
Octrooiraad



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8801805**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **DNA sequencing methode en daarvoor bruikbare primer.**
- ⑤1 Int.Cl⁸: G01N 33/48, C12N 15/00, C07H 21/00.
- ⑦1 Aanvrager: Rijksuniversiteit te Leiden te Leiden.
- ⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octroobureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8801805.
- ②2 Ingediend 15 juli 1988.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 februari 1990.

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

DNA sequencing methode en daarvoor bruikbare primer.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van DNA volgens de didesoxy sequencing methode.

De meest gebruikte methode voor het bepalen van
5 de basenvolgorde in DNA (sequenzen) is tegenwoordig
de zg. M13-didesoxymethode, ontwikkeld door Messing
(1) en Sanger (2). Bij deze methode wordt het te onderzoeken
DNA met behulp van restrictie-enzymen in stukken geknipt,
die elk afzonderlijk worden gekloneerd in de RF-vorm
10 van bacteriofaag M13-DNA.

Dit faag-DNA is hiertoe speciaal geschikt gemaakt
door het aanbrengen van een "multiple-cloning-site"
(MCS), een stukje DNA, waarin herkenningsplaatsen voor
diverse restrictie-enzymen voorkomen (3). Het faag-DNA,
15 met daarin nu het te onderzoeken DNA, wordt door middel
van transformatie ingebracht in een geschikte stam
van Escherichia coli. In de bacteriecel vindt vervolgens
vermeerdering van dit DNA plaats, zowel in de dubbelstrengs-
vorm (RF-DNA), als in de enkelstrengsvorm. Deze enkel-
20 strengsvorm wordt in nieuwe virusdeeltjes verpakt,
die continu door de bacterie worden uitgescheiden.
Na isolatie van deze virusdeeltjes kan het DNA daaruit
worden gezuiverd, waarna het geschikt is om als matrijs
(template) te dienen in de eigenlijke didesoxy-sequencing-
25 methode volgens Sanger (2). In het kort komt deze methode
erop neer, dat in vier verschillende reaktievaatjes
vier komplementaire kopieën van het te onderzoeken
enkelstrengs-DNA worden gemaakt, waarbij de reactieomstan-
digheden zó zijn gekozen, dat in elk van de vier vaatjes
30 de nieuw gesynthetiseerde keten stopt bij één van de
vier nucleotiden (A, G, C of T), maar op willekeurige
plaatsen in de keten. Zo ontstaat in elk vaatje een
mengsel van ketens, van kort tot lang, die elk een
getrouwe afdruk vormen van het matrijs-DNA.

Door nu deze fragmenten, die met ^{32}P of ^{35}S zijn gelabeld, te scheiden op een polyacrylamidegel met een hoog oplossend vermogen, kan na autoradiografie de basenvolgorde van het DNA eenvoudig worden afgelezen.

5 Overigens zijn er ook procedures beschreven voor het sequencen van dubbelstrengs DNA (14), waarbij de kloneringsstap in M13 achterwege kan worden gelaten.

In alle gevallen is echter voor de reactie een startfragment (primer) nodig, waaraan de nieuw te synthetiseren keten wordt vastgemaakt. Door de juiste keuze van dit startfragment kan het begin van de sequencing-reaktie éénduidig worden vastgelegd.

Bij de bovenbeschreven M13-methode wordt als startfragment doorgaans een synthetisch oligonucleotide van 17 opeenvolgende nucleotiden gebruikt, dat komplementair is aan een stukje DNA, dat op enige afstand vóór de multiple-cloning-site gelegen is. Afhankelijk van de toegepaste restrictie-enzymen varieert de afstand van 10 tot 60 basen.

20 Naast veel positieve eigenschappen heeft het bovenomschreven systeem ook wat zwakkere kanten:

- Het kloneren van restrictiefragmenten veronderstelt de aanwezigheid van geschikte restrictieplaatsen in het te onderzoeken DNA op een onderlinge afstand die in één sequencing-reaktie overspannen kan worden (200 à 300 basen). In de praktijk is dat eerder uitzondering dan regel. Als het al voorkomt, dan betreft het vaak exotische restrictie-enzymen. Behalve dat deze enzymen vaak erg duur zijn, leveren zij dan ook nog fragmenten op die niet, dan na allerlei kunstgrepen in M13 gekloneerd kunnen worden.
- Om er zeker van te zijn, dat bij het kloneren van restrictiefragmenten geen heel kleine fragmenten over het hoofd worden gezien, is het noodzakelijk om over restrictieplaatsen heen te lezen. Hiervoor is dus een tweede set restrictiefragmenten nodig,

die de bestaande fragmenten overlapt.

