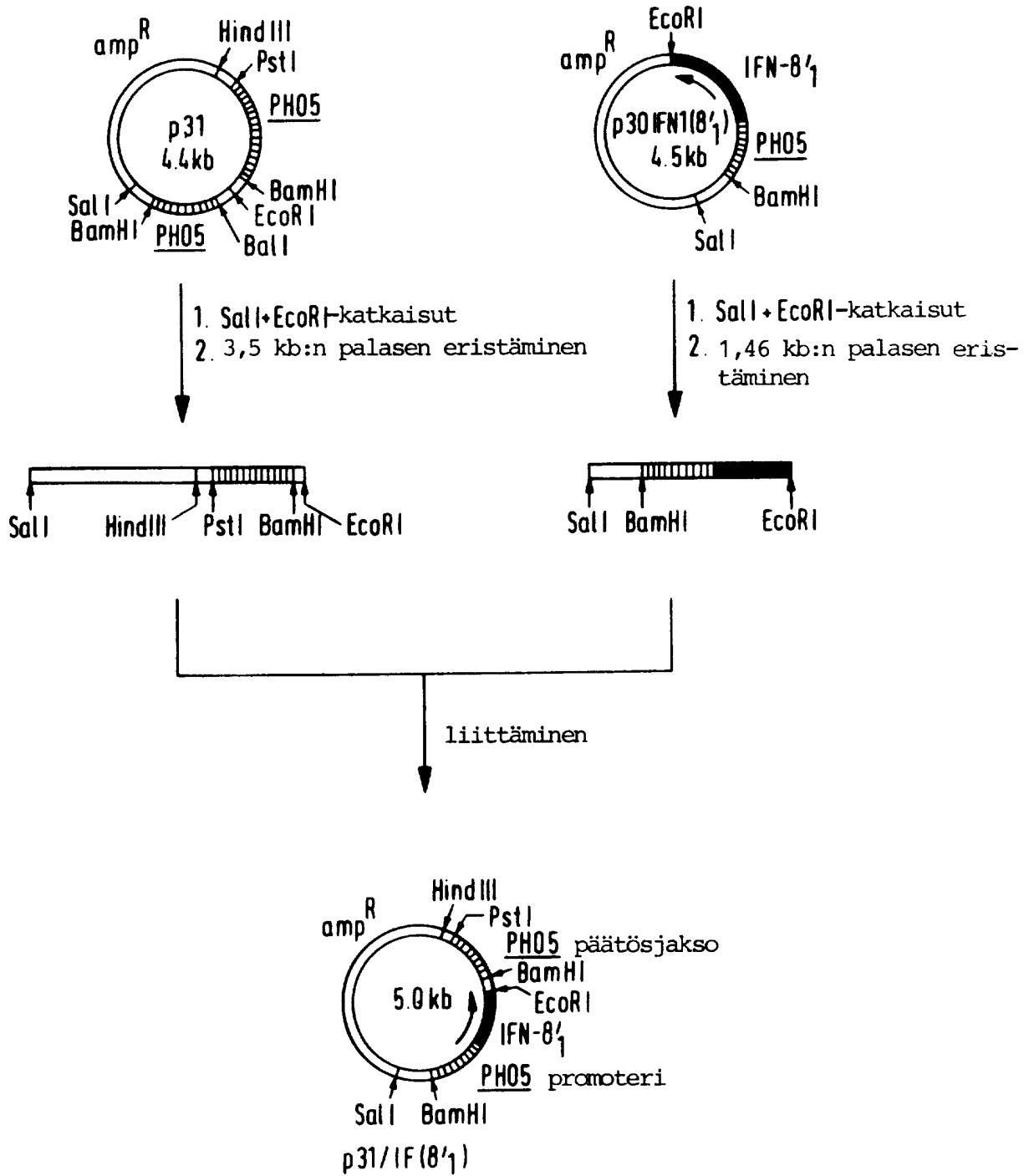
TAACTAAATAATATTGGAACTAAATACGAATACCCAAATTTTTTATCTAAATTTTGCCG

AAAGATTAAATCTGCA

