



## (12) PATENTSKRIFT

Patent- og  
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>: C 12 N 15/59 C 12 N 15/68 C 12 N 15/81 C 12 N 15/90 // (C 12 N 15/81  
C 12 R 1:645)

(21) Patentansøgning nr: PA 1984 00113

(22) Indleveringsdag: 1984-01-11

(24) Løbedag: 1983-05-19

(41) Alm. tilgængelig: 1984-01-11

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2001-07-02

(86) International ansøgning nr: PCT/EP83/00128

(85) Videreførelsesdag: 1983-05-19

(30) Prioritet: 1982-05-19 NL 8202091

(73) Patenthaver: DSM N.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, Holland

(72) Opfinder: Cornelis P. Hollenberg, Chopinstrasse 7, 4000 Düsseldorf, Tyskland  
Sunil Das, Benrather Schlossallee 87, 4000 Düsseldorf, Tyskland  
Albert De Leeuw, Hofzicht 20, 2641 LT Pijnacker, Holland  
Johannes Abel Van Den Berg, Hanegevecht 8, 2811 AD Reeuwijk, Holland

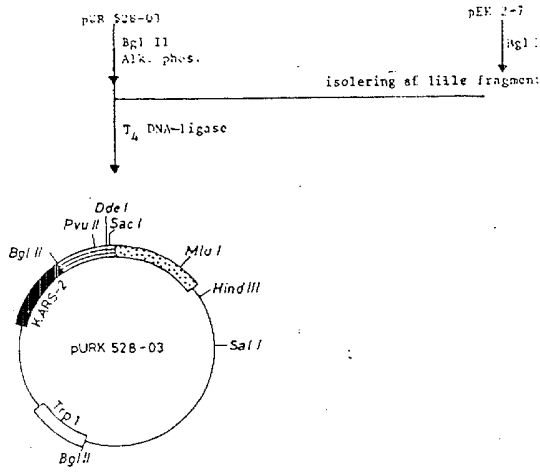
(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark

(54) Benævnelse: Fremgangsmåde til fremstilling af en stamme af gæren *Kluyveromyces*, fremgangsmåde til fremstilling af et polypeptid i *Kluyveromyces*, anvendelse af *Kluyveromyces* som vært, transformet *Kluyveromyces*-celle og *Kluyveromyces*-ekspressionsvektor, samt plasmider

(56) Fremdragne publikationer:  
Gene, vol 10 (1980), side 347-356  
Gene, vol 15 (1981), side 157-166  
Journal of Bacteriology, vol 147, nr. 1 (1981), side 155-160  
Nature, vol 293 (1981), side 717-722

(57) Sammendrag:  
Hidtil ukendt kloningssystem, som er i stand til at bringe genetisk materiale, hidrørende fra rekombinant DNA-materiale, til ekspresion, og som omfatter som værtsorganisme en gærart af slægten *Kluyveromyces*. Egne vektorer er eksempelvis vektorer indeholdende autonomt replikerende sekvenser (ARS) og vektorer indeholdende homologt *Kluyveromyces* DNA, der virker som position for rekombination med værts-kromosomet. Hidtil ukendte og foretrukne vektorer er vektorer, som indeholder ARS-sekvenser hidrørende fra *Kluyveromyces* (KARS-vektorer). De genetisk konstruerede, hidtil ukendte stammer af *Kluyveromyces* danner blandt andet lactase og chymosin.

FIG. 10



Opfindelsens område.

Opfindelsen vedrører området med rekombinant-DNA-bioteknologi. Den angår særlig anvendelsen af rekombinant-DNA-bioteknologi i fremstillingen af polypeptider. 5 Mere specielt angår opfindelsen hidtil ukendte rekombinant-DNA-kloningshjælpemidler og egnede værtsorganismer for disse, hvilke organismer kan anvendes til produktion af polypeptider i stort udbytte, f.eks. enzymer, såsom  $\beta$ -galactosidase (lactase) og chymosin og dets precursorer. 10 rer.

Opfindelsens baggrund.

I de forløbne få år har mikroorganismer vist sig at være i stand til at danne fremmede peptider og proteiner, for hvilke der kodes ved hjælp af fremmede gener, 15 kunstigt indførte ved hjælp af et transformationssystem og eksprimeret eller udtrykt under kontrol af regulatoriske sekvenser.

Noget af den grundlæggende teknik for denne fremgangsmåde er blevet omtalt i eksempelvis US-patent nr. 20 4.237.224.

De grundlæggende bestanddele i rekombinant-DNA-teknologi udgøres af:

- genet, som indeholder kode for den ønskede egenskab og er udstyret med tilstrækkelige kontrolsekvenser, 25 som kræves til ekspression i værtsorganismen,
- en vektor, sædvanligvis et plasmid, hvori genet kan indsættes under garanti af stabil replikation og et højt ekspressionsniveau for genet, og
- en egnet værtsorganisme, hvori vektoren med det nævnte 30 te gen kan transformeres, og som har de til ekspression af det nævnte gens information nødvendige cellulære systemer.

Blandt de således dannede produkter kan nævnes enzymer, hormoner, antigener og andre nyttige peptider 35 og proteiner.

Nogle af disse produkter anvendes som farmaceutiske midler, f.eks. væksthormon og interferon, andre som hjælpemidler i levnedsmiddelindustrien, f.eks.  $\beta$ -galac-

tosidase (lactase), chymosin og amyloglucosidase, og at-  
ter andre kan virke som biologiske katalysatorer for om-  
dannelsen af visse forbindelser.

Enhver kontamination af farmaceutiske midler el-  
5 ler levnedsmidler skal udelukkes. Værtsorganismerne må  
også være uskadelige for de personer, som arbejder med  
mikroorganismerne under forsøg eller i produktionspro-  
cesser i stor målestok. Det er derfor nødvendigt, at  
værtsorganismen ikke er pathogen.

10 De første år med rekombinant-DNA-arbejde var ka-  
rakteriserede ved strenge regler og restriktioner for at  
forhindre eller begrænse uønskede bivirkninger, navnlig  
den ukontrollerede spredning af pathogene mikroorganis-  
mer til omgivelserne.

15 Selv om bekymringen for de formodede risici synes  
at have været overdrevet, er der stadigvæk et behov for  
værtsorganismer, hvortil der ikke knytter sig nogen ska-  
delig effekt.

Hidtil har de kommercielle anstrengelser i for-  
20 bindelse med rekombinant-genetisk manipulation af plas-  
mider til fremstilling af forskellige stoffer rettet sig  
mod *Escherichia coli* som værtsorganisme. Hovedårsagen  
hertil er, at *E. coli* er den historisk bedst studerede  
mikroorganisme. De første opdagelser og opfindelser,  
25 der er gjort indenfor rekombinant-DNA-teknologi, er ble-  
vet gjort med *E. coli* som værtsorganisme.

*E. coli* er imidlertid ikke den mest hensigtsmæs-  
sige organisme at anvende til kommerciel produktion af  
stoffer, som anvendes i den farmaceutiske industri og  
30 levnedsmiddelindustrien. Den kan endogså vise sig at  
være uegnet som et vært/vektor-system i nogle situatio-  
ner på grund af tilstedeværelsen af et antal toksiske  
pyrogene faktorer. Fjernelsen af disse kan ofte forårs-  
sage problemer. *E. coli* har derfor kun en meget begræn-  
35 set anvendelse som produktionsorganisme i gæringsindu-  
strien. Også den proteolytiske virksomhed i *E. coli* kan  
i alvorlig grad begrænse udbyttet af visse anvendelige  
produkter.

Disse og andre overvejelser har ført til en forøget interesse i alternative vært/vektor-systemer. Interessen koncentrerer sig især om anvendelsen af eukaryotiske systemer for anvendelsen af eukaryotiske produkter. Der eksisterer et stadigt behov for nye værtsorganismer, som er hævet over mistanke, hvad angår anvendelsen som produktionsorganismer for kemiske stoffer, navnlig produkter af levnedsmiddelkvalitet og farmaceutisk kvalitet, og som desuden er egnede til gæringsprocesser i stor målestok i industrien.

På den såkaldte GRAS (Generally Recognized as Safe)-liste findes navnene på mange skadelige mikroorganismer. Imidlertid kendes der indtil nu kun nogle få genetiske fremgangsmåder til kloning og ekspression af gener i GRAS-organismer.

Blandt de eukaryotiske organismer, som er egnede til kommerciel udnyttelse, er gærarter måske de letteste at have med at gøre. Gær, navnlig bagerigær, er forholdsvis billig, let at dyrke i store mængder og har et højt udviklet genetisk system.

Udtrykket gær anvendes ofte blot som betegnelse for *Saccharomyces cerevisiae* eller bagerigær, hvilket er en af de mest almindelige og velkendte arter. Man vil forstå, at udtrykket gær som anvendt i den foreliggende beskrivelse med kray, skal angive alle arter og ikke er begrænset til arten *Saccharomyces cerevisiae*.

Det er for nylig blevet angivet, at celler af *Saccharomyces cerevisiae* kan transformeres med plasmider (A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 1929). Det er lykkedes i denne gær at klonere og bringe til ekspression de bakterielle gener for resistens mod ampicillin, chloramphenicol og kanamycin, men også eukaryotiske gener, som f.eks. lactasegenet og de heterologe gener for ovalbumin, leukocyt-interferon D såvel som et *Drosophila*-gen (se redegørelse i C. P. Hollenberg, Current Topics in Microbiology and Immunology, 96 (1982) 119-144).

Hidtil er kun en enkelt anden gærart blevet under-

søgt som vært for gær-ekspressionsvektorer. Leucin-genet i *Saccharomyces cerevisiae* er med held blevet klonet og bragt til udtryk i *Schizosaccharomyces pombe* (D. Beach og P. Nurse, *Nature* 290 (1981) 140-142).

5 Gær-vektorer, der er beskrevet som givende heldig transformation, er baserede henholdsvis på det naturlige 2  $\mu$ m (2 micron) plasmid, som forekommer i mange stammer af *S. cerevisiae* (se eksempelvis J. D. Beggs, *Nature* 275 (1978), 104-109), og på de autonomt replikerende sekven-  
10 ser (ARS), der hidrører fra kromosomalt gær-DNA (se eksempelvis K. Struhl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979), 1035-1039). Vektorer for *Saccharomyces cerevisiae*, der kan anvendes til transformationsformål, er også beskrevet af C. P. Hollenberg, *Current Topics in*  
15 *Microbiology and Immunology*, 96 (1982) 119-144.

Transformationen af ikke godt karakteriserede gær-arter eller industrielle gærarter er alvorligt hæmmet af manglen på viden om transformationsbetingelser og egnede vektorer. Yderligere er auxotrofe markeringer ofte ikke  
20 tilgængelige eller er uønskede, således at en direkte selektion ved hjælp af auxotrof komplementation er udelukket.

Resumé af opfindelsen.

25 Det tilsigtes ved den foreliggende opfindelse at tilvejebringe et gær-vektorsystem, som er i stand til ekspression af en indsat, for polypeptid kodende sekvens.

Det tilsigtes yderligere ved opfindelsen at til-  
30 vejebringe hidtil ukendte, genetisk manipulerede gærstammer af slægten *Kluyveromyces*, som er i stand til at danne polypeptider i kultur for masseproduktion.

Endvidere tilsigtes det ved opfindelsen at tilve-  
jebringe hidtil ukendte, genetisk manipulerede gærstam-  
35 mer af slægten *Kluyveromyces*, der er i stand til at danne chymosin og dets precursor-former i kultur for masseproduktion.

Yderligere tilsigtes det ved opfindelsen at til-

vejebringe hidtil ukendte, genetisk manipulerede gærstammer af slægten *Kluyveromyces*, der er i stand til at danne lactase i kultur for masseproduktion.

Det tilsigtes også ved opfindelsen at tilvejebringe fremgangsmåder til fremstilling af polypeptider, og navnlig enzymer, med *Kluyveromyces* som produktionsorganisme, opnået ved rekombinant-DNA-teknik.

Endelig tilsigtes det også ved opfindelsen at tilvejebringe særlige modificerede *Kluyveromyces*-celler til anvendelse i produktionen af polypeptider, som udviser visse enzymatiske aktiviteter.

Disse og andre formål vil blive beskrevet mere detaljeret i den efterfølgende beskrivelse.

#### 15 Beskrivelse af opfindelsen.

Gærarter af slægten *Kluyveromyces*, og navnlig arterne *K. lactis* og *K. fragilis*, er bioteknologisk vigtige og har kommerciel interesse. Eksempelvis anvendes *Kluyveromyces lactis* og *Kluyveromyces fragilis* til kommerciel produktion af enzymet lactase ( $\beta$ -galactosidase). *Kluyveromyces*-organismer er omtalt på GRAS-listen.

I modsætning til de fleste af de bakteriearter, som er undersøgt i transformationsforsøg, besidder gær-celler en cellevæg, som er uigennemtrængelig for plasmider. Et sædvanligt forberedende trin i gær-transformation er derfor fjernelsen af cellevæggen, hvorved der opnås protoplaster, som er i stand til at optage plasmider. Cellevæg-lytiske enzymer, som med fordel kan anvendes, udvælges fra gruppen af  $\beta$ -1,3-glucanaser. Et egnet eksempel er helicase, et urent enzympræparat hidrørende fra fordøjelseskanalen i sneglen *Helix pomatia*. Et andet egnet repræsentativt eksempel er zymolyase.

Det er velkendt, at cellevæggen ved efterfølgende inkubation under passende betingelser kan regenereres. Imidlertid regenererer kun en brøkdel af protoplasterne, og for *Kluyveromyces lactis*' vedkommende har denne proces vist sig at være endog tyve gange mindre effektiv end for *Saccharomyces cerevisiae* under lignende betin-

gelsler.

Selvom transformation af gærarter under anvendelse af protoplaster er beskrevet af adskillige forfattere, viser det sig at nogle gærarter, og navnlig vildtype-  
5 gærarter og Kluyveromyces-arter er meget vanskelige at regenerere. Hollenberg har beskrevet (Current Topics in Microbiology and Immunology, 96 (1982) 119-144), hvorledes regenereringen af protoplaster af *Saccharomyces cerevisiae* også kan finde sted, såfremt den sædvanlige  
10 osmotiske stabilisator sorbitol erstattes med 0,6 M kaliumchlorid. Det har nu overraskende vist sig, at ved at anvende denne fremgangsmåde på Kluyveromyces protoplaster forøges brøkdelen af regenererede gærceller til det tre-til femdobbelte.