- In de sequencing-reactie wordt altijd eerst een stukje M13 -DNA gelezen. Afhankelijk van het voor het kloneren gebruikte restrictie-enzym varieert de lengte van dit "ballast"-DNA van 10 tot 60 nucleotiden. Hierdoor wordt de effectief gelezen lengte met zo'n zelfde aantal basen ingekort.
- Het is gebruikelijk om van het te onderzoeken DNA beide strengen te lezen, om de kans op vergissingen zo klein mogelijk te maken. Als het fragment niet te lang is kan de andere streng worden gekloneerd in een verwante M13-faag, waarin de multiple-cloning-site spiegelbeeldig is gelegen ten opzichte van de eerste faag. Dit vereist weer manipulatie van het DNA, opnieuw transformeren, faag opkweken, DNA isoleren enz.

De uitvinding heeft tot doel om een werkwijze ter beschikking te stellen welke deze nadelen van de bekende didesoxy sequencing methoden opheft.

- Dit doel wordt volgens de uitvinding gerealiseerd in een werkwijze voor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van DNA volgens de didesoxy sequencing methode, welke gekenmerkt wordt doordat als primer een oligonucleotide uit ten minste 10 nucleotiden wordt gebruikt dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element van een F-plasmide, en dat als matrijs een restrictiefragment wordt gebruikt dat ten minste een deel van het te sequencen DNA alsmede een in essentie daaraan aangrenzend uiteinde van het γ - δ element omvat, welk restrictiefragment is verkregen door, uitgaande van een uitgangsplasmide dat het te sequencen DNA bevat, middels transformatie van bacteriën die een F-plasmide bevatten, gevolgd door conjugatie met F⁻-bacteriën, een aantal verschillende recombinante plasmiden te construeren die elk een γ - δ insertie bevatten, door middel van restrictie-enzym analyse de plaats en oriëntatie van de γ - δ insertie te bepalen, en van een of meer van de recombinante plasmiden

.. 801805

een restrictiefragment omvattende het γ -uiteinde en
in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, en/of
een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en
in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, te
5 isoleren.

Meer in het bijzonder wordt het gestelde doel
volgens de uitvinding gerealiseerd in een werkwijze
voor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van DNA
volgens de M13-didesoxy sequencing methode, welke gekenmerkt
10 wordt doordat als primer een oligonucleotide uit ten
minste 10 nucleotiden wordt gebruikt dat complementair
is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element van een
F-plasmide, en dat het in M13 DNA ingevoegde restrictie-
fragment ten minste een deel van het te sequencen DNA
15 alsmede een in essentie daaraan aangrenzend uiteinde
van het γ - δ element omvat, welk restrictiefragment is
verkregen door, uitgaande van een uitgangsplasmide
dat het te sequencen DNA bevat, middels transformatie
van bacteriën die een F-plasmide bevatten, gevolgd
20 door conjugatie met F^- -bacteriën, een aantal verschillende
recombinante plasmiden te construeren die elk een γ - δ
insertie bevatten, door middel van restrictie-enzym
analyse de plaats en oriëntatie van de γ - δ insertie te
bepalen, en van een of meer van de recombinante plasmiden
25 een restrictiefragment, omvattende het γ -uiteinde en
in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, en/of
een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en
in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, te
isoleren.

30 Het γ - δ element is een stuk DNA van 5,7 kbp, dat
deel uitmaakt van een F-plasmide. Zo'n F-plasmide is
een groot, circulair, dubbelstrengs DNA-molecuul, dat
onafhankelijk van het chromosoom in bacteriën voorkomt
en zich daarin zelfstandig kan handhaven. Bovendien
35 bevat een F-plasmide alle informatie die nodig is,
om zichzelf over te dragen naar andere (F^-)bacteriën,

door middel van conjugatie (4).

Tijdens deze conjugatie kunnen ook andere in de cel aanwezige plasmiden, die zelf niet overdraagbaar zijn, worden gemobiliseerd, waardoor ook zij worden overgedragen.

- 5 Dergelijke gemobiliseerde plasmiden blijken na de overdracht alle verrijkt te zijn met een stukje DNA afkomstig van het F-plasmide, namelijk het γ - δ element. Dit element gedraagt zich als een transposon: het heeft de eigenschap om op willekeurige plaatsen in het ontvangende DNA
- 10 te integreren, maar wel slechts één keer per molecuul.

De beide uiteinden van het γ - δ element vormen zogenaamde "inverted repeats" van 35 à 40 baseparen. Zoals de naam aangeeft is de volgorde van deze uiteinden identiek, maar van tegengestelde polariteit (5).