**Fig. 22**

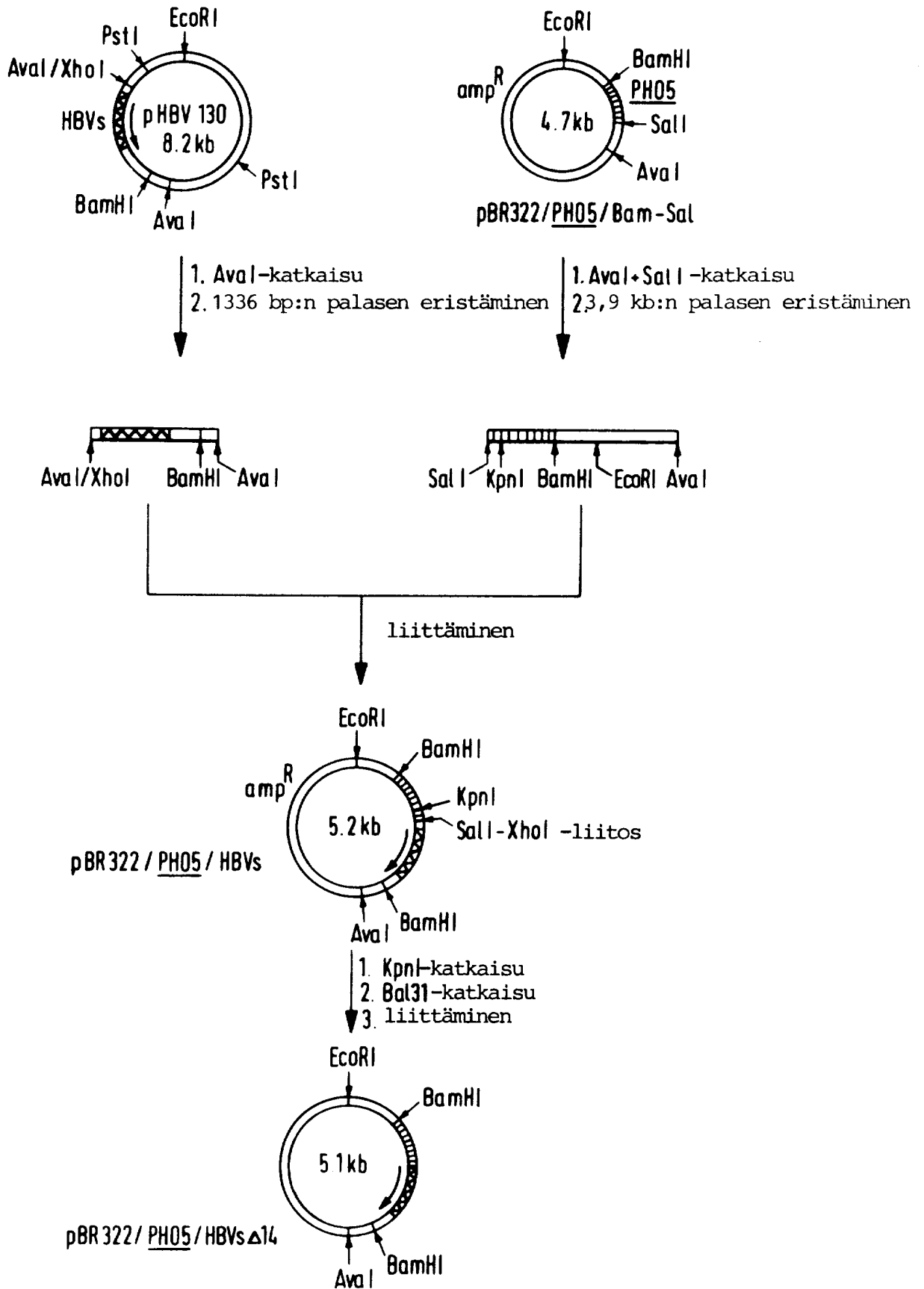
IFN- $\gamma$ :tä ja IFN- $\beta$ :tä koodittavien sekvenssien liittämisen plasmidiin p31