15 Fornylig er der af Ito et al (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168) angivet en fremgangsmåde, ved hvilken hele celler anvendes i stedet for protoplaster, hvorved man undgår regenereringstrinnet. Denne fremgangsmåde har vist sig at være effektiv for *S. cerevisiae* med visse typer af plasmider.  
20

Det har nu vist sig, at denne fremgangsmåde er overraskende effektiv for Kluyveromyces, navnlig når der anvendes plasmider indeholdende KARS-sekvenser (som vil blive beskrevet i det følgende).

25 Sagkyndige på det her omhandlede område vil forstå, at tilgængeligheden af en egnet vektor er af afgørende betydning. På forhånd er det usikkert, om en speciel vært/vektor-kombination vil fungere med held som transformationssystem. Eksempelvis er det kendt fra B. Erhart og C. P. Hollenberg, Current Genetics 3 (1981),  
30 side 83-89, at plasmid pMP81 kan transformeres til *Saccharomyces cerevisiae* YT6-2-IL (cir<sup>o</sup>), men ikke til *Kluyveromyces lactis*. D. Beach og P. Nurse har i Nature 290 (1981), side 140-142 angivet, at plasmid pJDB219 har  
35 et højt kopital i *Saccharomyces cerevisiae*, men transformerer *Schizosaccharomyces pombe* med den meget lave frekvens på kun 2 transformanter pr. microgram DNA.

Hidtil har man overhovedet ikke kendt vektorer



for Kluyveromyces.

Som følge af omfattende forskning og forsøg er der blevet fundet hidtil ukendte vektorer, som er i stand til at transformere værtsorganismen Kluyveromyces, og som desuden er i stand til at replikere autonomt i den transformerede celle.

De hidtil ukendte vektorer, som er særligt egnede for Kluyveromyces, og fortrinsvis for *K. lactis* og *K. fragilis*, kan deles i to kategorier alt efter de i vektorerne indeholdte DNA-sekvenser, som kontrollerer replikations- og opretholdelsesfunktionen i eksempelvis Kluyveromycesarter, nemlig:

1. vektorer indeholdende autonomt replikerende sekvenser (ARS), og
2. vektorer, som ikke indeholder autonomt replikerende sekvenser, men som indeholder homologt Kluyveromyces DNA, der virker som position for rekombination med værts-kromosomet.

Egnede og foretrukne ARS-vektorer er vektorer, som hidrører fra Kluyveromyces, og som også betegnes som KARS-vektorer. Disse vektorer af KARS-typen anvendes fortrinsvis på grund af deres høje transformationsfrekvens. Vektorer af den anden kategori transformerer sædvanligvis med lav frekvens, men de opretholdes meget stabilt i værtscellerne.

Foretrukne vektorer af den første kategori er eksempelvis KARS-vektorer hidrørende fra *K. lactis*, blandt hvilke pKARS12 og pKARS2 er de mest foretrukne. pKARS12 og pKARS2 er hybrid-plasmider bestående af et *K. lactis*-DNA-fragment indeholdende henholdsvis KARS12- og KARS2-sekvensen, som er indsat i det kendte *S. cerevisiae*-plasmid YRp7.

En foretrukket vektor af den anden kategori er eksempelvis pL4, et hybrid-plasmid sammensat af det ARS1-bærende plasmid YRp7 og et *K. lactis* XhoI-DNA-fragment, som bærer LAC4-genet.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en stamme af gæren Kluyveromyces, hvilken frem-

8

gangsmåde er ejendommelig ved, at man  
(1) transformerer Kluyveromyces gærceller med  
en vektor, der i 5"-3'-transkriptionsretningen  
omfatter:

- 5 (a) en i Kluyveromyces funktionsdygtig promoter-  
reguleringsregion,
- (b) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid  
under regulering af nævnte promoterregulerings-  
region,
- 10 (c) en transkriptionsterminator, og knyttet der-  
til
- (d) en selektionsmarkør, og
- (e) et i Kluyveromyces funktionsdygtigt repli-  
kationsbegyndelsessted, og
- 15 (2) propagerer de opnåede transformerede celler  
i et vækstvedligeholdende medium.

Hensigtsmæssige udførelsesformer for ovennævnte  
fremgangsmåde ifølge opfindelsen er angivet i krav 2-14.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til frem-  
20 stilling af et polypeptid i Kluyveromyces, hvilken frem-  
gangsmåde er ejendommelig ved, at man dyrker Kluyveromy-  
ces-celler opnået ved ovennævnte fremgangsmåde ifølge op-  
findelsen, herunder ved en vilkårlig af de nævnte udfø-  
relsesformer.

25 Opfindelsen angår også anvendelsen af Kluyveromy-  
ces som vært for transformation og ekspresion af fremne-  
de gener.

Opfindelsen angår desuden en transformeret Kluy-  
veromyces-celle, der er ejendommelig ved, at den inde-  
30 holder et rekombinant-DNA, som omfatter:

- (a) et strukturelt gen, der koder for chymosin  
eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galacto-  
sidase,
- 35 (b) en autonomt replikerende sekvens hidrørende  
fra Kluyveromyces (KARS),
- (c) en gærregulon og
- (d) en selektionsmarkør,

idet nævnte Kluyveromyces<sup>9</sup> er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

Opfindelsen angår desuden en transformeret Kluyveromyces-celle, der er ejendommelig ved, at den indeholder et rekombinant-DNA, som omfatter:

- (a) et strukturelt gen, der koder for chymosin eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galactosidase,
- 10 (b) en 2-mikron-plasmidreplikationssekvens hidrørende fra Saccharomyces,
- (c) en gærregulon og
- (d) en selektionsmarkør,

idet nævnte Kluyveromyces er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

Opfindelsen angår desuden en transformeret Kluyveromyces-celle, der er ejendommelig ved, at den indeholder et rekombinant-DNA, som omfatter:

- 20 (a) et strukturelt gen, der koder for chymosin eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galactosidase,
- (b) en sekvens, der er homolog med en genomisk Kluyveromyces-sekvens,
- 25 (c) en gærregulon og
- (d) en selektionsmarkør,

idet nævnte Kluyveromyces er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

30 Specielle transformere Kluyveromyces-celler, som falder under de ovennævnte, er angivet i krav 20-22.

Opfindelsen angår ydermere en Kluyveromyces-ekspressionsvektor, som er ejendommelig ved, at den i 5'-3'-transkriptionsretningen omfatter:

- 35 (a) en i Kluyveromyces funktionsdygtig promoterreguleringsregion,
- (b) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid under regulering af nævnte promoterreguleringsregion,

10

(c) en transkriptionsterminator, og knyttet dertil

(d) en selektionsmarkør og

(e) et i *Kluyveromyces* funktionsdygtigt replikationsbegyndelsessted.

Specielle *Kluyveromyces*-ekspressionsvektorer, som falder under den ovennævnte, er angivet i krav 24-27.

Endelig angår opfindelsen et plasmid pPTY75-LAC4 som indeholdt i *E. coli* DG75 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 351.82, et plasmid pL4 som indeholdt i *E. coli* DG75 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 352.82, og et plasmid pKARS12 som indeholdt i *E. coli* JA221 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 353.82.

Alle de nævnte deponeringsaccessionsnumre vedrører deponeringer foretaget i overensstemmelse med Budapest-traktaten.

Med henblik på transformation i *Kluyveromyces* kan eksempelvis følgende gener med fordel anvendes som selekterbare markeringer på vektorerne:

1. tryptophangenet (TRP1) opnået fra *S. cerevisiae*,
2. lactasegenet (LAC4) opnået fra *K. lactis*, og
3. Kan<sup>R</sup>-genet, som koder for resistens mod antibiotikumet G418, der er beslægtet med gentamycin, hvilket gen er opnået fra *E. coli*.

På vektorerne er der passende restriktionspositioner, som muliggør yderligere genkloning.

Stabiliteten af de transformerede plasmider kan forøges betydeligt, såfremt en centromer region (CEN) fra *K. lactis*- eller *S. cerevisiae*-kromosomet indsættes i vektoren.

*Escherichia coli* er også en passende vært, navnlig til kloning og opbevaring. I dette tilfælde er ampicillin-resistens-genet (Amp<sup>R</sup>) også en egnet, selekterbar markering på vektoren. Fortrinsvis formeres og oplagres plasmiderne i *E. coli*-celler, navnlig celler af stammerne DG75 og JA221. De transformerede stammer dyrkes selektivt på L-substrat indeholdende:

kanamycin (20 µg/ml) til E. coli DG75 (PTY75-LAC4), og ampicillin (100 µg/ml) til E. coli DG75 (pL4) og E. coli JA221 (pKARS12).

Disse transformerede stammer er i henhold til regel 5 gel 28, jvf. 28a, i den Europæiske Patentkonvention blevet deponeret den 19. maj 1982 i Centraal Bureau of Schimmelcultures, Oosterstraat 1, 3742 SK Baarn, Holland, under numrene henholdsvis CBS 351.82 (=LMD 82.18), CBS352.82 (=LMD 82.19) og CBS 353.82 (=LMD 82.20).

10 Plasmiderne kan isoleres fra cellerne, f.eks. ved hjælp af den af L. Katz et al. i J. Bacteriol 114 (1973), side 577 angivne metode.

Gær-værtsorganismens protoplaster transformeres ved hjælp af de førnævnte vektorer i et sædvanligt in-15 kubationsmedium indeholdende Tris, calciumchlorid og polyethylenglycol med en molekulvægt i området fra 2000 til 6000, men fortrinsvis på 4000.

Prokaryotiske transformanter kan let detekteres ved hjælp af velkendte foranstaltninger til primær se-20 lektion. Selvom den ønskede egenskab ikke giver sig til kende i transformantens phænotype, indeholder vektoren sædvanligvis et eller flere gener, som indeholder kode for primært selekterbare egenskaber, som f.eks. antibiotikum-resistens, eller gener, der indeholder kode for 25 essentielle vækstfaktorer. I sidstnævnte tilfælde må den tilsvarende auxotrofe mutant af værten være tilgængelig. Selvom mange auxotrofe prokaryoter er tilgængelige, er antallet af auxotrofe industrielle gærarter begrænset. Mutation af et gen fra en produktionsstamme 30 påvirker ofte ugunstigt vigtige vækst- og produktions-egenskaber hos denne stamme.

Transformations-fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, ved hvilken der anvendes hele celler i stedet for protoplaster til transformation af 35 Kluyveromycesarter, kan hensigtsmæssigt gennemføres på følgende måde:

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen dyrkes Kluyveromyces-celler i et standard-gærsubstrat, og cellerne høstes ved  $OD_{610}$  nm mellem 1 og 25. Optimale resultater opnås ved  $OD_{610}$  nm mellem 4 og 10.

5 Kluyveromyces-cellerne vaskes og forbehandles med visse typer chaotropiske ioner, f.eks.  $Li^+$ ,  $Cs^+$  og  $Rb^+$ . Der anvendes hensigtsmæssigt  $LiCl$  og  $Li_2SO_4$  ved slutkoncentrationer fra ca. 20mM til ca. 0,2M, fortrinsvis på ca. 0,1M.

10 Kluyveromyces-cellerne inkuberes med disse monovalente ioner ved  $30^\circ C$  i ca. 5 - 120 minutter, sædvanligvis omkring 60 minutter, efterfulgt af en inkubation med DNA. Transformationen kan forøges, såfremt der derefter tilsættes polyethylenglycol. Sædvanligvis anvendes der et lige så stort rumfang 70%'s polyethylenglycol 7000. Kluyveromyces-transformationen kan yderligere forøges ved at udsætte cellerne for en varmebehandling. Eksempelvis opnås der ved en behandling i ca. 5 minutter ved ca.  $42^\circ C$  en forøgelse til omkring det tyvedobbelte.

20 Anvendelsen af denne fremgangsmåde ifølge opfindelsen vil blive nærmere forklaret i eksemplerne med Kluyveromyces lactis SD11, Kluyveromyces fragilis leu 24 og Kluyveromyces fragilis C21 som værtsorganismer.

I modsætning til, hvad der er tilfældet hos prokaryoter, er anvendelsen af markeringer for antibiotikum-resistens i gær langt fra let. Kun et lille antal antibiotika er virksomme mod gær. Desuden hidrører resistensfaktorerne overvejende fra bakterier, og det er langt fra nogen selvfølge, at de kan bringes til ekspres-  
30 sion i gærceller og anvendes som selektiv markering.

Kanamycin og aminoglycosidet G418, der er beslægtet med gentamycin, har vist sig at være giftig for celler af vildtype-gærstammer.

Yderligere er det kendt fra Hollenberg, Extrachromoso-  
35 mal DNA, ICN-UCLA Symp. (1979) 15:325-338, Acad. Press, New York, at det transponerbare resistenselement Tn601, (som forekommer på bakterieplasmidet pCR1), indeholder et gen, som giver transformanter af Saccharomyces cerevisiae

resistens overfor kanamycin. A. Jimenez og J. Davis, Nature 287 (1980) 869-871, har senere vist, at genet for kanamycinresistens også giver *S. cerevisiae*-transformanter resistens overfor antibiotikum G418, som er en stærk inhibitor af gærvækst.

Plasmidet PTY75-LAC4, som er et hybrid-plasmid sammensat af plasmidet pCR1, det 2  $\mu$ m store plasmid fra *S. cerevisiae* og Sal I-fragmentet fra plasmid pK16, der bærer *K. lactis* LAC4-genet, og som også udgør et træk ved den foreliggende opfindelse, indeholder det samme resistensgen. Det har nu vist sig, at dette gen bringes til udtryk også i *Kluyveromyces lactis* og gør det muligt for stammen at inaktivere G418, som optages fra vækstmediet og således tilvejebringer et redskab for primær selektion af *Kluyveromyces lactis*-transformanter.

Selvom plasmid PTY75-LAC4 ikke indeholder nogen autonomt replikerende sekvens fra *Kluyveromyces*, viste det sig overraskende, at plasmider indeholdende 2  $\mu$ m-plasmidet fra *S. cerevisiae*, som f.eks. PTY75-LAC4, replikerer autonomt i *Kluyveromyces*-arter.

Selektion af G418-resistente gærceller, der var transformeret med PTY75-LAC4, gennemførtes på regenerationsplader indeholdende glucose, sorbitol og 0,2 mg/ml G418. KCl er ikke velegnet her, fordi *Kluyveromyces lactis*-celler på grund af høj saltkoncentration er ufølsomme for G418, selv i koncentrationer op til 0,8 mg pr. ml.