- 15 Nabij de uiteinden van het γ - δ element bevinden zich herkenningsplaatsen voor restrictie-enzymen, die ook voorkomen in de multiple-cloning site van M13-DNA (zie fig. 1). Deze eigenschappen worden volgens de uitvinding benut bij het sequencen van DNA (zie fig. 2). Daartoe
- 20 brengt men een plasmide met daarin het te onderzoeken DNA in een Escherichia coli stam, waarin zich een F-plasmide bevindt. Door middel van conjugatie wordt het plasmide overgedragen op een andere stam, waardoor een groot aantal kloons wordt verkregen, die alle het te onderzoeken
- 25 plasmide bevatten met elk een γ - δ insertie op een andere plaats. Door het plasmide-DNA te isoleren en te knippen met restrictie-enzymen kan aan de hand van een vergelijking met de restrictieprofielen van het uitgangsplasmide de plaats en oriëntatie van de insertie worden bepaald.
- 30 Aan de hand van deze informatie wordt een aantal insertie-kloons geselecteerd, die het te sequencen DNA overspannen. Veelal zal het hierbij gaan om kloons waarin de γ - δ insertie binnen het gebied van het te sequencen DNA is gelegen. De bekende restrictieplaatsen in het γ - δ element worden
- 35 nu gebruikt om fragmenten te isoleren, die gekloneerd worden in M13. Vervolgens wordt op deze matrijzen de

dideoxysequencing techniek toegepast, waarbij als primer een synthetisch oligonucleotide wordt gebruikt, dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element. Omdat deze volgorde direct grenst aan de insertieplaats wordt direct het onbekende DNA ingelezen, 5 zonder enig "ballast"-DNA. Wanneer, zoals meestal het geval zal zijn, de insertie in het te onderzoeken DNA ligt, kunnen beide uiteinden worden benut voor de sequencing-reacties. Vanwege het karakter van de "inverted repeats" 10 kan daarbij hetzelfde oligonucleotide als primer worden gebruikt.

Het als primer te gebruiken oligonucleotide, waarover de uitvinding zich ook als zodanig uitstrekt, dient een lengte van tenminste 10, bij voorkeur ten minste 15 nucleotiden te hebben. 15 Een oligonucleotide met de formule 5'-TTCCATTGGCCCTCAAACCC-3' is als primer zeer geschikt gebleken. Uiteraard mag ook een oligonucleotide uit minder resp. meer dan 20 nucleotiden worden gebruikt, mits het maar voldoet aan de eisen van een minimumlengte van 10 nucleotiden 20 en complementariteit aan beide 5'-uiteinden van het γ - δ element. Methoden voor chemische synthese van oligonucleotiden zijn aan de deskundige bekend.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat van 25 een recombinant plasmide zowel een restrictiefragment, omvattende het γ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, als een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, worden geïsoleerd en een van beide restrictiefragmenten in M13-mp18-RF-DNA, en het andere restrictiefragment in M13-mp19-RF-DNA wordt gekloneerd. 30

In plaats van de vectoren M13 mp18 en M13 mp19 kunnen ook andere paren van vectoren met een multiple-cloning-site in tegengestelde oriëntatie worden toegepast. 35 Geschikte vectoren zijn in de handel verkrijgbaar.

Uit praktische overwegingen kan het aantrekkelijk

zijn om de kloneringsstap in M13 achterwege te laten. Men zou dan de restrictiefragmenten met òf het γ -, òf het δ -uiteinde rechtstreeks uit de gel kunnen isoleren en sequencen. Op het ogenblik gaat echter de voorkeur uit naar de bovenbeschreven procedure, inclusief het kloneren in M13.

Met het hier beschreven gebruik van γ - δ inserties voor het construeren van geschikte matrijzen voor het sequencen van DNA volgens de didesoxymethode volgens Sanger is een nieuwe dimensie aan de reeds bestaande techniek toegevoegd. De afhankelijkheid van geschikte restrictieplaatsen in het te sequencen DNA komt hiermee te vervallen. De restrictieplaatsen worden als het ware door de insertie gecreëerd. Hierdoor is constructie van geschikte matrijzen sterk vereenvoudigd. Het gebruik van de uiteinden van de insertie als startplaats voor het sequencen verhoogt bovendien de efficiëntie van de methode.

Het nut van γ - δ inserties als startplaatsen voor het sequencen van DNA staat of valt met de willekeur waarmee zo'n insertie plaats vindt. De tot nog toe behaalde resultaten wijzen op een grote mate van willekeur en daarmee op algemene bruikbaarheid van de hier beschreven uitvinding.

De uitvinding zal nu aan de hand van de figuurbeschrijving en een voorbeeld nader worden toegelicht.