**Fig. 23**Ilmentämisplasmidin p31/IF(8<sub>1</sub>) rakentaminen

Sellaisen PH05-HBVs:n rakentaminen, jossa on oikea liitos

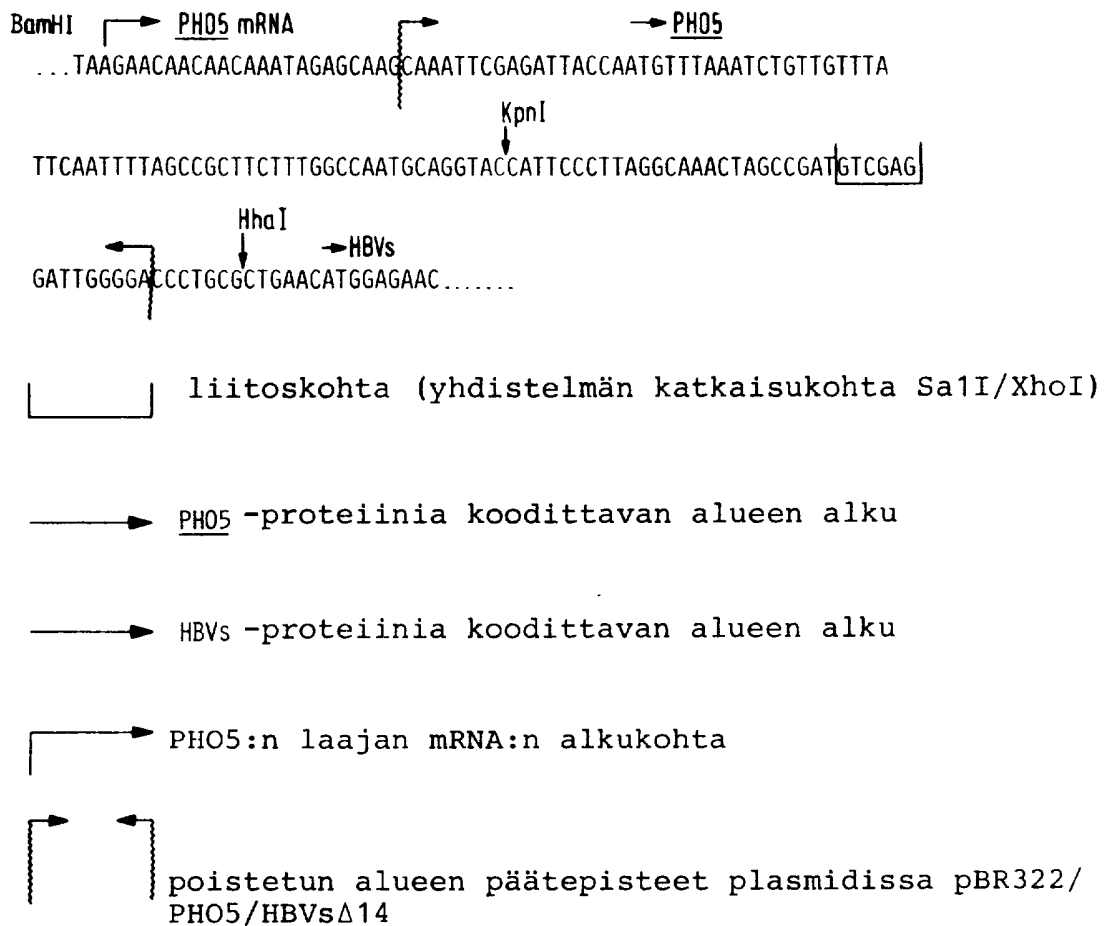
**Fig. 24**



***Fig. 25***

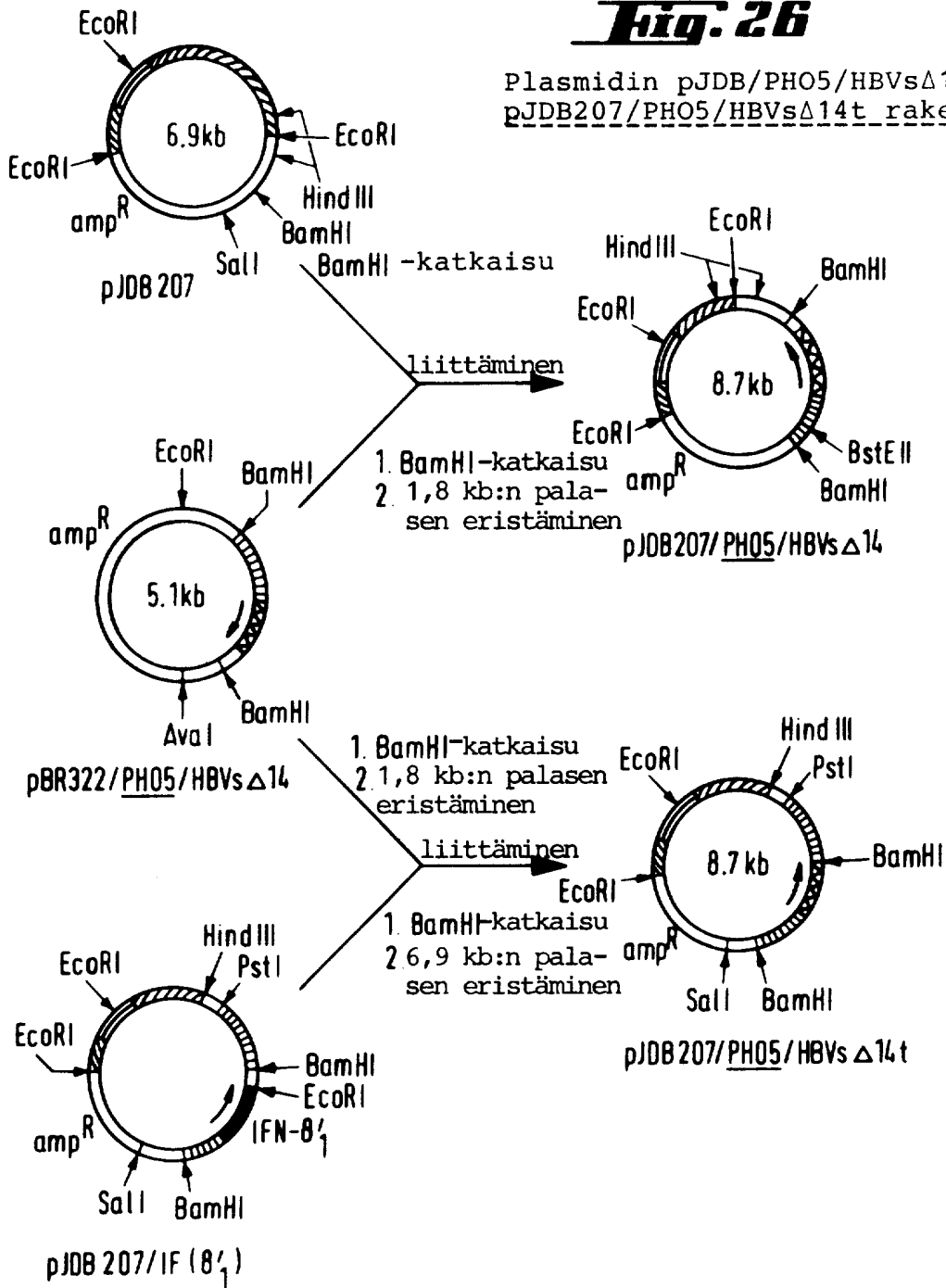
PH05-promoterin ja HBVs-proteiinia koodittavan alueen liittämisen (plasmidi pBR322/PH05/HBVs) jälkeinen sekvenssiryhmitelmä