Resistente kolonier viser sig i løbet af 5 - 6 dage efter transformation med PTY75-LAC4. Reelle transformanter kan skelnes fra kolonier, der er blevet resistente ved spontan mutation, ved undersøgelse af tilstedeværelsen af PTY75-LAC4-DNA ved hjælp af kolonihybridisering med mærket pCR1-DNA eller, for så vidt en *K. lactis* lac4-mutant anvendes som vært-stamme, ved undersøgelse af deres evne til at vokse på minimalt substrat (gær-nitrogen-basis, Difco) med lactose som eneste carbonkilde. Gennemsnitlig fandtes 5% af de resistente

kolonier at indeholde PTY75-LAC4-DNA eller at være Lac<sup>+</sup>. Ved hjælp af denne selektionsmetode opnåedes ca. 4 transformanter pr. microgram plasmid DNA.

Ved direkte selektion i *K. lactis* SD69 lac4 for 5 tilstedeværelsen af LAC4-genet under anvendelse af plader indeholdende lactose som eneste carbonkilde og 0,6 M KCl som osmotisk stabilisator, opnåedes 20 Lac<sup>+</sup>-transformanter efter 4 til 5 dages inkubation ved 30°C. På kontrolplader uden DNA viste der sig ingen Lac<sup>+</sup>-kolonier i 10 løbet af dette tidsrum. Lac<sup>+</sup>-kolonierne fra den direkte selektion påvistes at være transformanter og ikke spontane revertanter, fordi tilstedeværelsen af Kan<sup>R</sup>-markeringen på G418-plader kunne påvises som beskrevet ovenfor.

15 Når der anvendes plasmid pL4 (jvf. eksempel 3) eller plasmider af KARS-typen, har man også mulighed for at selektere for tilstedeværelse af tryptophan-prototrofi i transformanterne. I sammenligning med plasmid PTY75-LAC4 bevirkede anvendelsen af plasmid pL4 en væ- 20 sentlig forøgelse i transformationseffektiviteten: der fandtes 30 transformanter pr. microgram DNA. Plasmider af KARS-typen med 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> transformanter pr. microgram DNA viste sig imidlertid at være langt overlegne.

Plasmidet PTY75-LAC4 og KARS-holdige plasmider 25 viste sig at forekomme autonomt replikerende i transformererede celler. Dette påvistes ved hjælp af DNA-analyse. Ikke-digesterede minilysater af transformanter analyseredes i overensstemmelse med Southern's filterpapirmetode ved hybridisering med <sup>32</sup>P-mærket pCR1, den 30 bakterielle komponent af plasmid PTY75-LAC4, eller med mærket pBR322, den bakterielle del af pKARS-plasmiderne.

Sammenlignende elektroforese af et minilysat af en ikke-transformeret *Kluyveromyces lactis* trp1 lac4- mutant og af rensede plasmidpræparater viser, at kun i 35 transformanterne forekommer der hybridiseringsbånd med elektroforetiske mobiliteter svarende til supersnoede



og åbne cirkulære former for det til transformation benyttede plasmid.

Tilstedeværelse af plasmidet i transformerede celler bekræftedes yderligere ved transformering af *E.coli* med DNA-præparatet fra gær-transformanterne og isolering af de samme plasmider fra de dannede *E.coli*-transformanter.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kan anvendes på værts-stammer af arten *Kluyveromyces lactis* såvel som på stammer af arten *Kluyveromyces fragilis*. Begge arter er risikofri organismer og er opført på GRAS-listen.

Særligt anvendelige værtsorganismer er mutanterne *Kluyveromyces lactis* SD11 lac4 trp1 og SD69 lac4, som er opnået ud fra vildtypen CBS 2360, og som i henhold til regel 28, jvf. 28a, i den Europæiske Patentkonvention er deponeret den 19. maj 1982 i Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, 3742 SK Baarn, Holland, under henholdsvis nr. CBS 8092 og CBS 8093. Begge de nævnte deponeringer er foretaget i overensstemmelse med Budapest-traktaten.

Sædvanligvis forbliver transformerende plasmider i værtscellen som separate enheder, der er i stand til autonom replikation og ekspresion. Det skal imidlertid her påpeges, at gener, efter at de er blevet indført på plasmider (med eller uden replikations-sekvenser) bag efter også kan blive integreret i cellens kromosomale DNA.

Denne såkaldte integrative transformation viste sig at være indtrådt i stabile *K.lactis* SD11 trp1 Lac<sup>+</sup>-transformanter efter transformation med plasmid pL4. I dette tilfælde forekommer der intet frit plasmid-DNA i transformanterne.

Integration af LAC4-genet kan påvises ved hjælp af Southern's filterpapir-DNA-analyse af den totale mængde celle-DNA, der digesteres ved hjælp af restriktionsenzymmer, idet pL4-plasmidet fungerer som et mærket hybridiserings-undersøgelsesmiddel.

Til opnåelse af plasmiderne i gær-transformanterne kan der eksempelvis anvendes følgende selektive substrater: Gær-nitrogengrundsubstrat (DIFCO) plus 2% lactose i stedet for glucose til *K. lactis* SD69 lac4 (PTX75-5 LAC4) og til *K. lactis* SD69 lac4 (pL4), og gær-nitrogengrundsubstrat (DIFCO) plus 2% glucose til *K. lactis* SD11 trpl lac4 (pKARS12).

Der er blevet fremstillet hybrid-plasmider indeholdende KARS12-LAC4- og KARS12-2  $\mu$ m DNA-LAC4-sekvenser.

10 Når de hidtil ukendte mikroorganismer ifølge opfindelsen anvendes til produktion i stor målestok, er det hensigtsmæssigt at fjerne alle bakterielle DNA-sekvenser fra vektor-plasmiderne.

Genet kan forblive på autonomt replikerende plasmider, efter at de er indført i cellen, eller de kan integreres i værtscellens kromosomale DNA.

Opfindelsen kan anvendes til kloning og ekspres-  
sion af både prokaryotiske og eukaryotiske gener i *Kluyveromyces* som værtsorganisme, fortrinsvis under anvendelse af en plasmid-vektor af en af de før beskrevne typer. Egnede prokaryotiske gener til anvendelse ifølge opfindelsen er eksempelvis gener for lactase,  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase og  $\beta$ -lactamase. Egnede eukaryotiske gener til anvendelse ifølge opfindelsen er eksempelvis  
25 gener for lactase, chymosin, invertase og interferon.

Til indsættelse af generne, der koder for disse produkter, er egnede restriktionspositioner tilgængelige på vektorerne som beskrevet i det foregående.

Ifølge opfindelsen kan der anvendes prokaryotiske  
30 og eukaryotiske gener, både homologe og heterologe. Opfindelsen kan med fordel anvendes til produktion af kemiske stoffer i større målestok, navnlig polypeptider. Ved en foretrukken udførelsesform for opfindelsen fremstilles chymosin, et enzym til løbning af mælk.

35 Valget af vektoren og regulonerne til kloning og ekspresion af gener i *Kluyveromyces* kan selvsagt variere med det i det specielle tilfælde anvendte gen.

Også valget af en speciel *Kluyveromyces*-stamme

som værtsorganisme og de optimale procesbetingelser kan variere med blandt andet det gen og den vektor, der skal udvælges. De optimale selektions- og procesbetingelser kan fastlægges ved hjælp af rutineforsøg. Disse variationer er alle indbefattet i den foreliggende opfindelse.

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af en detailleret beskrivelse af eksempler på kloning og expression af:

- a. et homologt gen,  $\beta$ -galactosidase (lactase)-genet i *K. lactis*,
- 10 b. et prokaryotisk, heterologt gen,  $Kan^R$ , i *K. lactis* og *K. fragilis*,
- c. et eukaryotisk, heterologt gen, TRP1, i *K. lactis*,
- 15 d. et eukaryotisk, heterologt gen, LEU2, i *K. fragilis*,
- e. et eukaryotisk, heterologt gen, der koder for preprochymosin og dets modningsformer, i *K. lactis*, og
- 20 f. et eukaryotisk, heterologt gen, der koder for preprothaumatin og dets modningsformer og modificerede former, i *K. lactis*.

I de efterfølgende udførelseseksempler forklares visse udførelsesformer for den foreliggende opfindelse.

25

#### Eksempel 1

Rekombinant-plasmid PTY75-LAC4.

0,5  $\mu$ g af plasmidet pK16, der er beskrevet af R., Dickson, (Gene 10 (1980) 347-356), og 0,5  $\mu$ g af plasmidet  
 30 PTY75, der er beskrevet af C. P. Hollenberg et al. (Gene 1 (1976) 33-47, digesteredes med restriktionsenzymet Sal I. De to digesterede produkter blandedes, og efter inaktivering af restriktionsenzymet inkuberedes opløsningen med T4-ligase, hvorved der opnåedes en opløsning  
 35 med rekombinant-DNA.

Denne ligerede blanding anvendtes til transformering til *E. coli*-stamme DG75 (hds1 leu-6 ara-14 galK2 xyl-5 mt-1 rpsL20 thi-1 supE44- $\lambda$  -lac $\Delta$ Z 39) i overens-

stemmelse med R. C. Dickson et al., Cell 15 (1978), side 123-130, hvilket resulterede i kanamycin-resistens ( $Kan^R$ ).  $Kan^R$ -kolonier selekteredes yderligere på supplerede minimalsubstrat-plader, indeholdende lactose som eneste carbonkilde, med henblik på dannelse af  $lac^+$ -kolonier. Plasmidet PTY75-LAC4 isoleredes fra en af de selekterede  $Kan^R lac^+$ -transformanter under anvendelse af den af L. Katz et al., J. Bacteriol. 114 (1973), side 577-591 beskrevne fremgangsmåde.

10

## Eksempel 2

Rekombinant-pKARS-plasmider.

5  $\mu$ g af plasmidet YRp7 (Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 76 (1979) side 1035-39) digesteredes med 15 restriktionsenzymet Sal I. 14  $\mu$ g DNA fra vildstammen K. lactis CBS 2360 digesteredes med enzymet Xho I. Fragmenterne af plasmidet og K. lactis-DNA blandedes i et molært forhold på 1:3. Efter inaktivering af restriktionsenzymene bragtes opløsningen til en DNA-koncentration på 25  $\mu$ g/ml og inkuberedes med T4-ligase under 20 standardbetingelser (Boehringer).

Ved transformation af E. coli DG75 med den lige-  
rede blanding under sædvanlige betingelser opnåedes en  
blanding af  $4,5 \times 10^5$   $Amp^R$ -transformanter, af hvilke  $9 \times$   
25  $10^3$  indeholdt K. lactis-indsatsdele, som det kan udledes  
af deres følsomhed overfor tetracyclin. Procentmængden  
af tetracyclin-følsomme celler kan forøges til 85% ved  
cycloserin-behandling, se F. Bolivar og K. Backman,  
Methods in Enzymology 68 (1979), side 245-267. I over-  
30 ensstemmelse med den af Katz et al. (se eksempel 1) an-  
givne metode isoleredes 14 forskellige plasmider, der  
betegnes som pKARS 1-14. Alle var i stand til at trans-  
formere K. lactis SD11  $lac^4 trp1$ -stammen til  $Trp^+$ -pheno-  
typen med en frekvens på  $10^3 - 10^4$  pr. microgram DNA.  
35 Plasmidet pKARS12 viste den højeste transformationsfre-  
kvens på  $3 \times 10^4$  pr. microgram DNA, men plasmidet pKARS2  
viste sig at være mere hensigtsmæssig i den videre be-  
handling.

De opnåede rekombinant-plasmider kunne også overføres til *E. coli* JA221 ( $\Delta$ trp E5, leu B6, lac y, rec A, hsdM<sup>+</sup>, hsdR<sup>-</sup>).

5 Eksempel 3  
Rekombinant-plasmid pL4.

En blanding af YRp7 og *K. lactis* DNA-fragmenter fremstilledes som beskrevet i eksempel 2. *E. coli* DG75-stammen transformerades med den ligerede blanding og udspredtes derefter på plade af M9 minimal agar, hvilket substrat indeholdt lactose som eneste carbonkilde, og hvortil der var sat leucin. Lac<sup>+</sup>-kolonier viste sig efter 8 dage ved 30°C. Plasmid pL4 isoleredes fra en af disse lac<sup>+</sup>-kolonier under anvendelse af den af Katz et al (se eksempel 1) angivne fremgangsmåde.

Eksempel 4

Kluyveromyces lactis SD69 lac4 transformeret til G418<sup>R</sup> lac4<sup>+</sup> med plasmidet PTY75-LAC4.

20 Celler af *Kluyveromyces lactis*-mutanten SD69 lac4 suspenderedes i et dyrkningsmedium (ph 6,8) indeholdende 1% gærekstrakt, 2% pepton og 2% glucose. Dyrkningen fortsattes, indtil eksponentialfasen ( $3-5 \cdot 10^7$  celler pr. ml) var nået.

25 Gærcellerne samledes ved centrifugering, vaskedes med vand og resuspenderedes i en opløsning (pH 8,0) indeholdende 1,2 M sorbitol, 25 mM EDTA og 0,2 M frisk mercaptoethanol.

Efter inkubation i 10 minutter ved 30°C fracentrifugeredes cellerne, vaskedes to gange med en 1,2 M sorbitolopløsning og resuspenderedes i 20 ml af en opløsning (pH 5,8) indeholdende 1,2 M sorbitol, 10 mM EDTA, 0,1 M natriumcitrat og 10 mg helicase.

35 Protoplaster dannedes, og efter 15 - 20 minutters forløb fracentrifugeredes disse, vaskedes tre gange med 1,2 M sorbitol og resuspenderedes til en koncentration på ca.  $5 \cdot 10^{10}$  celler pr. ml i 0,1 ml af en opløsning indeholdende 10 mM CaCl<sub>2</sub> og 1,2 M sorbitol.

10 µg pTY75-LAC4 tilsattes, og blandingen inkuberes i 15 minutter ved 25°C. Derefter tilsattes 0,5 ml af en opløsning (pH 7,5) indeholdende 10 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub> og 20% (vægt/volumen) polyethylen-glycol 4.000, hvorefter der fulgte 20 minutters inkubation.

Protoplasterne udfældedes ved centrifugering og resuspenderedes derpå til en koncentration på omkring  $5 \cdot 10^{10}$  protoplaster pr. ml i en opløsning (pH 6,8) indeholdende 7 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 M sorbitol, 0,5 mg/ml gær-ekstrakt, 1 mg/ml pepton og 2 mg/ml glucose.

Efter inkubation i 60 minutter ved 30°C centrifugeredes protoplasterne, vaskedes med 0,6 M KCl-opløsning og resuspenderedes i 0,6 M KCl-opløsning.