Figuurbeschrijving

Fig. 1. Fysische kaart van het γ - δ element. De driehoekjes geven de "inverted repeats" (γ resp. δ) aan de beide uiteinden weer. De kaart is samengesteld aan de hand van gegevens van Guyer (4), Goto e.m. (5) en eigen resultaten.

Fig. 2. Schematische weergave van de gevolgde procedure: Van het donkere gedeelte van het recombinantplasmide moet de basevolgorde worden bepaald. Hiertoe wordt het getransformeerd(1) naar een bacterie met een F-plasmide. De spontane γ - δ inserties (2) worden

geïsoleerd na conjugatie (3). Na plasmide-isolatie (4) wordt de positie van de γ - δ insertie vastgesteld met behulp van restrictie-enzymen (5). Geschikte restrictiefragmenten worden gezuiverd en, al dan niet gekloneerd in bacteriofaag M13, gesequenced volgens de didesoxymethode (6).

Fig. 3. Fysische kaart van het gekloneerde 2,8 kb HindIII-ClaI-fragment. Het gearceerde deel is het interessegebied. De driehoekjes geven de plaats en de oriëntatie van de γ - δ inserties weer. (\blacktriangle : $\gamma \rightarrow \delta$; \blacktriangledown : $\delta \rightarrow \gamma$).

Fig. 4. Schematische voorstelling van de gevolgde sequencing-strategie voor het gearceerde gebied.

\longleftrightarrow : gesequenced na klonering van KpnI-fragmenten in M13, zonder tussenkomst van γ - δ inserties.

\longleftrightarrow : gesequenced na γ - δ -inserties, en klonering van geschikte restrictiefragmenten in M13.

Fig. 5. Schematische weergave van de klonerings- en sequencingprocedure vanuit één van de γ - δ inserties. Het aan het δ -uiteinde grenzende gebied werd sequenced, na klonering van het betreffende SstI-KpnI-fragment in M13 mpl9; het aan het γ -uiteinde grenzende gebied na klonering van het PstI-KpnI-fragment in M13 mpl8. De gestippelde lijn geeft γ - δ DNA aan. De startplaats van de sequencingreactie aan de beide uiteinden is aangegeven met \blacktriangle p (= primer).

Let op het schaalverschil tussen de diverse elementen.

VOORBEELD

30 A. Inleiding

Een bestaand onderzoek is gericht op een stuk DNA van Enterobacter cloacae, dat gekloneerd werd in het vectorplasmide pACYC184. Transformanten met het recombinant-plasmide, pJS04 genaamd, blijken verminderd gevoelig te zijn voor beta-lactam-antibiotica. Deze ongevoeligheid gaat gepaard met de produktie van een

20 kDa-eiwit, waarvoor de informatie op het gekloneerde DNA-fragment is gelegen (6). Om de aard van het 20 kDa-eiwit na te gaan werd besloten om het gekloneerde gen te sequencen. Het bleek echter onmogelijk om met de bekende restrictieplaatsen het gekloneerde fragment in zijn geheel te ontsluiten voor de M13-dideoxysequencing-methode.

Hier wordt beschreven hoe γ - δ insertie mutanten werden geconstrueerd en werden gebruikt voor het sequencen van het gen.

B. Materiaal en Methoden

(i) - Bacteriestammen:

-Escherichia coli CE 1304: F'(lac⁺); Str^R, Rif^R

Referentie: De Geus e.m., 1983 (7)

-Escherichia coli W 3110: F⁻, Nal^R, Rif^R

Referentie: Campbell e.m., 1978 (8)

-Escherichia coli KMBL 5071: F'(lacI^q, Z_{M15}, pro); ara, Δ pro-lac, thi

Referentie: Brouwer, 1988 (9)

(ii) Plasmide:

pJS04: pACYC184:: 2,8 kb HindIII-ClaI fragment; Cam^R, Cpt^R

Referentie: Stoorvogel e.m., 1987 (6)

25 (iii) Bacteriofagen:

M13mp18 en M13mp19; bevatten de multiple-cloning site in tegengestelde oriëntatie.

Referentie: Yanisch-Perron e.m., 1985 (3)

(iv) Transformatie:

30 De transformatie van competente cellen van Escherichia coli CE1304 door het plasmide pJS04 werd uitgevoerd zoals beschreven in Maniatis e.m. (10). Transformanten werden geselecteerd op "Brain-Heart Infusion" agar (Oxoid, CM 375), waarin chlooramfenicol (34 mg.l⁻¹).

35 (v) Conjugatie

Conjugatieve overdracht van plasmide-DNA van

. 8801805

de Escherichia coli-stam CE 1304 naar de stam W3110 gebeurde in suspensie, zoals beschreven in Miller (11). Exconjuganten werden geselecteerd op BHI-agar, waarin nalidixinezuur (100 mg.l^{-1}) en chlooramfenicol (34 mg.l^{-1}).