---



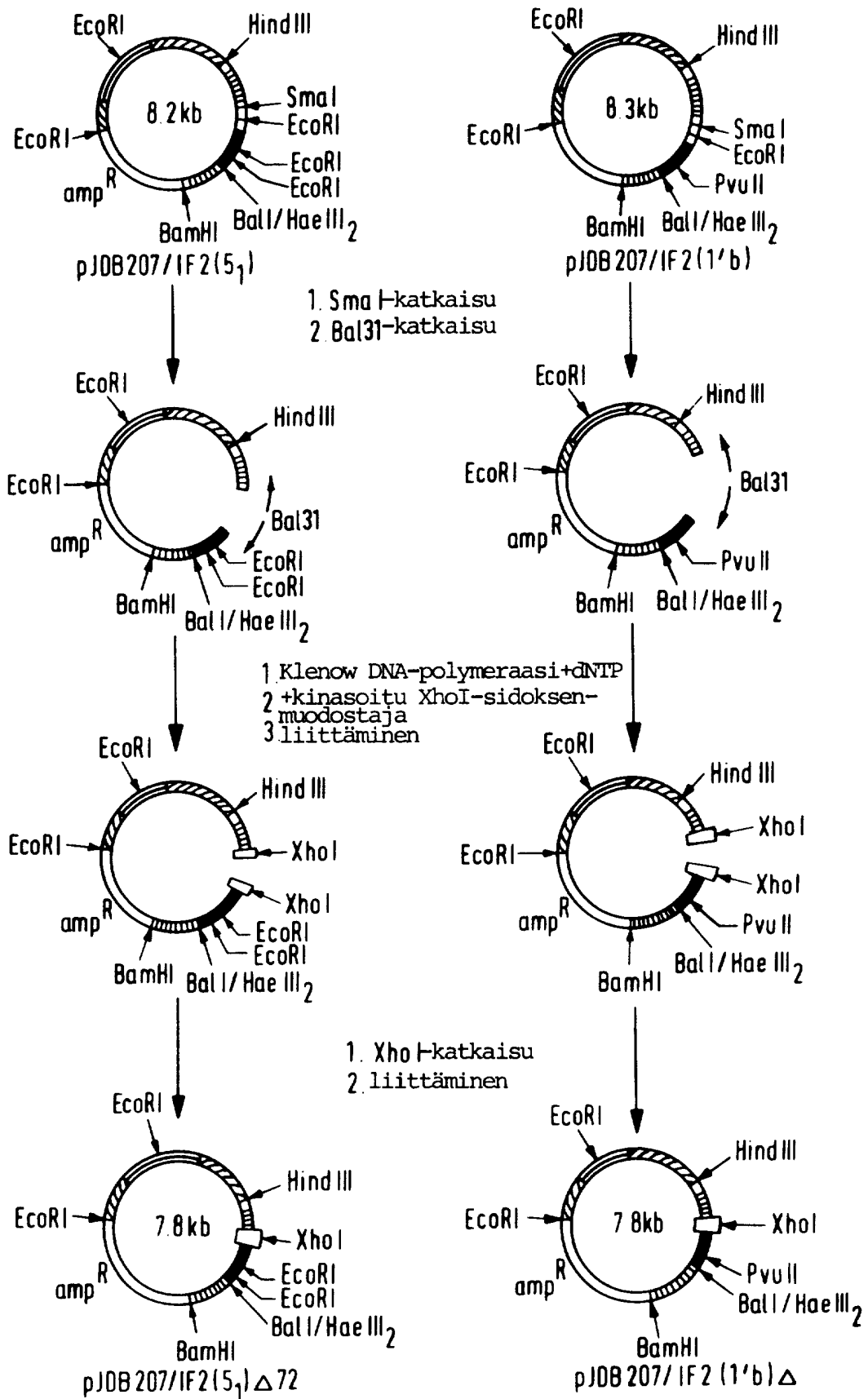
**Fig. 26**

Plasmidin pJDB/PHO5/HBV $\Delta$ 14 ja pJDB207/PHO5/HBV $\Delta$ 14t rakentaminen



**Fig. 21**

Plasmidien pJDB207/IF2(1'b) $\Delta$  ja pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>) $\Delta$ 72 rakentaminen

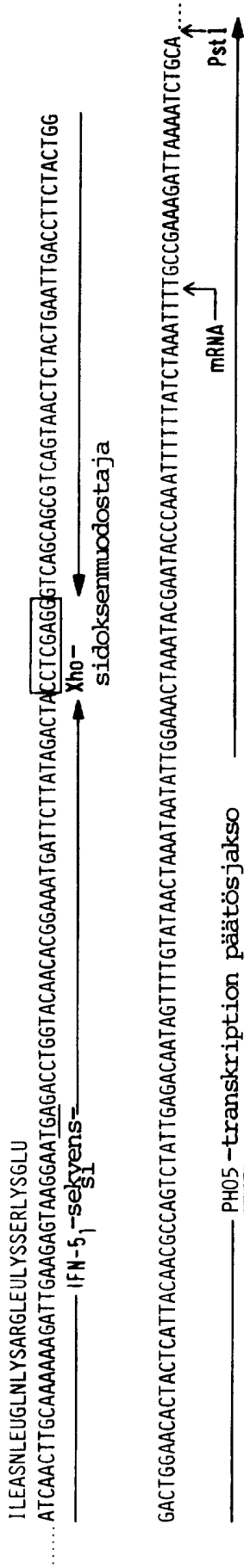




# Fig. 2B

Kloonien pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ72 ja pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ82 nukleotidisekvenssit uuden liitoskohdan ympärillä (XhoI-sidoksenmuodostaja), joka on 3'-pään luetaan osallistumattoman IFN-5<sub>1</sub>-alueen ja PHO5:n transkription päätösjakson välissä