For at blive i stand til at udvalgte de G418-resistente transformanter udspreddes  $1 \cdot 10^9$  protoplaster i et overliggende lag af 3%'s agar på plader af 2% minimal agar indeholdende 2% glucose, 1,2 M sorbitol og 0,2 mg/ml af antibiotiket G418. Med henblik på samtidig udvælgelse af Lac<sup>+</sup>-transformanter, spredtes  $5 \cdot 10^8$  protoplaster i et overliggende 3%'s agarlag på plader af 2%'s minimal agar, DIFCO gær-nitrogen-grundsubstrat, indeholdende 2% lactose som eneste carbonkilde og 0,6 M KCl i stedet for 1,2 M sorbitol.

Kolonier viste sig i løbet af 4 - 5 dage. På sorbitolplader uden G418 var protoplast-regenerering sædvanligvis 0,2 - 0,5%, medens procentmængden på plader med 0,6 M KCl og glucose som carbonkilde steg til 0,5 - 1,5%.

Når G418 anvendtes til selektion, opnåedes en transformant pr.  $10^7$  regenererede protoplaster. Ved samtidig selektion på lactoseplader opnåedes 10 transformanter pr.  $10^7$  regenererede protoplaster eller 20 transformanter pr. microgram plasmid DNA.

Tilstedeværelsen af pTY75-LAC4 i gærcellerne kunne påvises ved hjælp af Southern's hybridiseringsmetode med <sup>32</sup>P-mærket pCR1.

DNA-præparater fremstilledes i overensstemmelse

med Struhl et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1979) side 1035-1039).

## Eksempel 5

5 Kluyveromyces lactis SD11 lac4 trp1 transformeret til Trp<sup>+</sup> med plasmidet pKARS 12.

Celler af stammen K. lactis SD11 lac4 trp1 transformeredes som beskrevet i eksempel 4 med 10 µg pKARS12 DNA. Transformanter udvalgte på plader med 2% minimal agar indeholdende 2% glucose og 0,6 M KCl. Pr. 10 microgram pKARS12-DNA opnåedes  $3,4 \times 10^4$  Trp<sup>+</sup>-transformanter.

## Eksempel 6

15 Kluyveromyces lactis SD69 lac4 transformeret til Lac<sup>+</sup> med plasmidet pL4.

K. lactis-stammen SD69 lac4 transformeredes med plasmidet pL4 under anvendelse af den samme metode, som er beskrevet for PTY75-LAC4 i eksempel 4. Transformanterne selekteredes på plader af gær-nitrogen-grundsubstrat (DIFCO) indeholdende 2% lactose. Transformationsfrekvensen var 20 transformanter pr. microgram plasmid-DNA

## 25 Eksempler 7 - 13

Kluyveromyces lactis SD69 lac4 transformeret til Trp<sup>+</sup> med plasmider af KARS-typen.

Analogt med den i eksempel 5 beskrevne fremgangsmåde udførtes transformationsforsøg med andre plasmider 30 af KARS-typen. Resultaterne af forsøgene er opført i den efterfølgende tabel.

Tabel

Eks.	Stamme	Genotype	Plasmid	Transformanter pr. microgram DNA	Størrelse af KARS- fragmenter (kb)	
5	4.	SD69	lac4	PTY75-LAC4	20	-
	7.	SD11	lac4 trp1	pKARS1	$1.5 \times 10^3$	2.24
	8.	SD11	lac4 trp1	pKARS2	$5 \times 10^3$	1.24
10	9.	SD11	lac4 trp1	pKARS7	$10^3$	2.3
	10.	SD11	lac4 trp1	pKARS8	$5 \times 10^3$	1.85
	11.	SD11	lac4 trp1	pKARS10	$2.4 \times 10^4$	3.15
	5.	SD11	lac4 trp1	pKARS12	$3.4 \times 10^4$	5.0
	12.	SD11	lac4 trp1	pKARS13	$1.5 \times 10^4$	2.0
15	13.	SD11	lac4 trp1	pKARS14	$1.8 \times 10^4$	2.25

Molekylvægtene af pKARS-plasmider bestemtes efter digestering med endonucleaserne Eco RI og Hind III, under anvendelse af 0,8% agarosegel og de sædvanlige molekylvægtsmarkeringer.

## Eksempel 14

Kluyveromyces lactis SD11 lac4 trp1 transformeret til Trp<sup>+</sup> med plasmider indeholdende KARS-2-sekvensen under anvendelse af en transformations-procedure med hele celler.

Plasmid pEK2-7 anvendtes til transformering af K. lactis SD 11. Dette plasmid består af det velkendte plasmid YRp7, hvori et 1,2 kb fragment indeholdende den fra KARS-2 hidrørende autonomt replikerende sekvens er blevet klonet (fig. 2). K. lactis SD11 dyrkedes natten over ved 30°C i 1% gærekstrakt, 2% pepton og 2% glucose (pH 5,3). Cellerne høstede ved en OD<sub>610</sub> nm på 4-8 ved hjælp af centrifugering ved 1000x g i fem minutter. Cellerne vaskedes med TE-puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), og den opnåede pellet resuspenderedes i TE-puf-



fer til en koncentration på  $2 \times 10^8$  celler pr. ml. Denne suspension fortyndedes med ét rumfang 0,2 M LiCl og omrystedes ved 30°C i 60 minutter.

Plasmid pEK2-7-DNA (10 µg) sættes til 0,1 ml Li-  
5 behandlede celler, og inkubationen fortsattes ved 30°C i 30 minutter. Der tilsættes ét rumfang 70%'s polyethylen-glycol 7000, og blandingen inkuberedes i yderligere 60 minutter ved 30°C. Blandingen underkastedes varmebe-  
10 handling ved 42°C i 5 minutter, og cellerne vaskedes med sterilt, demineraliseret vand. Cellerne udbredtes på plader af minimal agar indeholdende 2% glucose og 0,67% gær-nitrogen-grundsubstrat.

Der iagttoges transformanter efter 36-48 timer ved 30°C.

15

#### Eksempel 15

*Kluyveromyces fragilis* transformeret med plasmider indeholdende KARS-2-sekvensen.

Der anvendtes to typer af plasmider til transfor-  
20 mering af *K. fragilis*. Det første plasmid pGB 180 konstrueredes ved at klonе 3,5 kb Bg1 II-fragmentet fra plasmid pEK2-7 (fig. 2), indeholdende den autonomt replikerende KARS-2-sekvens fra *K. lactis* og TRP1-genet fra *S. cerevisiae*, i Bam H1-positionen i pJDB 207 (J. D.  
25 Beggs, Alfred Benzon Symposium 16 (1981) 383). Ca. 36 *K. fragilis* leu-mutanter, opnået efter UV-behandling af *K. fragilis*, transformeredes med pGB ved hjælp af  $\text{Li}^+$ -metoden som beskrevet i eksempel 14. Én mutant, *K. fragilis* leu 24, transformeredes til  $\text{Leu}^+$  med en frekvens  
30 på ca.  $10^3$  transformanter pr. µg plasmid-DNA.

Det andet plasmid, pGL2, konstrueredes ved at klonе 3,5 kb Bg1II-fragmentet fra pEK2-7 på den ovenfor beskrevne måde i Bam H1-positionen i det velkendte plasmid pACYC177, der indeholder transposonen Tn601, som medfø-  
35 rer resistens mod kanamycin og gentamycinderivatet G418.

*K. fragilis*-stammen C21 transformeredes med plasmid pGL2 ved hjælp af  $\text{Li}^+$ -metoden som beskrevet i eksempel 14. De transformerede celler udspreddes på YNPD-

agarpladen indeholdende 50 µg G418 pr. ml. Transformanter detekteredes efter inkubation ved 30°C i 48 timer, medens spontant resistente mutanter først detekteredes efter 6 dage. DNA udvalgte fra *K. fragilis*-transformanter og transformeredes til egnede *E. coli* DG 75-celler. DNA udvundet fra kanamycinresistente *E. coli*-celler viste tilstedeværelse af plasmid pGL2.

Disse forsøg viser, at *K. fragilis*-stammer kan transformeres med plasmider indeholdende KARS-sekvenser, og at disse plasmider er autonomt replikerende i *K. fragilis*.

#### Eksempel 16

*Kluyveromyces lactis* SD11 lac4 trp1, som eksprimerer preprochymosin og dets forskellige modningsformer efter at være transformeret med plasmider indeholdende KARS-2-sekvensen, strukturgenerne, som koder for preprochymosin og dets forskellige modningsformer, og forskellige promotorer, der dirigerer syntesen af disse strukturgener.

Dette eksempel omfatter et antal trin, af hvilke de væsentligste er følgende:

1. Tilføjelse af Sal I-linkere foran de klonede strukturgener, som koder for preprochymosin, prochymosin, pseudochymosin og chymosin.
2. Indførelse af et DNA-fragment i plasmider, som opnået ovenfor, indeholdende den autonomt replikerende KARS-2 sekvens fra *K. lactis* og TRP1-genet fra *S. cerevisiae*.
3. Indførelse i ovenfor opnåede plasmider af forskellige modningsformer af preprochymosin. Udgangsmaterialer for ekspresionen af bovint preprochymosin og dets forskellige modningsformer i *K. lactis* var følgende klonede strukturgener:
  - methionyl-pseudochymosin, beskrevet som pUR 1531
  - methionyl-chymosin, beskrevet som pUR 1522
  - methionyl-prochymosin, beskrevet som pUR 1523
  - methionyl-preprochymosin, beskrevet som pUR 1524.

Konstruktionen og strukturen af disse plasmider er blevet beskrevet i enkeltheder i beskrivelsen til europæisk patentansøgning nr. 82201272.0, offentliggjort den 20. april 1983 under nr. 0077109. Generne isoleres, og disse plasmider konstrueredes i overensstemmelse med den nævnte beskrivelse.

A. Indførelse af Sal I-linkere i plasmiderne pUR 1531, pUR 1522, pUR1523 og pUR 1524 (fig. 1).

10 Plasmiderne pUR 1531, pUR 1522, pUR 1523 og pUR 1524 indeholder en Eco R1 restriktionsposition lige foran ATG-initiationscodonen. Eftersom der findes en yderligere Eco R1 position i chymosingenet, tilsigtedes det at indføre et Sal I-linkermolekyle lige foran den  
15 første Eco R1 position for at lette indføringen af forskellige promotorsekvenser, som dirigerer ekspressionen af de distale strukturgener.

Ca 50 µg DNA inkuberedes med 50 enheder endonuclease Eco R1 i nærværelse af 125 µg/ml ethidiumbromid i 10  
20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 6 mM β-mercaptoethanol, 10 mM MgCl<sub>2</sub> og 100 µg/ml bovint serumalbumin, pH 7,5, ved 37°C i 60 minutter. Under disse betingelser omdannedes plasmid DNA i overvejende grad til lineære og åbent cirkulære molekyler. DNA'et ekstraheredes med et rumfang phenol og et rumfang chloroform og fældedes med et rumfang  
25 propanol-2.

DNA'et opløstes i TE-puffer og digesteredes fuldstændigt med endonuclease Sal I. Et DNA-fragment på ca. 1800 bp isoleredes fra agarosegel ved elektroeluering.

30 Fragmenterne ekstraheredes med phenol og chloroform og udfældedes med propanol-2. Precipitaterne opløstes i TE-puffer.

De kohæsive ender udfyldtes ved hjælp af DNA-polymerase på følgende måde:

35 Til 15 µl indeholdende DNA-fragmentet på 1800 bp (ca. 1 - 2 µg) sattes 1 µl af en 2 mM opløsning af dATP, dGTP, dCTP og dTTP, 6,5 µl 4x nick-puffer indeholdende 0,2 M Tris-HCl (pH 7,2), 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM dithiothreitol

tol og 200 mg/ml bovint serumalbumin og 2,5 µl vand. Der tilsattes to enheder DNA-polymerase (Klenow-fragment), og blandingen inkuberedes ved 20°C i 30 minutter. Derpå inaktiveredes DNA-polymerase ved opvarmning til 70°C i 5 minutter.

Til denne blanding sattes en phosphoryleret Sal I-linker (fremstillet som beskrevet af Maniatis et al, Molecular Cloning, CSH), sammen med T4 DNA-ligase (10<sup>3</sup> enheder).

10 Efter inkubation ved 22°C i 4 timer inkuberedes blandingen ved 4°C i yderligere 16 timer. Derpå inkuberedes blandingen med endonucleaserne Sal I og Hind III og et DNA-fragment på ca. 1500 bp udvandedes fra en agarosegel ved elektroeluering.

15 Fragmenterne (A, B, C, D) rensedes ved ekstraktion med phenol og chloroform og udfældedes med propanol-2. Disse fragmenter ligeredes til et 3,3 kb Hind III-Sal I/fragment (ca. 0,5 µg), hidrørende fra plasmid pPA153-209, indeholdende en temperaturfølsom replicon og 20 et ampicillinresistent gen (der koder for β-lactamase), og de udvandedes i rensset tilstand fra agarosegel ved elektroeluering.

De ligerede molekyler transformeredes til E. coli HB 101, og ampicillinresistente, tetracyclinfølsomme 25 kloner dyrkedes, og plasmid-DNA udvandedes. Digestering af plasmid-DNA med endonucleaserne Sal I, Eco RI og Hind III bekræftede, at plasmiderne pGB131, pGB122, pGB123 og pGB124 (fig. 1) var blevet opnået.

30 B. Indførelse af et KARS2- og TRP1-gen i henholdsvis plasmid pGB131, pGB122, pGB123 og pGB124.

Autonomt replikerende sekvenser, hidrørende fra og replikerende i Kluyveromyces, opnåedes som beskrevet i eksemplerne 2 og 7 - 15. Den autonomt replikerende se- 35 kvens i plasmidet pKARS-2 er lokaliseret på et 1,24 kb fragment, og dette fragment kloner i det velkendte plasmid YRp7, og der opnåedes et nyt plasmid pEK2-7 (fig. 2). Digestion af pEK2-7 med endonuclease Cla I resultere-

de i fragmenter med henholdsvis 3,5 og 5,5 kb. 3,5 kb fragmentet, som indeholder det fra *S. cerevisiae* hidrørende TRP1-gen og den fra *K. lactis* hidrørende KARS-2-sekvens (fig. 2), isoleredes fra en agarosegel ved hjælp af elektroeluering og ligeredes til de ClA I-digesterede plasmider henholdsvis pGB131, pGB122, pGB123 og pGB124. Den resulterende blanding transformerades til *E. coli* JA300 (*trpC*), og karakterisering af plasmid-DNA udvundet fra  $\text{Trp}^+$ -transformanter bekræftede konstruktionen af henholdsvis plasmid pGB151, pGB152, pGB153 og pGB154 (fig. 2).

C. Indførelse af forskellige promotorsekvenser i plasmiderne, som dirigerer syntesen af de forskellige modningsformer af preprochymosin.