5

(vi) DNA-isolatie

Plasmide-DNA en M13-RF-DNA werd geïsoleerd volgens de methode van Birnboim en Doly (12). Enkelstrengs-M13-DNA werd uit gezuiverde virusdeeltjes geïsoleerd zoals beschreven in Davis e.m. (13).

10

(vii) Isolatie en klonering van restrictiefragmenten:

Restrictieënzymen werden toegepast volgens voorschrift van de leveranciers (Boehringer Mannheim; Gibco-BRL). Fragmenten werden electroforetisch gescheiden in agarosegels en daaruit gezuiverd met behulp van Gene-cleanTM, volgens voorschrift van de fabrikant (BIO-101). Ligatie van restrictiefragmenten in de "multiple-cloning site" van M13-RF-DNA gebeurde met het enzym T4-DNA-ligase volgens voorschrift van de leverancier (Boehringer Mannheim).

15

20

(viii) Didesoxysequencing:

De didesoxysequencingprocedure werd uitgevoerd volgens het standaard voorschrift van Sanger (2), zoals beschreven in Davis e.m. (13), met uitzondering van de gebruikte primer. Hiervoor werd een oligonucleotide ($n=20$) gebruikt, dat komplementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element. De volgorde van het oligonucleotide, dat door chemische synthese werd verkregen is als volgt:

25

30

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

C. Resultaten

Het te onderzoeken plasmide pJS04 werd door transformatie ingebracht in de Escherichia coli stam CE1304, die zelf het F-plasmide bevat. Door de op pJS04 gelegen

35

. 880 180

resistentie tegen chlooramfenicol konden transformanten worden geïsoleerd op platen met dit antibioticum.

Het plasmide pJS04 is van nature niet zelfoverdraagbaar en ook niet mobiliseerbaar. Als het na conjugatie
5 toch blijkt te zijn overgegaan, is dat te danken aan het verwerven van het γ - δ element, afkomstig van het F-plasmide.

Conjugatie van de getransformeerde stam CE 1304 met de stam W 3110 gevolgd door selectie van exconjuganten op platen met nalidixinezuur (waardoor alleen
10 W 3110 kan groeien) en chlooramfenicol (voor het plasmide pJS04) leverde inderdaad een groot aantal isolaten op, die alle het plasmide pJS04 bleken te bevatten met een γ - δ insertie. Om de plaats van
15 de verschillende inserties vast te stellen werd plasmide-DNA geïsoleerd en geanalyseerd met behulp van de restrictieënzymen EcoRI, HindIII en BamHI. Door de restrictieprofielen te vergelijken met die van pJS04 zelf, kon de locatie van de insertie en
20 de oriëntatie daarvan nauwkeurig worden bepaald. Zoals uit de insertiekaart (zie fig. 3) blijkt, liggen de inserties over het gehele fragment verspreid. Het gebied waarvoor speciale interesse bestaat (geërcerde deel van de tekening) beslaat ongeveer 1.000
25 basenparen in het midden van het gekloneerde fragment. Een deel van het fragment is door de KpnI-knipplaats toegankelijk om te sequencen na klonering in M13-RF-DNA. Het overgrote deel is echter niet toegankelijk. In dit gebied werden γ - δ insertiemutanten geselecteerd,
30 zoals aangegeven in fig. 4.

Ter illustratie van de verdere gang van zaken wordt de procedure voor één van de inserties in detail beschreven.

Zoals aangegeven in fig. 5 ligt deze insertie midden
35 in het onbekende gebied en is gewenst dat beide flankerende stukken worden gesequenced. Het linkerdeel

. 8801805

grenst aan het δ -uiteinde. Van dit stuk werd een SstI-KpnI fragment geïsoleerd, dat gekloneerd werd in de multiple-cloning site van M13-mp19-RF-DNA. Het rechtergebied grenst aan het γ -uiteinde en werd gekloneerd als een PstI-KpnI-fragment in M13-mp18-RF-DNA. De beide gerecombineerde RF-DNAs werden door transformatie overgebracht naar Escherichia coli KMBL 5071, een stam die speciaal geschikt is voor het propageren van de M13-bacteriofagen mp18 en mp19, en afgeleiden daarvan. Na zuivering van de faagdeeltjes werd hieruit enkelstrengs-DNA geïsoleerd, dat gesequenced werd met de didesoxymethode, waarbij het eerder genoemde 20n-oligonucleotide als primer werd gebruikt. Vanaf zowel het γ -uiteinde, als vanaf het δ -uiteinde kon aldus de basenvolgorde in het onbekende DNA worden opgehelderd.