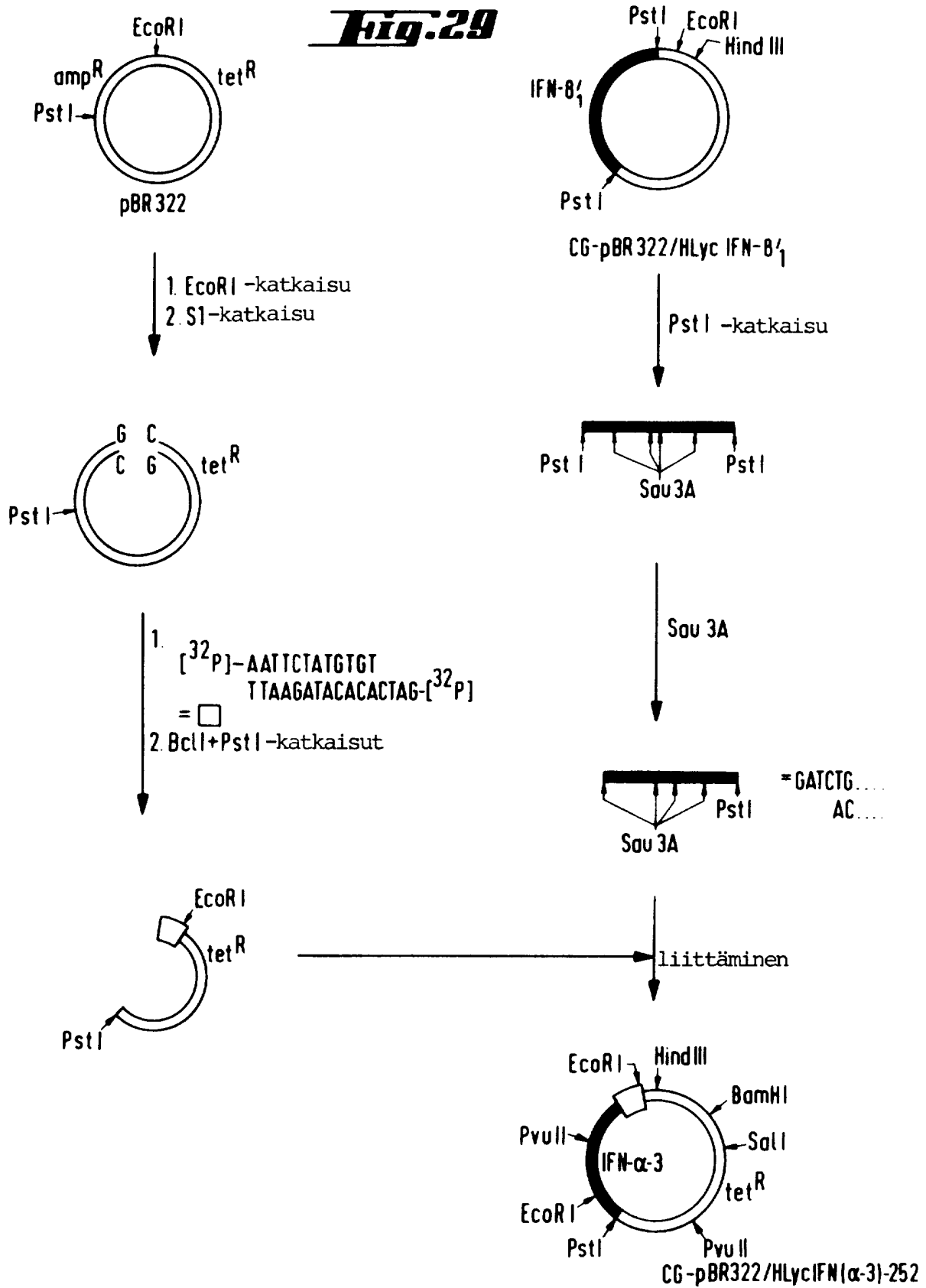
a) pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ72:



b) pJDB207/IF2(5<sub>1</sub>)Δ82:



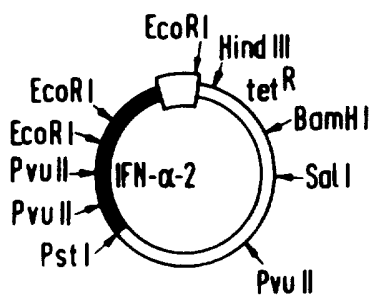
Yhdistelmäplasmidin CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -3)-252 rakentaminen, jossa on siirrettävä ihmisen lymfoblastoidi-IFN- $\alpha$ -3-cDNA-liittäminen



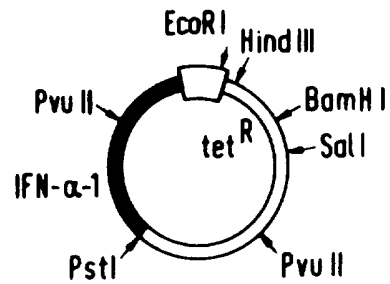
**Fig.30**

Yhdistelmäplasmidien CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -2)-261 ja  
CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258 rakenne