De Sal I-digesterede plasmider, som indeholder KARS-2-sekvensen, TRP1-genet og strukturgenet for preprochymosin eller dets forskellige modningsformer, er velegnede til optagelse af Sal I-tilknyttede promotorsekvenser til dirigering af det distale strukturgens syntese i *K.lactis*-transformanter.

I de fleste tilfælde må disse promotorsekvenser forsynes med Sal I-linkere. Enhver promotorsekvens kan forsynes med en sådan Sal I-linker, og i de efterfølgende eksempler belyses dette ved hjælp af

1. isocytochrom c1-promotoren fra *S. cerevisiae*, og
2. lactase-promotoren fra *K. lactis*.

C1. Tilføjelse af Sal I-linkere til isocytochrom c1-promotoren fra *S. cerevisiae* og indførelse i plasmider (fig. 3).

Plasmid pYeCYC1, bestående af isocytochrom c1-genet klonet i plasmid pBR322, anvendtes som udgangsmateriale (G. Faye et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), side 2258).

Fra nucleotidsekvensdata vides det, at en Eco RI-position forekommer i isocytochrom C1-genet ved nucleotid +8 (Ibid.).

Plasmid pYeCYC1 spaltedes med endonuclease Eco RI, ligeredes med T4 DNA-ligase og transformeredes til *E. coli* HB101, hvorved der opnåedes et plasmid pC15 indeholdende fragmentet med 1930 bp, som bærer promotoren 5 og 8 nucleotider af isocytochrom c1-genet.

Plasmid pC15 spaltedes med endonuclease Eco RI og inkuberedes med nuclease Bal 31 i kort tid til fjernelse af blot nogle få nucleotider.

De Bal 31 digesterede ender omdannedes til stumpe 10 ender med DNA-polymerase (Klenow-fragment) og en phosphoryleret Eco RI-linker ligeredes to dette DNA. Efter inkubering med endonuclease Eco RI, ligering og transformering til *E. coli* identificeredes en transformant pC15-R12, hvori 12 nucleotider fra cytochrom c1-genet var 15 blevet fjernet. En Sal I-linker indførtes ved spaltning af plasmidet pC15-R12 med endonuclease Eco RI, udfyldning i de kohæsive ender med DNA-polymerase, ligering af en phosphoryleret Sal I-linker, inkubering med endonuclease Sal I og replonering af det opnåede, 1070 bp store 20 fragment i de med Sal I digesterede plasmider henholdsvis pGB151, pGB152, pGB153 og pGB154, hvorved der opnåedes de isocytochrom c1-promotoren indeholdende plasmider henholdsvis pGB161, pGB162, pGB163 og pGB164, der blev identificeret ved koloni-hybridisering med det 25 med <sup>32</sup>P-mærkede, 1070 bp store fragment som undersøgelsesmiddel. Plasmid DNA fremstilledes ud fra de positive kloner, og den korrekte orientering af isocytochrom c1-promotoren bekræftedes ved tilstedeværelse af et 850 bp stort fragment efter digestering med endonuclease Sma I. 30

C2. Tilføjelse af Sal I-linkere til lactase-promotoren fra *Kluyveromyces lactis* og indførelse i plasmider.

Udgangsmaterialet var plasmid pK16, indeholdende lactasegenet fra *K. lactis* klonet i Eco RI-positionen i 35 plasmid pBR322 (R.C. Dickson og J.S. Markin, Cell 15 (1978), side 123).

Ved sekvensering af store dele af lactase-struk-

turgenet og dets promotor fastsloges tilstedeværelsen af en Cla I-position ved ca. 450 bp i lactase-strukturgenet.

Plasmid pK16 digesteredes med endonuclease Cla I, og fragmentet indeholdende promotoren og ca. 450 bp af strukturgenet reklonedes i plasmid pBR322, digesteredes med endonucleaseerne Cla I og Acc I (partielt). I et af plasmiderne, pGB182, blev den bibeholdte Cla I-position ved ca. 450 bp i lactase-strukturgenet åbnet ved inkubation med endonuclease Cla I og trimmet ved inkubation med nuclease Bal 31. Bal 31-enderne gjordes stumpe ved inkubation med DNA-polymerase, og en phosphoryleret Eco RI-linker ligeredes to dette trimmede fragment.

Ved digestering med endonuclease Eco RI og rekloning af det trimmede fragment opnåedes plasmid pGB183, som havde bibeholdt lactase-promotoren, men manglede strukturgenet.

Sal I-linkere sættes til dette fragment som beskrevet i det foregående eksempel (16.C2). Den med Sal I-linker forsynede lactase-promotor ligeredes til de med Sal I spaltede plasmider henholdsvis pGB151, pGB152, pGB153 og pGB154, hvorved der opnåedes plasmiderne henholdsvis pGB171, pGB172, pGB173 og pGB174.

De i dette eksempel 16 opnåede plasmider indføres i *Kluyveromyces lactis* SD11 lac4 trp1 ved Li<sup>+</sup>-metoden som beskrevet i eksempel 14, idet der foretoges selektion for Trp<sup>+</sup>-transformanter.

Tilstedeværelsen af preprochymosin eller dets modningsformer i *Kluyveromyces*-ekstrakter påvist ved immunologisk ELISA-teknik og ved pletvis afsætning af portioner af ekstrakterne på nitrocellulose-filterpapir og analyse af filtrene som beskrevet af D. J. Kemp og A. F. Cowman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), side 4520-4524).

Celleekstrakter fremstilledes som følger: *K. lactis*-transformanter dyrkedes ved 30°C i omkring 16 - 24 timer i YNB-substrat indeholdende 2% dextrose.

Celler høstedes ved  $OD_{610}$  nm i området fra 2,2 - 6,0 ved centrifugering ved 6000 pm i 10 minutter i en Sorvall G-S3 rotor. Den opnåede pellet resuspenderedes i sterilt destilleret vand til en  $OD_{600}$  på 600 og afkøles ledes på is.

0,5 ml af denne cellesuspension fortyndedes med 0,5 ml iskoldt vand og blandedes med 2 g Ballotini-perler (diameter 0,25 - 0,35 mm, Braun-Melsungen GMBH, Vesttyskland).

10 Cellerne blev itubruddt ved omrystning med maksimal hastighed i 4 minutter på et Vortex-rysteapparat.

Ved fasekontrastmikroskopi konstateredes, at mere end 95% af cellerne var itubruddt. Cellerester fjernedes ved centrifugering i 1 minut i en Eppendorf-centrifuge. 15 Delmængder af ekstrakterne blev frosset i flydende nitrogen og oplagret ved  $-80^{\circ}\text{C}$ .

1 - 5  $\mu\text{l}$  delmængder af celleekstrakterne afsattes pletvist på nitrocellulose-membranfiltre. Filtrene tørredes, befugtedes med 192 mM glycin, 25 mM Tris, 20% 20 ethanol (pH 8,3) og inkuberedes i 60 minutter ved  $22^{\circ}\text{C}$ .

Derefter inkuberedes filtrene med preincubationspuffer (0,35 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2% bovint serumalbumin) i 30 minutter. Filtrene vaskedes tre gange i 5 minutter med RIA-puffer (0,125 M NaCl, 10 mM 25 Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 mM PMSF, 1% Triton X100, 0,5% natrium-desoxycholat, 0,1% natrium-dodecylsulfat og 0,3% gelatine). Filtrene inkuberedes natten over ved  $4^{\circ}\text{C}$  i 1 ml RIA-puffer indeholdende 10  $\mu\text{l}$  chymosin-antiserum. Antiserum fjernedes ved vaskning med RIA-puffer (tre 30 gange) og inkuberedes med 1  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$ -protein A i 1 ml

RIA-puffer i 60 minutter ved  $22^{\circ}\text{C}$ .

$^{125}\text{I}$ -protein A fjernedes ved vaskning med RIA-puffer (5 gange).

Filtrene tørredes og autoradiograferedes natten 35 over. Tilstedeværelsen af preprochymosin eller dets modningsformer i *K. lactis*-transformanter blev klart iagttaget.



Tilstedeværelsen af chymosin-aktivitet i celle-  
ekstrakter fra *K. lactis*-transformanter bestemtes ved  
højtryks-væskekromatografi (HPLC) som beskrevet af A.C.  
M. Hooydonk og C. Olieman, *Netherl. Milk Dairy* 36  
5 (1982), side 153.

50 µl enzymopløsning eller ekstrakt sættes til  
1 ml af en 10%'s opløsning af mælkepulver (Difco) i 10  
mM CaCl<sub>2</sub>. Opløsningen inkuberedes i 15 minutter ved  
31 °C. Reaktionen standsedes ved tilsætning af 2 ml  
10 12%'s trichloreddikesyre (TCA). Næsten alle proteiner  
udfældes med TCA med undtagelse af glycomacropeptid  
(GMP), som er blevet spaltet fra k-casein ved chymosin-  
indvirkning.

Denaturerede proteiner pelleteredes ved centrifu-  
15 gering, og 1 ml af den klare supernatant neutraliseredes  
med 0,4 ml 1N NaOH.

Opløsningen centrifugeredes påny, og den dannede  
mængde GMP detekteredes ved hjælp af HPLC med overvåg-  
ning af ekstinktionen ved 214 nm.

20 Ekstrakter fra *K. lactis*-transformanter indehol-  
dende prochymosin inkuberedes først ved pH 2 i to timer  
og neutraliseredes derpå før udførelse af chymosinakti-  
vitetstesten. Chymosin fandtes først efter behandlingen  
ved pH 2.

25

#### Eksempel 17

Kluyveromyces SD11 lac4 trp1, som eksprimerer prepro-  
thaumatin og dets forskellige modningsformer efter at  
være transformeret med plasmid pURK 528-01, der indehol-  
30 der det for preprothaumatin kodende strukturen, KARS2-  
sekvensen fra *K. lactis*, glycerinaldehyd-3-phosphat-dehy-  
drogenase-promotoren fra *S. cerevisiae* og TRP1-genet fra  
*S. cerevisiae*.

35 Dette eksempel omfatter et antal trin, hvoraf de  
væsentligste er følgende:

1. Isolering af kloner indeholdende glycerinaldehyd-3-  
phosphat-dehydrogenase (GAPDH)-operonen i *S. cerei-  
visiae*.

En pulje af DNA fra gæren *S. cerevisiae* fremstilledes i det hybride *E. coli*-gær-plasmid pF1 (M. R. Chevallier et al., *Gene* 11 (1980), side 11-19) ved en fremgangsmåde som den der beskrives af M. Carlson og D. Botstein, *Cell* 28, (1982), side 145-154. Renset gær-DNA digesteredes partielt med restriktions-endonuclease *Sau* 3A, og de opnåede DNA-fragmenter (med en gennemsnitslængde på 5 kb) ligeredes ved hjælp af T4 DNA-ligase i den dephosphorylerede *Bam* HI-position i pF1 1. Efter transformation af  $\text{CaCl}_2$ -behandlede *E. coli*-celler med det ligerede materiale opnåedes der en pulje på ca. 30.000 ampicillinresistente kloner. Disse kloner screenedes ved hjælp af en koloni-hybridiseringsmetode (R.E. Thayer, *Anal. Biochem.*, 98 (1979), side 60-63) med en kemisk syntetiseret og  $^{32}\text{P}$ -mærket oligomer med sekvensen 5'TACCAGGAGACCAACTT3'.

Ifølge data, der er offentliggjort af J. P. Holland (*J. Biol. Chem.*, 255 (1980), side 2596-2605) er denne oligomer komplementær med den DNA-sekvens i GAPDH-genet, som koder for aminosyrerne 306-310 (den sidste aminosyres "wobble base" blev udeladt fra oligomeren). Ved anvendelse af de af R. B. Wallace et al., *Nucleic Acid Res.*, 9 (1981), side 879-894, beskrevne hybridiseringsbetingelser kunne der identificeres seks positive transformanter. En af disse indeholdt plasmid pF1 1-33. Sidstnævnte plasmid indeholdt GAPDH-genet med dets promotor/regulerings-region og dets transcriptions-terminering/polyadenylerings-region. Den ca. 9 kb lange indsatsdel i pF1 1-33 er blevet karakteriseret ved restriktionsenzym-analyser (fig. 4) og partiel nucleotidsekvensanalyse (fig. 5 og 6).

2. Isolering af GAPDH-promotor/reguleringsregionen og dens indførelse i et for preprothaumatin kodende plasmid.

På grundlag af restriktionsenzym-analysen og nucleotidsekvens-dataene for indsatsdelen i plasmid pF1

1-33 isoleredes DNA-initierings/reguleringsregionen i GAPDH-genet som et 800 nucleotider langt Dde I-fragment. Til identifikation af dette promotorfragment digesteredes plasmid pF1 1-33 med Sal I, og de tre opnåede DNA-5 fragmenter underkastedes Southern's filterpapir-hybridiseringstest med den kemisk syntetiserede oligomer (E.M. Southern, J. Mol. Biol. 98 (1975), side 503-517)).

Et positivt hybridiserende, 4,3 kb langt restriktionsfragment isoleredes i præparativ skala ved elektro-10 eluering fra en 0,7% agarosegel og spaltedes derpå med Dde I. Af de dannede Dde I-fragmenter havde kun det største fragment en genkendelsesposition for Pvu II, en spaltningsposition beliggende indenfor GADPH-regulon-15 regionen (fig. 1). Det største Dde I-fragment isolere-

des og inkuberedes med Klenow DNA-polymerase og fire dNTP'er (A. R. Davis et al., Gene 10 (1980), side 205 - 218)) til frembringelse af et DNA-molekyle med stumpe ender. Efter ekstraktion af reaktionsblandingen med phenol/chloroform (50/50 vol/vol), passage af det vandi-20 ge lag gennem en Sephadex G50-søjle og ethanol-fældning af det i porerumfanget tilstedeværende materiale, blev DNA-fragmentet forsynet med den med <sup>32</sup>P-mærkede Eco RI-linker 5'GGAATTCC3' ved inkubation med T4 DNA-ligase.