REFERENTIES

1. Messing, J.; Meth.Enzymol. 101, 20, 1983.
2. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.; Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74, 5463, 1977.
3. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.; Gene 33, 103, 1985.
4. Guyer, M.S.; J. Mol. Biol. 126, 347, 1978.
5. Goto, N. Mochizuki, A., Inagaki, Y., Horiuchi, S., Tanaka, T. & Nakaya, R.; J.Bacteriol. 169, 4388, 1987.
6. Stoorvogel, J., van Bussel, M.J.A.W.M. & van de Klundert, J.A.M.; FEMS Microbiol. Lett. 48, 277, 1987.
7. De Geus, P., Van Die, I., Bergmans, H., Tommassen, J., De Haas, G.,; Mol.Gen.Genet. 190, 150, 1983.
8. Campbell, J., Richardson, C.C. & Studier, F.W.; Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75, 2276, 1978.
9. Brouwer, J.; Proefschrift Leiden, 1988.
10. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J.: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor

8801805

- Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. , 1982.
11. Miller, J.H.: Experiments in molecular genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,
N.Y., 1972.
 - 5 12. Birnboim, H.C. & Doly, J.; Nucleic Acids Res. 7,
1513, 1979.
 13. Davis, L.G., Dibner, M.D., De Battey, J.F.: Basic
methods in molecular biology. Elsevier, New York,
Amsterdam, London, 1986.
 - 10 14. Smith, A.J.H.; Nucleic Acids Res. 6, 831, 1979.

. 8801805

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van DNA volgens de didesoxy sequencing methode, met het kenmerk, dat als primer een oligonucleotide uit ten minste 10 nucleotiden wordt gebruikt dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element van een F-plasmide, en dat als matrijs een restrictiefragment wordt gebruikt dat ten minste een deel van het te sequencen DNA alsmede een in essentie daaraan aangrenzend uiteinde van het γ - δ element omvat, welk restrictiefragment is verkregen door, uitgaande van een uitgangsplasmide dat het te sequencen DNA bevat, middels transformatie van bacteriën die een F-plasmide bevatten, gevolgd door conjugatie met F⁻-bacteriën, een aantal verschillende recombinante plasmiden te construeren die elk een γ - δ insertie bevatten, door middel van restrictie-enzymanalyse de plaats en oriëntatie van de γ - δ insertie te bepalen, en van een of meer van de recombinante plasmiden een restrictiefragment, omvattende het γ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, en/of een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, te isoleren.

2. Werkwijze voor het bepalen van de nucleotidenvolgorde van DNA volgens de M13-didesoxy sequencing methode, met het kenmerk, dat als primer een oligonucleotide uit ten minste 10 nucleotiden wordt gebruikt dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element van een F-plasmide, en dat het in M13 DNA ingevoegde restrictiefragment ten minste een deel van het te sequencen DNA alsmede een in essentie daaraan aangrenzend uiteinde van het γ - δ element omvat, welk restrictiefragment is verkregen door, uitgaande van een uitgangsplasmide dat het

te sequencen DNA bevat, middels transformatie van bacteriën die een F-plasmide bevatten, gevolgd door conjugatie met F⁻-bacteriën, een aantal verschillende recombinante plasmiden te construeren die elk een $\gamma\delta$ insertie bevatten, door middel van restrictie-enzymanalyse de plaats en oriëntatie van de $\gamma\delta$ insertie te bepalen, en van een of meer van de recombinante plasmiden een restrictiefragment, omvattende het γ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, en/of een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, te isoleren.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat van een recombinant plasmide zowel een restrictiefragment, omvattende het γ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, als een restrictiefragment, omvattende het δ -uiteinde en in essentie daaraan aangrenzend te sequencen DNA, worden geïsoleerd en een van beide restrictiefragmenten in M13-mp18-RF-DNA, en het andere restrictiefragment in M13-mp19-RF-DNA wordt gekloneerd.

4. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-3, met het kenmerk, dat als primer een oligonucleotide wordt gebruikt dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het $\gamma - \delta$ element van een F-plasmide en een lengte heeft van ten minste 15 nucleotiden.

5. Werkwijze volgens een van de conclusies 1-4, met het kenmerk, dat als primer een oligonucleotide met de formule

5'-TTCCATTGGCCCTCAAACCC-3' wordt gebruikt.

6. Oligonucleotide uit ten minste 10 nucleotiden, dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het $\gamma - \delta$ element van een F-plasmide.

7. Oligonucleotide uit ten minste 15 nucleotiden,

dat complementair is aan de beide 5'-uiteinden van het γ - δ element van een F-plasmide.