---

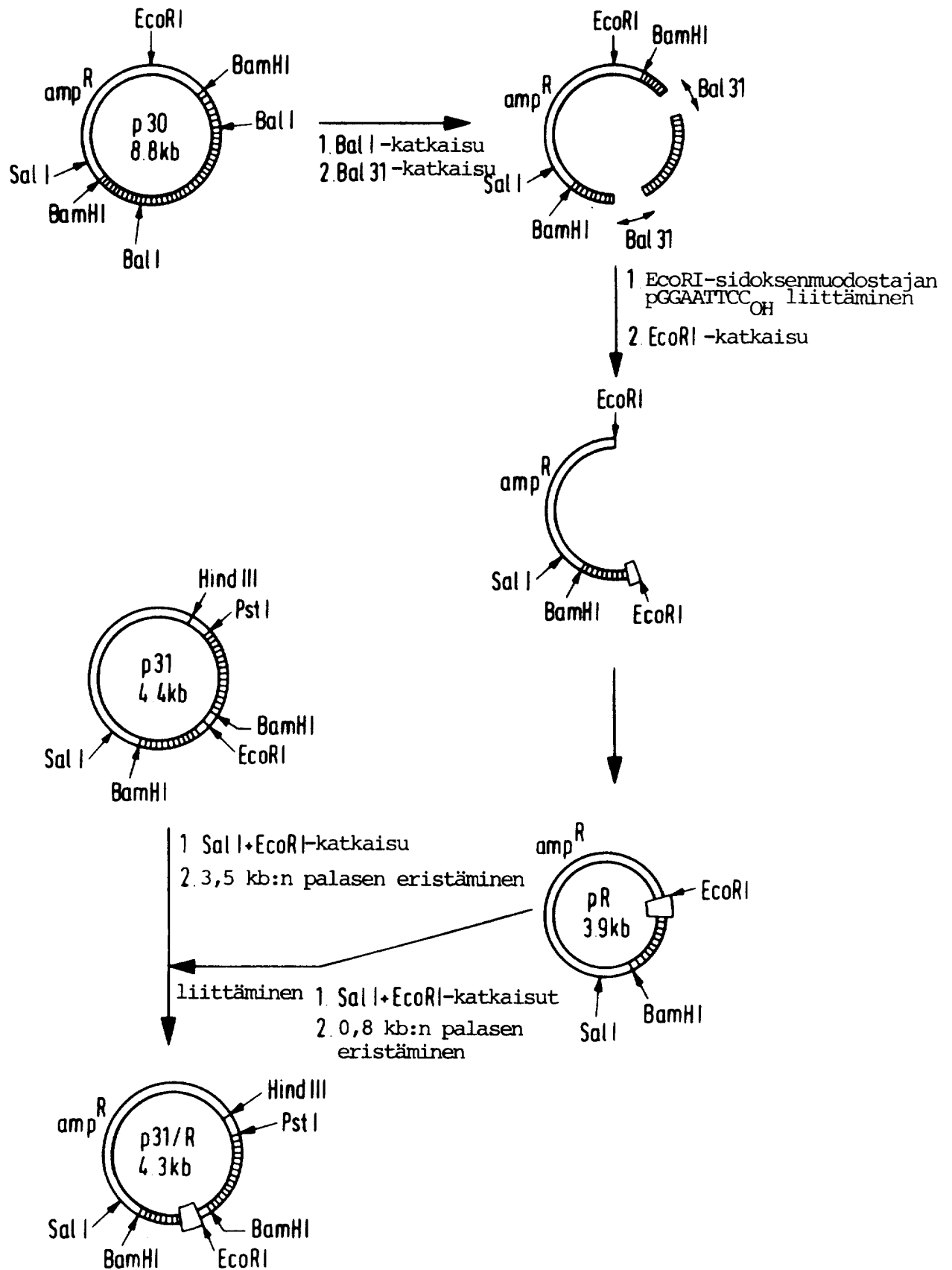


CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -2)-261



CG-pBR322/HLycIFN( $\alpha$ -1)-258

**Fig. 31** PHO5-signaalisekvenssin poisto ilmentämis-  
plasmidista





***Fig. 33***

BamHI-EcoRI-katkaisupalasen nukleotidisekvenssi, jossa  
on PHO5/R-promoterialue

---

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

ATGTGCGCTGCTTAAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

GGTAAAAGGTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAATTAGCA

CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTT

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGGG

***Fig. 34***

BamHI-EcoRI-katkaisupalasen nukleotidisekvenssi,  
jossa on PHO5/Y-promoterialue-----