På grund af Klenow polymerase-reaktionen og den efterføl-25 gende ligering af Eco RI-linkeren rekonstrueredes de oprindelige Dde I-positioner ved enden af regulon-fragmentet. Til inaktivering af ligasen opvarmedes reaktionsblandingen til 65°C i 10 minutter, hvorpå natriumchlorid tilsattes (slutkoncentration 50 mmol/l), og hele blandingen inkuberedes med Eco RI. Inkuberingen afsluttedes30 ved ekstraktion med phenol/chloroform, og DNA'et fældedes to gange med ethanol og resuspenderedes, hvorpå det ligeredes i et passende vektor-molekyle. Eftersom Dde I-regulon-fragmentet var forsynet med Eco RI-positioner,35 kan det let indføres i Eco RI-positionen i pUR 528 (EP-PA 54331) til dannelse af et plasmid, hvori gær-regulonen grænser op til strukturgenet, som koder for preprothaumatin. Sidstnævnte plasmid opnåedes ved spaltning

af pUR 528 med Eco RI, behandling af det lineariserede plasmidmolekyle med (kalvetarms-)phosphatase med henblik på forhindring af selv-ligering, og inkubering af hver af disse vektor-molekyler såvel som det rensede Dde I-  
5 promotorfragment med T4 DNA-ligase. Transformation af de forskellige ligeringsblandinger i  $\text{CaCl}_2$ -behandlede E. coli HB101-celler gav flere ampicillinresistente kolonier. Fra nogle af disse kolonier isoleredes plasmid-DNA (H. C. Birnboim og J. Doly, Nucleic Acids Res. 7  
10 (1979), side 1513-1523)) og inkuberedes med PvuII til undersøgelse af orienteringen af indsatsdelen.

I nomenklaturen angives plasmider indeholdende Eco RI (Dde I)-GAPDH-regulonfragmentet i den korrekte orientering (dvs. at transkription fra GAPDH-regulonen  
15 sker i retning af et efter denne beliggende strukturen) ved tilføjelsen -01 til den oprindelige kode for plasmidet (eksempelvis ændres pUR 528 til pUR 528-01, se fig. 7).

For at lette manipuleringen af plasmider indehol-  
20 dende Eco RI regulon-fragmentet blev en af de to Eco RI-  
positioner ødelagt. To  $\mu\text{g}$  plasmid-DNA (f.eks. pUR 528-01) digesteredes partielt med Eco RI og inkuberedes derpå med fem enheder Mungbønne-nuclease (opnået fra P. L. Biochemicals Inc.) i et totalt rumfang på 200  $\mu\text{l}$  i næ-  
25 værelse af 0,05 mol/l natriumacetat (pH 5,0), 0,05 mol/l natriumchlorid og 0,001 mol/l zinkchlorid i 30 minutter ved stuetemperatur til fjernelse af klæbrige ender. Nucleasen inaktiveredes ved tilsætning af SDS til en slutkoncentration på 0,1% (D. Kowalski et al., Biochemi-  
30 stry 15 (1976), side 4457-4463), og DNA'et fældedes ved tilsætning af 2 rumfang ethanol (i dette tilfælde udeloddes tilsætningen af 0,1 rumfang af 3 mol/l NaAc). Derpå ligeredes lineariserede DNA-molekyler påny ved inkubation med T4 DNA-ligase og anvendtes til transformering af  
35  $\text{CaCl}_2$ -behandlede E. coli-celler. Plasmid-DNA isoleret fra ampicillinresistente kolonier testedes ved spaltnng med Eco RI og Mlu I for tilstedeværelse af en enkelt Eco

RI-position grænsende op til thaumatin-genet (jvf. fig. 7).

Plasmider, som indeholder GAPDH promotor-fragmentet, men kun har en enkelt Eco RI genkendelsesposition, der grænser op til ATG-initieringskodonen for et derefter beliggende strukturgen, betegnes som plasmider af -02-typen (som eksempel nævnes, at pUR 528-01 ændres til pUR 528-01, se fig. 7).

- 10 3. Rekonstitution af den oprindelige GAPDH promotor/reguleringsregion i plasmider, som koder for preprothaumatin, ved indføring af et syntetisk DNA-fragment (fig. 8).

Som vist ved den i fig. 5 afbildede nucleotid-15 sekvens indeholder Eco RI (Dde I)-GAPDH-promotorfragmentet nucleotiderne -850 til -39 i den oprindelige GAPDH-promotor/reguleringsregion. Ikke indeholdt i dette promotorfragment er de 38 nucleotider, som ligger forud for ATG-initieringskodonen for det for GAPDH kodende gen.

20 Det nævnte, 38-nucleotider lange fragment indeholder PuCACACA-sekvensen, der findes i adskillige gærgener. Nævnte PuCACACA-sekvens, der er beliggende ca. 20 bp før positionen for start af translationen (M. J. Dobson et al., Nucleic Acid Res., 10 (1982), side 2625-2637), til-

25 vejebringer den nucleotidsekvens før ATG-kodonen, som er optimal for protein-initiering (M. Kozak, Nucleic Acids Res. 9 (1981), side 5233-5252). Desuden muliggør disse nucleotider dannelsen af en lille løkke-struktur, som kan være involveret i reguleringen af ekspressionen

30 af GAPDH-genet.

På grundlag af ovennævnte argumenter ansås indførelse af de 38 nucleotider imellem Dde I promotor-fragmentet og ATG-kodonen for et derefter beliggende strukturgen for nødvendig til forbedring af promotor-aktivitet såvel som translations-initiering.

Som skematisk vist i fig. 9 opnåedes det manglende DNA-fragment ved kemisk syntese af to partielt overlappende oligomere. Den i den overlappende del af de to

oligonucleotider forekommende Sac I-position indførtes af to grunde: (i) for at muliggøre manipulation af nucleotidsekvensen umiddelbart før ATG-kodonen, herunder konstruktionen af med poly A-hale forsynede gær-ekspressionsvektorer, og (ii) med henblik på at tilvejebringe en spaltningsposition for et enzym, der frembringer 3'-udragende ender, som let og reproducerbart kan fjernes ved inkubation med T4 DNA-polymerase i nærværelse af de fire dNTP'er. Ækvimolære mængder af de to rensede oligomere phosphoryleredes ved deres 5'-ender, hybridiseredes (J.J. Rossi et al., J. Biol. Chem. 257 (1982), side 9226-9229) og omdannedes til et dobbeltstrengt DNA-molekyle ved inkubation med Klenow DNA-polymerase og de fire dNTP'er under betingelser, som er blevet beskrevet for syntese af dobbeltstrengt DNA (A. R. Davis et al., Gene 10 (1980), side 205-218). Analyser af reaktionsprodukterne ved elektroforese gennem en 13% acrylamidgel efterfulgt af autoradiografi viste, at mere end 80% af de som udgangsmateriale anvendte enkeltstrengede oligonucleotider var blevet omdannet til dobbeltstrengt materiale. DNA'et isoleredes ved at lade reaktionsblandingen passere en Sephadex G50-søjle og ved ethanol-fældning af det i porerumfanget tilstedeværende materiale. Derpå phosphoryleredes DNA'et ved inkubation med poly-nucleotid-kinase og digesteredes med Dde I. Til fjernelse af de i sidstnævnte reaktion fraspaltede nucleotider underkastedes reaktionsblandingen to fældninger med ethanol.

Som vist i fig. 8 udførtes kloning af det dannede syntetiske DNA-fragment ved samtidig ligering af dette fragment og et BglIII-DdeI GAPDH-promotorreguleringsfragment i et vektormolekyle, hvorfra den foran ATG-initieringskodon liggende Eco RI-positionen fjernedes ved digestion med Mungbønne-nuclease (jvf. E.). BglIII-DdeI-promotor/reguleringsfragmentet opnåedes ved digestion af plasmidet pUR 528-02 med DdeI og BglIII. Ved adskillelse af de opnåede restriktionsfragmenter ved elektroforese gennem en 2% agarosegel og efterfølgende isolering af

fragmentet fra gelen opnåedes det rensede, 793 nucleotider lange promotor/reguleringsfragment. I plasmidet pUR 528-02 er den forud for ATG-kodonen beliggende nucleotidsekvens 5'-GAATTC(T)ATG-3' (EP-PA 54330 og EP-PA 54331), som er forskellig fra den gunstige nucleotidsekvens, der er angivet af M. Kozak (Nucleic Acids Res. 9 (1981), side 5233-5252). Eftersom formålet i det foreliggende tilfælde var at rekonstituere den oprindelige GAPDH promotor/regulerings/proteininitierings-region så nøjagtigt som muligt, fjernedes Eco RI-positionen med henblik på at ligere det syntetiske DNA-fragment til den opnåede stumpede ende. Fjernelse af Eco RI-positionen opnåedes ved digestion af Eco RI-spaltet pUR 528-02 DNA med Mungbønne-nuclease.

Derefter digesteredes plasmid-DNA'et med BglII og inkuberedes med phosphatase. Efter adskillelse af de to DNA-fragmenter ved elektroforese gennem en 0,7% agarosegel isoleredes det største fragment og anvendtes som vektor, hvori BglII-DdeI promotor-fragmentet såvel som det -DdeI-behandlede syntetiske DNA-fragment ligeredes.

Plasmider, hvori DdeI promotor/reguleringsfragmentet er indført sammen med det Sac I-genkendelsesposition indeholdende syntetiske DNA-fragment angives ved tilføjelsen -03 (eksempelvis nævnes, at pUR 528-02 ændres til pUR 528-03).

#### 4. Indførelse af KARS2-repliconen fra *K. lactis* og TRP1-genet fra *S. cerevisiae* i for preprothaumatin koden- de plasmider.

KARS2-repliconen og TRP1-genet fjernedes fra pEK 2-7 ved digestering med Bgl II, efterfulgt af isolering af 3,5 kb fragmentet fra en 0,7% agarosegel. Dette rensede fragment indsattes i den dephosphorylerede Bgl II-spaltningsposition i pUR 528-03 ved inkubation med T4 DNA-ligase. Transformation af ligeringsblandingen til *E. coli* gav plasmid pURK 528-03 (fig. 10). Transformanter frembragt ved indførelse af plasmid pURK 528-03 i *K. lactis* SD11-celler ved hjælp af  $\text{Li}^+$ -metoden påvistes

at syntetisere thaumatin-lignende proteiner, der undersøgtes som beskrevet af L. Edens et al., Gene 18 (1982), side 1-12, se fig. 11).



## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en stamme af gæren *Kluyveromyces*, k e n d e t e g n e t ved, at man (1) transformerer *Kluyveromyces* gærceller med en vektor, der i 5"-3'-transkriptionsretningen omfatter:
- 5 (a) en i *Kluyveromyces* funktionsdygtig promoterreguleringsregion,  
(b) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid under regulering af nævnte promoterreguleringsregion,  
10 (c) en transkriptionsterminator, og knyttet dertil  
(d) en selektionsmarkør, og  
(e) et i *Kluyveromyces* funktionsdygtigt replikationsbegyndelsessted, og  
15 (2) propagerer de opnåede transformerede celler i et vækstvedligeholdende medium.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte celler transformeres som protoplaster.
- 20 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte celler transformeres som hele celler.
4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at nævnte celler transformeres med autonomt replikerende plasmider eller integrerende plasmider.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at de autonomt replikerende plasmider er valgt blandt plasmider af KARS-typen og plasmider af  
30 2-mikron-typen.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at plasmidet af KARS-typen er pKARS2 eller pKARS12 med henholdsvis deponeringsaccessionsnumrene CBS 8157 eller CBS 353.8.2.
- 35 7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at plasmidet af 2-mikron-typen er pPTY75-LAC4

med deponeringsaccessionsnummeret CBS 351.82.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g -  
n e t ved, at de integrerende plasmider indeholder  
Kluyveromyces-DNA.

5 9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g -  
n e t ved, at det integrerende plasmid er pL4 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 352.82.

10 10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at Kluyveromyces-cellerne er *K. lactis*  
eller *K. fragilis*.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at de transformerede gærceller inkuberes i  
et medium indeholdende kaliumchlorid.

15 12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e -  
t e g n e t ved, at koncentrationen af kaliumchlorid  
er ca. 0,6 M.

20 13. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den for et polypeptid kodende DNA-  
sekvens koder for chymosin eller én af dets precursor-  
former eller  $\beta$ -galactosidase.

25 14. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at Kluyveromyces-cellerne hidrører fra  
*K. lactis* SD11 lac4 trp1 eller *K. lactis* SD69 lac4 med  
henholdsvis deponeringsaccessionsnumrene CBS 8092 eller  
CBS 8093.

30 15. Fremgangsmåde til fremstilling af et poly-  
peptid i Kluyveromyces, k e n d e t e g n e t ved, at  
man dyrker Kluyveromyces-celler opnået ifølge et vil-  
kårligt af kravene 1-14.

30 16. Anvendelse af Kluyveromyces som vært for  
transformation og ekspression af fremmede gener.

17. Transformeret Kluyveromyces-celle, k e n -  
d e t e g n e t ved, at den indeholder et rekombinant-  
DNA, som omfatter:

35 (a) et strukturelt gen, der koder for chymosin  
eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galacto-  
sidase,

41

(b) en autonomt replikerende sekvens hidrørende fra Kluyveromyces (KARS),

(c) en gærregulon og

(d) en selektionsmarkør,

5 idet nævnte Kluyveromyces er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

18. Transformeret Kluyveromyces-celle, k e n d e -  
t e g n e t ved, at den indeholder et rekombinant-DNA,  
10 som omfatter:

(a) et strukturelt gen, der koder for chymosin eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galactosidase,

15 (b) en 2-mikron-plasmidreplikationssekvens hidrørende fra Saccharomyces,

(c) en gærregulon og

(d) en selektionsmarkør,

idet nævnte Kluyveromyces er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

19. Transformeret Kluyveromyces-celle, k e n -  
d e t e g n e t ved, at den indeholder et rekombinant-DNA, som omfatter:

25 (a) et strukturelt gen, der koder for chymosin eller én af dets precursorformer eller  $\beta$ -galactosidase,

(b) en sekvens, der er homolog med en genomisk Kluyveromyces-sekvens,

(c) en gærregulon og

30 (d) en selektionsmarkør,

idet nævnte Kluyveromyces er i stand til at eksprimere chymosinet eller dets precursorform eller  $\beta$ -galactosidasen, som rekombinant-DNA'et koder for.

20. Transformeret Kluyveromyces-celler ifølge  
35 krav 17, k e n d e t e g n e t ved, at den er K. lactis SD11 lac4 trp1 (pKARS12), idet den oprindelige stamme har deponeringsaccessionsnummeret CBS 8092 og plasmidet CBS 353.82.

21. Transformeret Kluyveromyces-celle ifølge krav 18, k e n d e t e g n e t ved, at den er K. lactis SD69 lac4 (PTY75-LAC4), idet den oprindelige stamme har deponeringsaccessionsnummeret CBS 8093 og plasmidet  
5 CBS 351.82.

22. Transformeret Kluyveromyces-celle ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at den er K. lactis SD69 lac4 (pL4), idet den oprindelige stamme har deponeringsaccessionsnummeret CBS 8093 og plasmidet CBS  
10 352.82.