8. Oligonucleotide met de formule
5'-TTCCATTGGCCCTCAAACCC-3'.

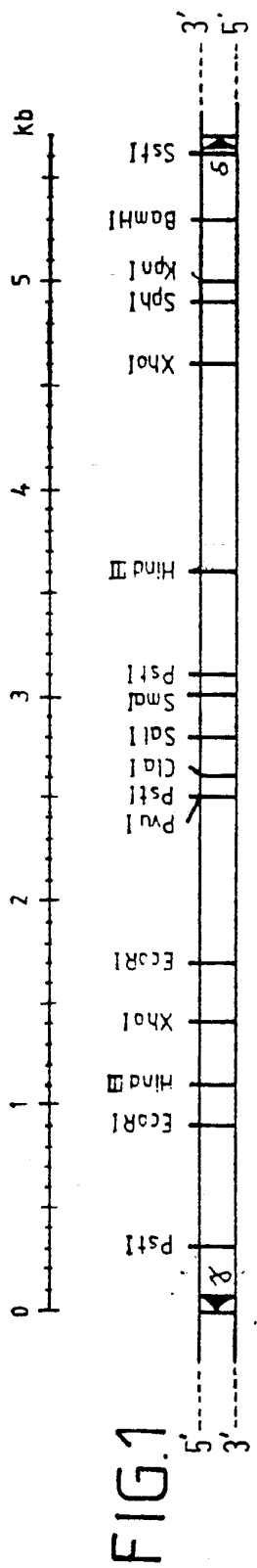


FIG. 1

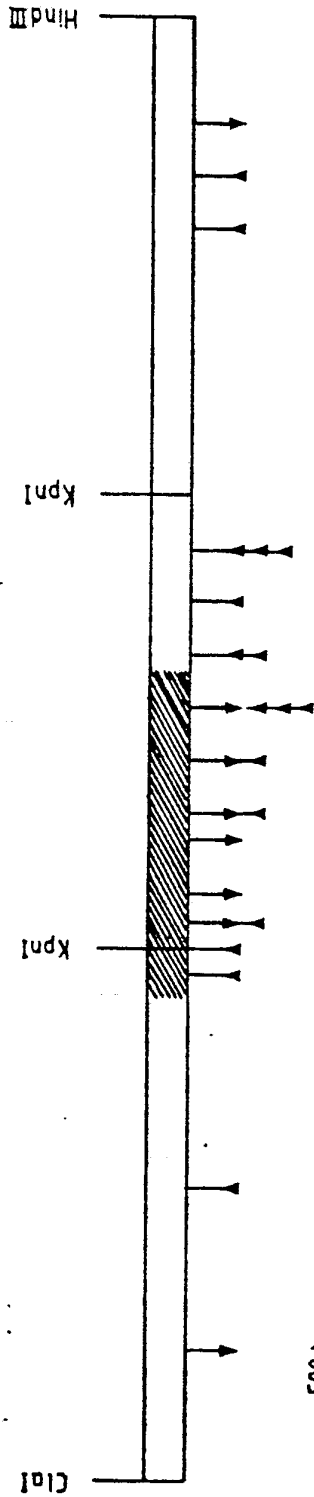


FIG. 3

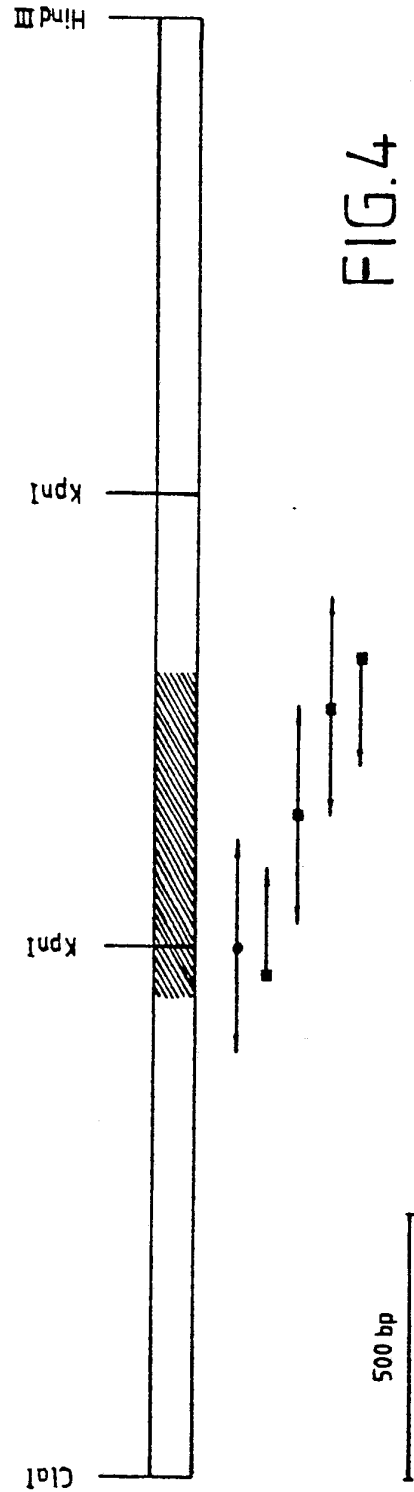
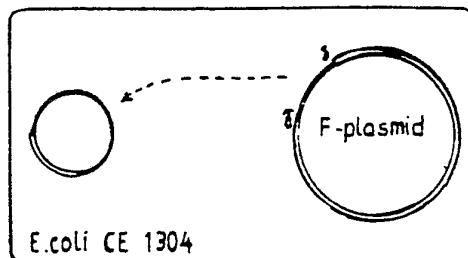
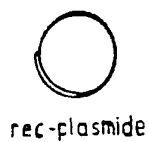