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

GGTAAAAGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA

CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGTT

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

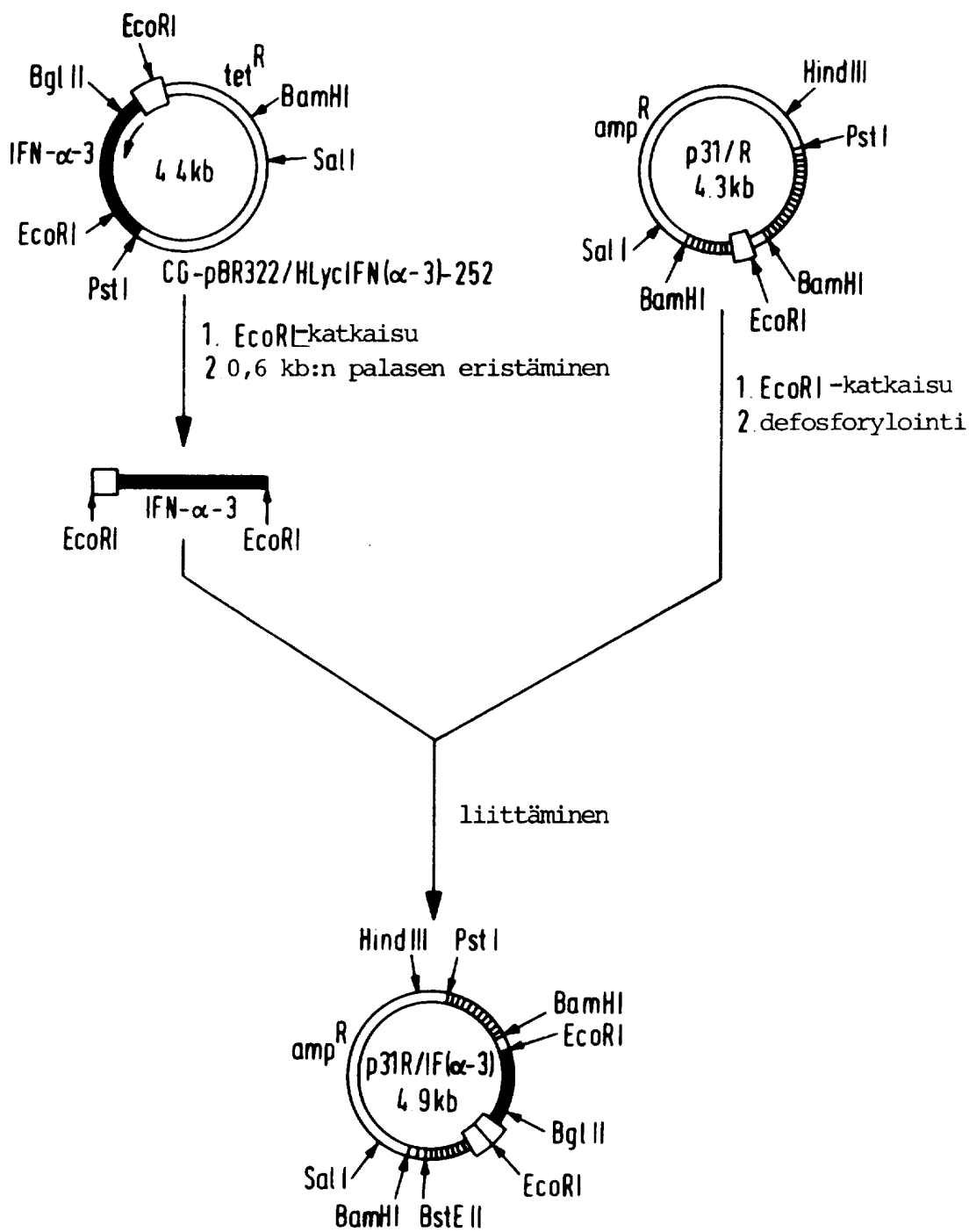
CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG

**Fig. 35**

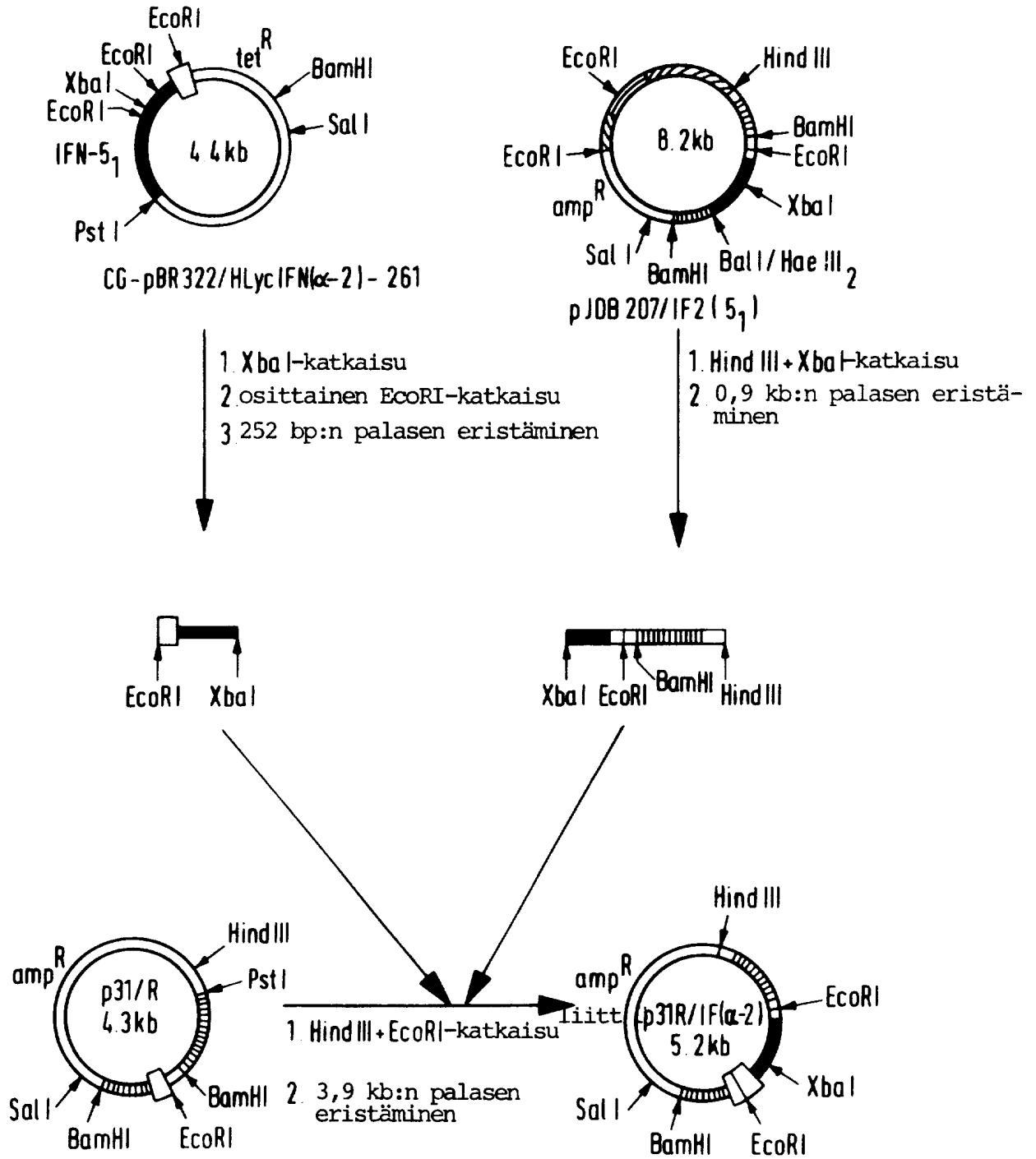
Lymfoblastoidi-IFN- $\alpha$ -3-DNA:n liittäminen plasmidiin p31/R