23. Kluyveromyces-ekspressionsvektor, k e n d e t e g n e t ved, at den i 5'-3'-transkriptionsretningen omfatter:

15 (a) en i Kluyveromyces funktionsdygtig promoterreguleringsregion,

(b) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid under regulering af nævnte promoterreguleringsregion,

20 (c) en transkriptionsterminator, og knyttet dertil

(d) en selektionsmarkør og

(e) et i Kluyveromyces funktionsdygtigt replikationsbegyndelsessted.

24. Kluyveromyces-ekspressionsvektor ifølge krav  
25 23, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter en sekvens, der er homolog med en genomisk Kluyveromyces-sekvens.

25. Kluyveromyces-ekspressionsvektor ifølge krav  
23, k e n d e t e g n e t ved, at replikationsbegyndelsesstedet er 2-mikron-replikationsbegyndelsesstedet.  
30

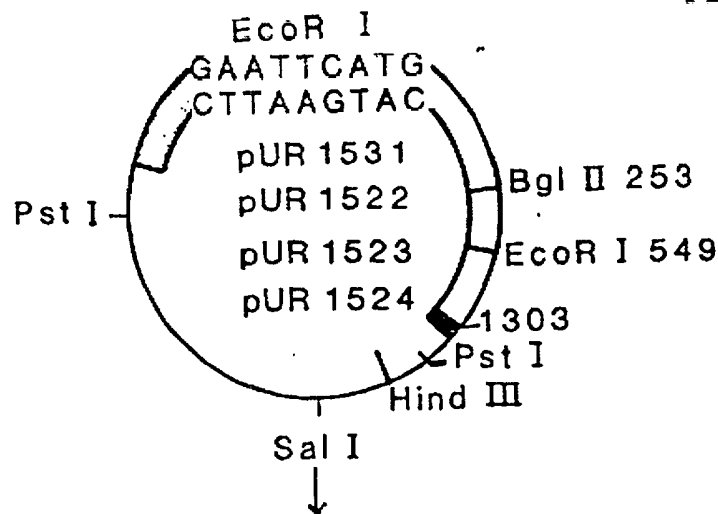
26. Kluyveromyces-ekspressionsvektor ifølge krav  
23, k e n d e t e g n e t ved, at replikationsbegyndelsesstedet er KARS-sekvensen.

27. Kluyveromyces-ekspressionsvektor ifølge krav  
35 23, k e n d e t e g n e t ved, at polypeptidet er chymosin eller én af dets precursorformer.

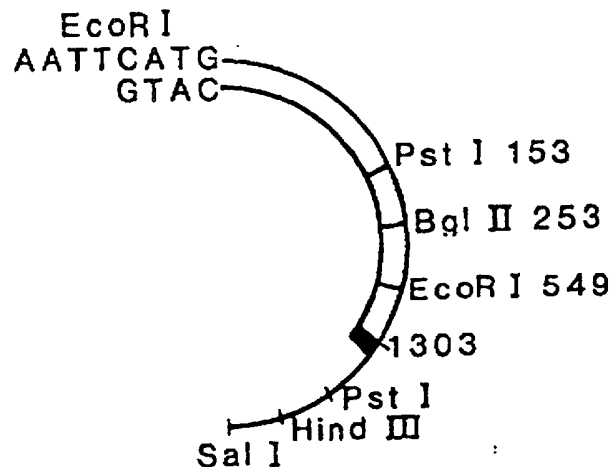
43

28. Plasmid pPTY75-LAC4 som indeholdt i E. coli DG75 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 351.82
29. Plasmid pL4 som indeholdt i E. coli DG75 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 352.82.
- 5 30. Plasmid pKARS12 som indeholdt i E. coli JA221 med deponeringsaccessionsnummeret CBS 353.82

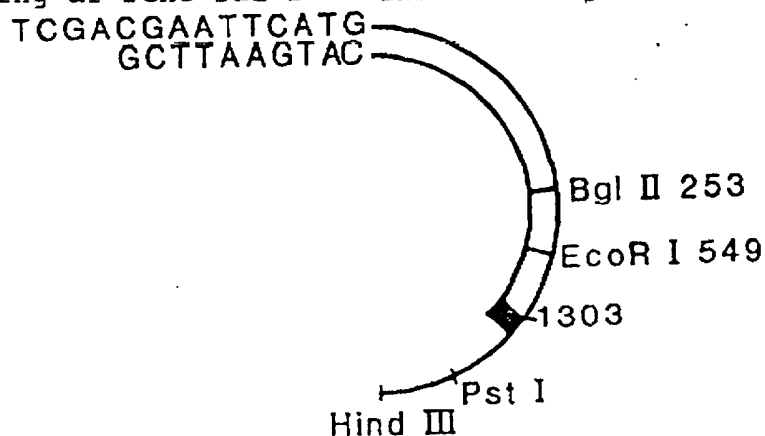
Figur 1



1. Partiel EcoR I digestion (i nærværelse af ethidiumbromid)
2. Sal I digestion
3. Udvinding af rene EcoR I-Sal I fragmenter (1900-2150 bp) fra agarosegel

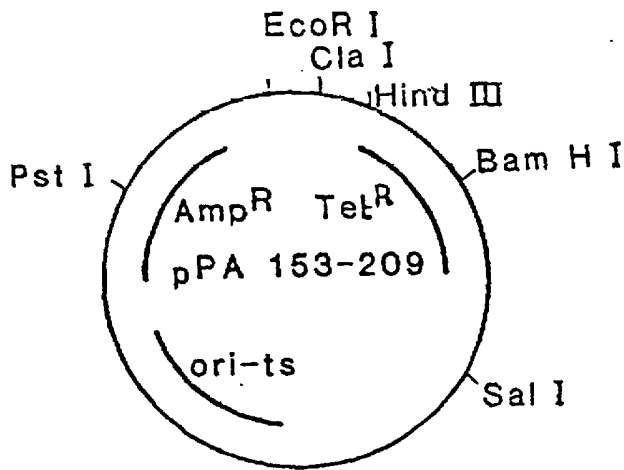


- 1) Udfyldning af kohæasive ender med DNA polymerase (Klenow-fragment), 4 dNTP'er
- 2) Tilsætning af Sal I - linker  $\begin{pmatrix} \text{CGTCGACG} \\ \text{GCAGCTGC} \end{pmatrix}$  med T4 DNA-ligase, ATP
- 3) Hind III digestion
- 4) Sal I digestion
- 5) Udvinding af rene Sal I - Hind III fragmenter fra agarosegel

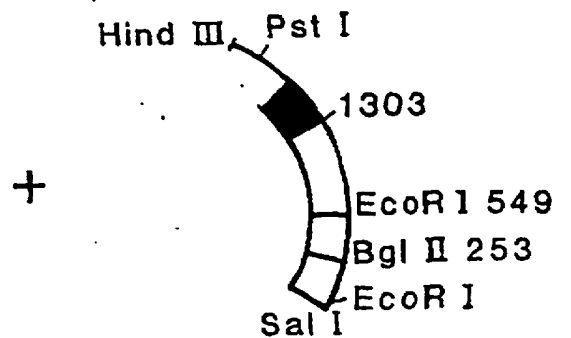
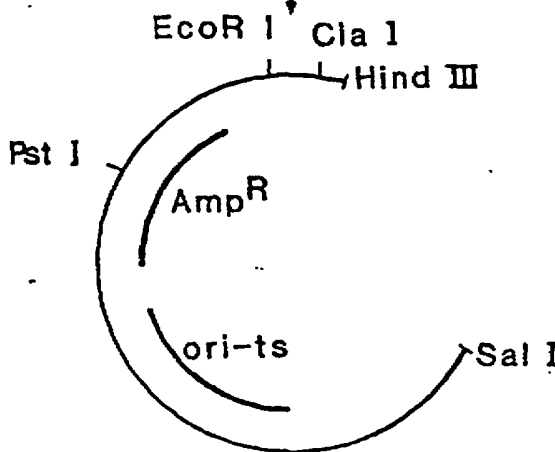


Fragmenter A, B, C, D

Figur 1 (fortsat)