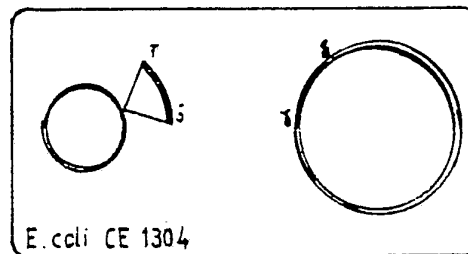
FIG. 4

. 880 1805

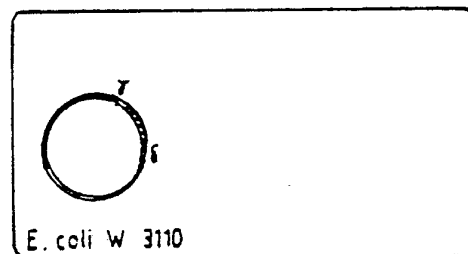
1 TRANSFORMATIE



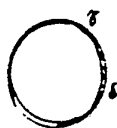
2 TRANSPOSITIE



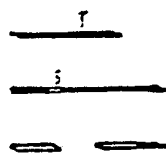
3 CONJUGATIE



4 PLASMIDE ISOLATIE



5. RESTRICTIE



6. SEQUENCING

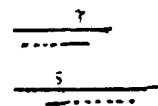
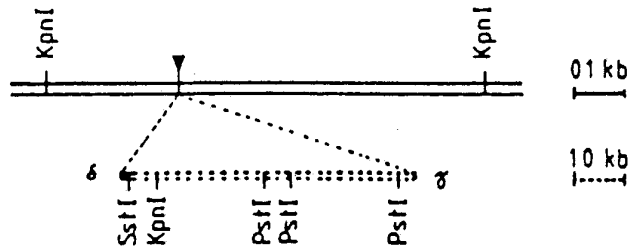


FIG.2

8801805



Cloning VAN DE δ -terminus:

Cloning VAN DE σ -terminus:

- x SstI, x KpnI
- in M13mp19

- x PstI, x KpnI
- in M13mp18

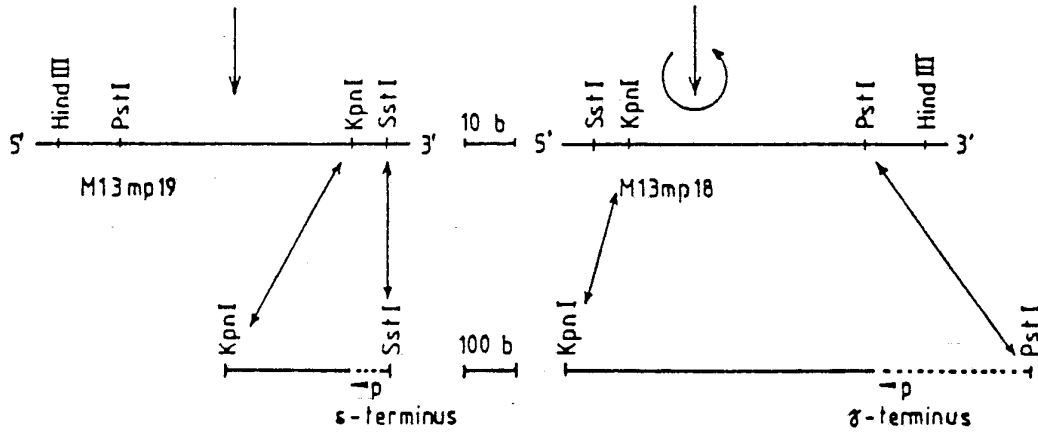


FIG.5

. 8801805