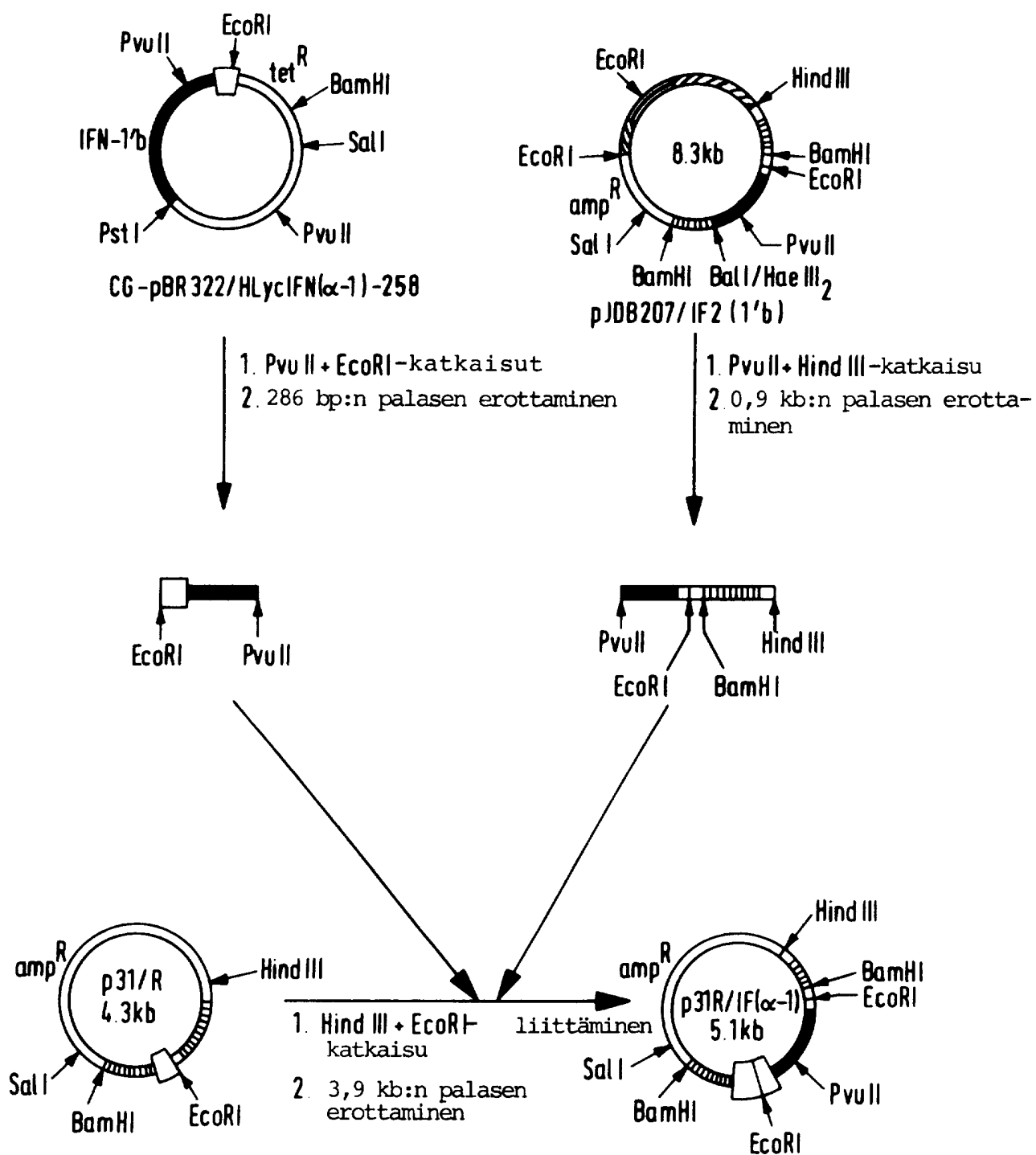
**Fig. 36**

Lymfoblastoidi-IFN- $\alpha$ -2-DNA:n liittäminen plasmidiin p31/R



**Fig. 37**

Lymfoblastoidi-IFN- $\alpha$ -1-DNA:n liittämisen plasmidiin p31/R



**Fig. 38**Ilmentämisplasmidin pJDB207R/IF( $\alpha$ -3) rakentaminen