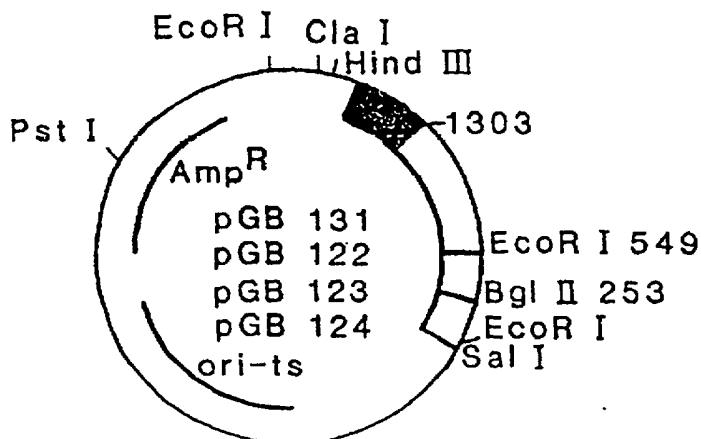


1. Hind III digestion
2. Sal I digestion
3. Udvinding af rent 3,3 Kb fragment fra agarosegel

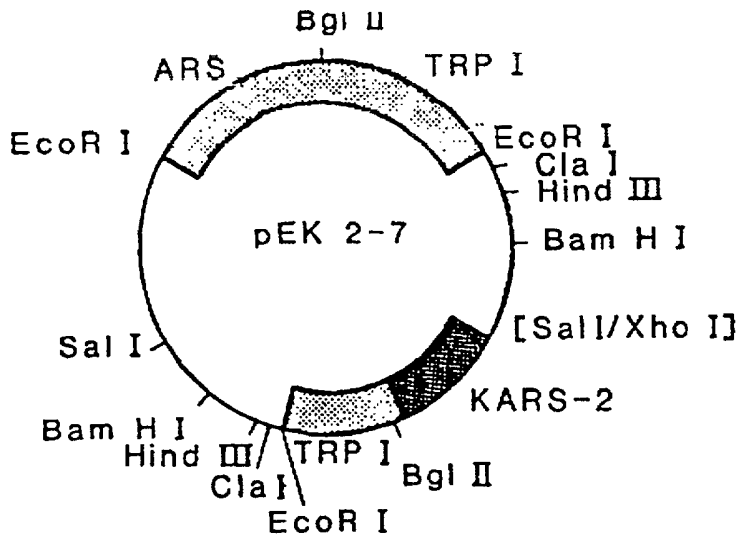


Fragmenter A, B, C, D

1. Ligering med T4 DNA-ligase, ATP
2. Transformation til E. coli HB 101

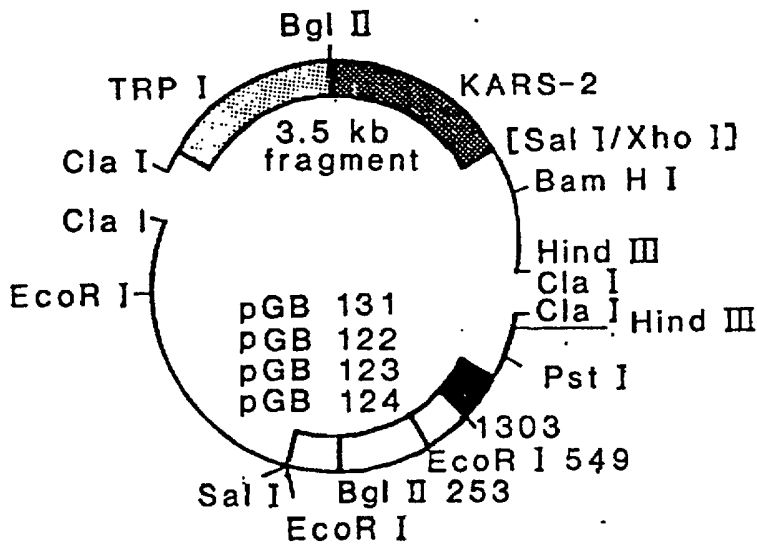


Figur 2

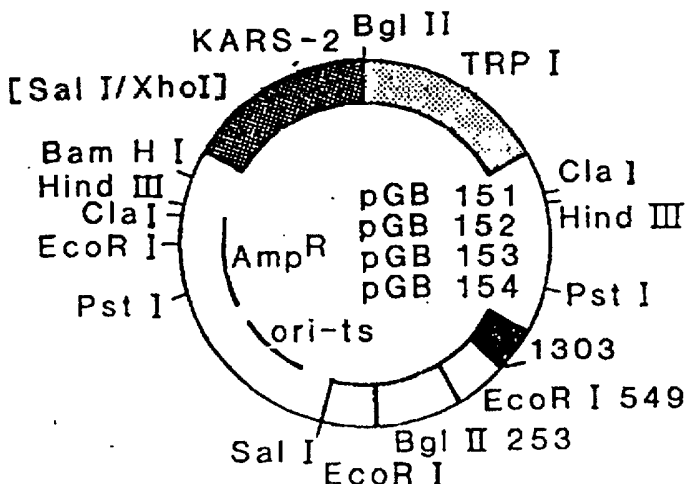


1. Cla I digestion
2. Udvinning af rent 3,5 Kb fragment fra agarosegel
3. Blanding med Cla I-digesteret pGB 131

pGB 122  
pGB 123  
pGB 124

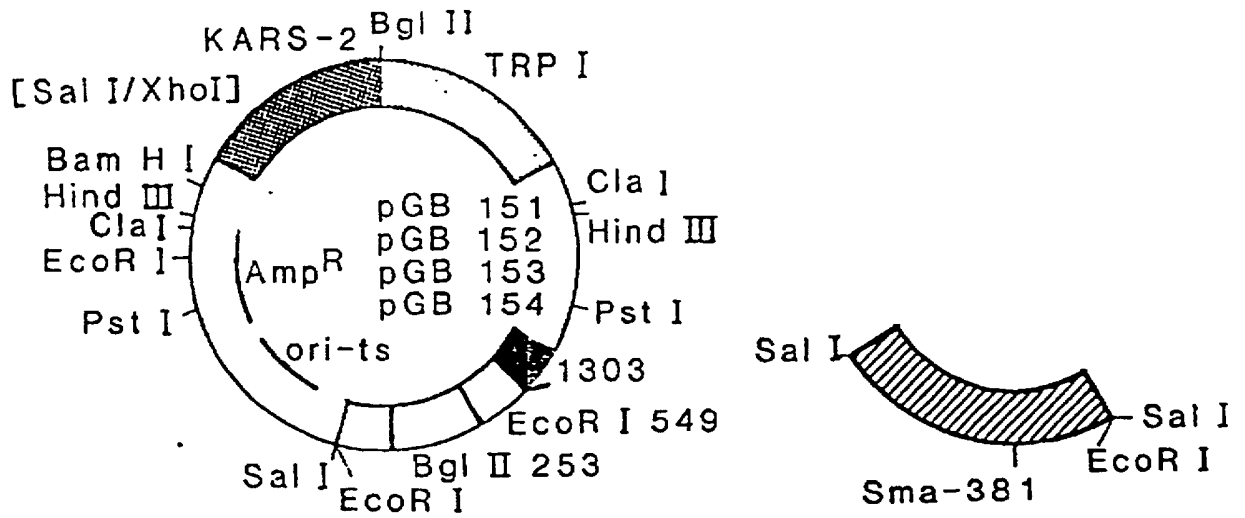


1. Ligering med T4 ligase, ATP
2. Transformation af E.coli JA 300
3. Selektion for Trp<sup>+</sup>-transformanter





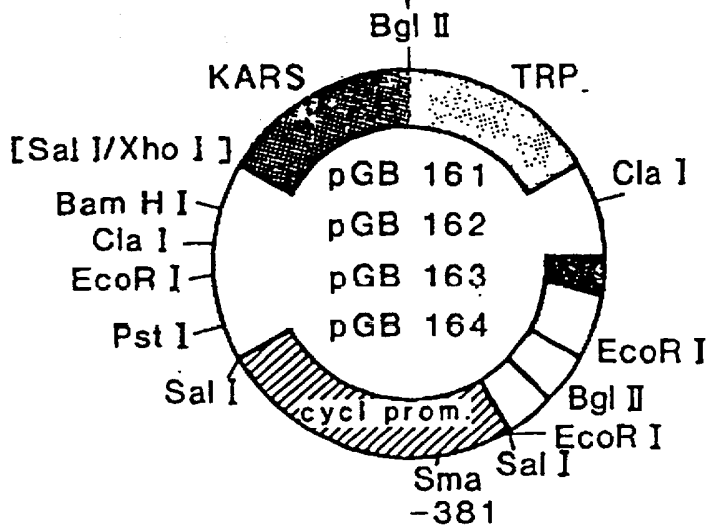
Figur 3

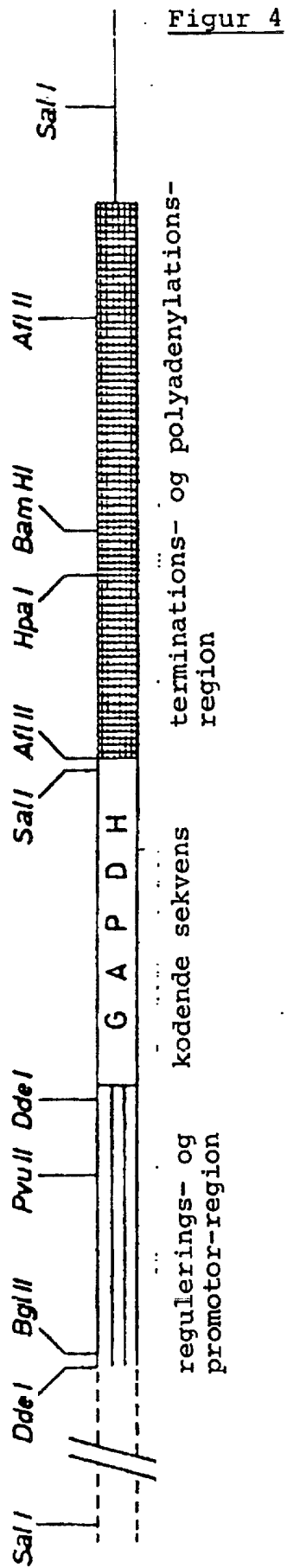


Sal I digestion

cytochrome c1  
promotor-fragment

1. ligering med T4 DNA-ligase
2. transformation af E. coli HB 101





Figur 4

-840	-830	-820	-810	-800	-790
GAATTCCTCA	GTTTCAAGAT	CTTTTAATGT	CCAAAACCAT	TTGAGCCGAT	CTAAATACTT
-780	-770	-760	-750	-740	-730
CTGTGTTTTC	ATTAATTTAT	AAATTGTA	CTTTTAAGAC	ATGGAAAGTA	CCAACATCGG
-720	-710	-700	-690	-680	-670
TTGAAACAGT	TTTTCATTTA	CATATGGTTT	ATTGGTTTTT	CCAGTGAATG	ATTATTTGTC
-660	-650	-640	-630	-620	-610
GTTACCCTTT	CGTAAACTT	CAAACACGTT	TTTAAGTATT	GTTT <u>AGTTGC</u>	TCTTTCGACA
-600	-590	-580	-570	-560	-550
<u>TATATGATTA</u>	TCCCTGCGCG	GCTAAAGTTA	AAGATGCAAA	AAACAGAAGA	CAACTGAAGT
-540	-530	-520	-510	-500	-490
TAATTTACGT	CAATTAAGTT	TTCCAGGTA	ATGATGTTTT	GGGCTTCCAC	TAATTCAATA
-480	-470	-460	-450	-440	-430
AGTATGTCAT	GAAATACGTT	GTGAAGAGCA	TCCAGAAATA	<u>ATGAAAAGAA</u>	<u>ACAACGAAAC</u>
-420	-410	-400	-390	-380	-370
<u>TGGGTCGGCC</u>	<u>TGTTGTTTCT</u>	<u>TTTCTTTACC</u>	<u>ACGTGATCTG</u>	<u>CGGCATTTAC</u>	<u>AGGAAGTCGC</u>
-360	-350	-340	-330	-320	-310
<u>GCGTTTTGCG</u>	<u>CAGTTGTTGC</u>	<u>AACGCAGCTA</u>	<u>CGGCTAA</u>	<u>CAA</u>	<u>AGCCTAGTGG</u>
-300	-290	-280	-270	-260	-250
ATGTGTTAGG	GCCTAAACT	GGTGGTGACA	GCTGAAGTGA	ACTATTCAAT	CCAATCATGT
-240	-230	-220	-210	-200	-190
CATGGCTGTC	ACAAAGACCT	TGCGGACCGC	ACGTACGAAC	ACATACGTAT	GCTAATATGT
-180	-170	-160	-150	-140	-130
<u>GTTTTGATAG</u>	<u>TACCCAGTGA</u>	<u>TCGCAGACCT</u>	<u>GCAATTTTTT</u>	<u>TGTAGTTTG</u>	<u>GAAGAATATA</u>
-120	-110	-100	-90	-80	-70
<u>TAAAGGTTGC</u>	<u>ACTCATTCAA</u>	<u>GATAGTTTTT</u>	<u>TTCTTGTGTG</u>	<u>TCTATTICATT</u>	<u>TTATTATTGT</u>
-60	-50	-40	-30	-20	-10
TTGTTTAAAT	GTTAAAAAAA	CCAAGAACTT	AGTTTCAAAT	TAAATTCATC	ACACAAACAA
-1					
ACAAAACAAA	ATG				

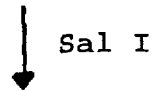
Fig. 5

7	17	27	37	47	57
TAAATTTAAC	TCCTTAAGGT	TACTTTAATG	ATTTAGTTTT	TATTATTAAT	AATTCATGCT
67	77	87	97	107	117
CATGACATCT	CATATACACG	TTTATAAAAC	TTAAATAGAT	TGAAAATGTA	TTAAAGATTG
127	137	147	157	167	177
CTCAGGGATT	CGATTTTTTT	GGAAGTTTTT	GTTTTTTTTT	CCTTGAGATG	CTGTAGTATT
187	197	207	217	227	237
TGGGAACAAT	TATACAATCG	AAAGATATAT	GCTTACATTC	GACCGTTTTA	CCCCTGATCA
247	257	267	277	287	297
TTATCCTATA	GTAACATAAC	CTGAAGTATA	ACTGACACTA	CTATCATCAA	TACTTGTCCG
307	317	327	337	347	357
ATGAGAACTC	TGTGAATAAT	TAGGCCACTG	AAATTTGATG	CCTGAAGGAC	CGGCATCAGG
367	377	387	397	407	417
TATCTTCGAT	AAAGCACTTA	GATCACACT	AATTGGCITT	TCGCCGCATA	TGGTGTTCCT
427	437	447	457	467	477
GGTGATTCC	AAGTATTGTT	TCCAAGCATC	GTACCTTTCA	CCATTTGGAG	TATCACTTAG
487	497	507	517	527	537
CGTTTTTCATC	GCATATCTGT	CCATTATTTT	AATGGATTGC	CAAATGGGAA	CTTGATGATG
547	557	567	577	587	597
TGAAAGTTTA	CTCCTAGCAG	TTAACATTTT	CACTTCTGTT	TCCTCTTTAA	TGGCATTTCAT
607	617	627	637	647	657
TCAACTCTTC	CTTGCTTACC	GACGTACCCG	TATATTGGAA	TCTGCGGCCC	CAATGACAGA
667	677	687	697	707	710
AATCACTGCT	TACAATGAAT	AAATTGTTTCG	GATCCTTAAT	GTAATCCGAC	AAAATATTAC
727	737	747	757	767	777
CAATGCAACG	ATCAACATCA	ACGCTGTTAT	GAGAAACCAT	CATGGGAATT	ACCTTCACCG
787	797	807	817	827	837
TATCTAAAGA	AATTTCTCTC	CATTTCAAAG	TTTCCACCAA	CATGGGGAGC	TGCATCTCTA
847	857	867	877	887	897
AGGAATGTTT	AGCCATATCA	GTGTCATGAT	CCATTGGCCT	AAACAGCTTC	TTTCCGTTCT
907	917	927	937	947	957
CAGGATACTC	CTTCTGTATT	AATGTTTTAC	ACAAGTCTGT	ATCCACTTTC	AGATTACCCA
967	977	987	997	1007	1017
AGGGCGTCTC	TAGCTCACTG	AATGCACTAA	CTAAAATTTG	GTTTTTGAAA	TAGATGTGAT
1027	1037	1047	1057	1067	1077
GCGACGGCCC	CAAGATAAAT	ATTCTCTTAA	CATTACGGTT	CAAATCCAAC	GATGGGTACG
1087	1097	1107	1117	1127	1137
AGTAGGCCAT	AGTGGGTCCA	CAATACCTGT	AACCGGCATG	AGGACATATG	ATAATTCTGG
1147	1157	1167	1177	1187	1197
CGTTGTGAAT	TGGGCCTTTA	AGGGTACTTT	TGATCAAGTA	TGTATGCGGT	TGTTGAGATA
1207	1217	1227	1237	1247	1257
ATTCTTGGGC	TCTATTGGAA	TACCATGAGC	CTGCATGTGT	TGCTGGACGT	ATTGACATGT
1267	1277	1287	1297	1307	1317
TTGAAAAT	CTATTCTTTG	CACTGTAGTC	CACCTAAGCC	ACCGACTAGG	ACCACTTCAC
1322					
TTAAG					

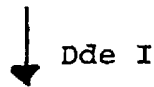
Fig. 6

Figur 7

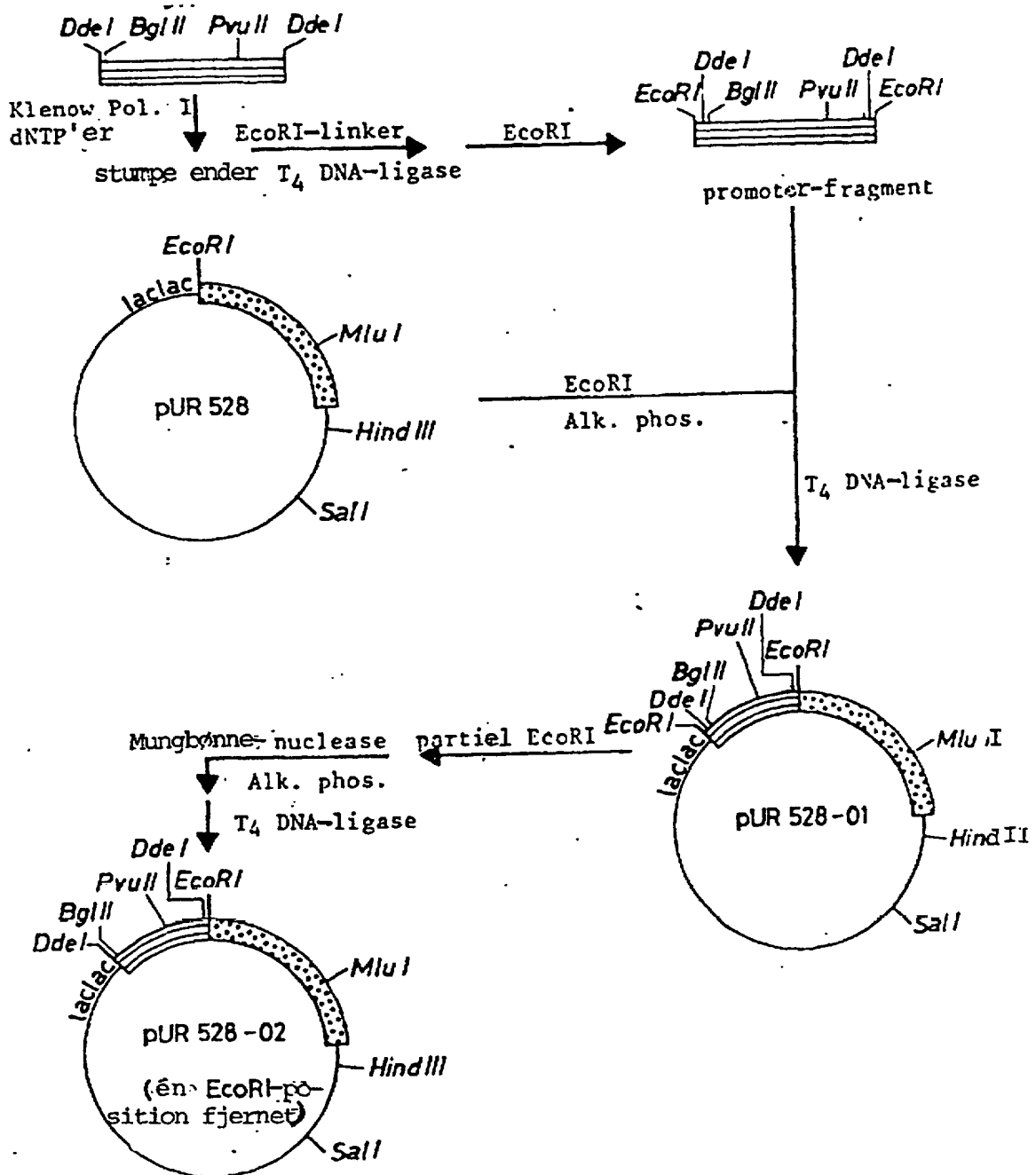
pFl 1-33  
indeholder GAPDH gen  
i 9 kb indsatsdel



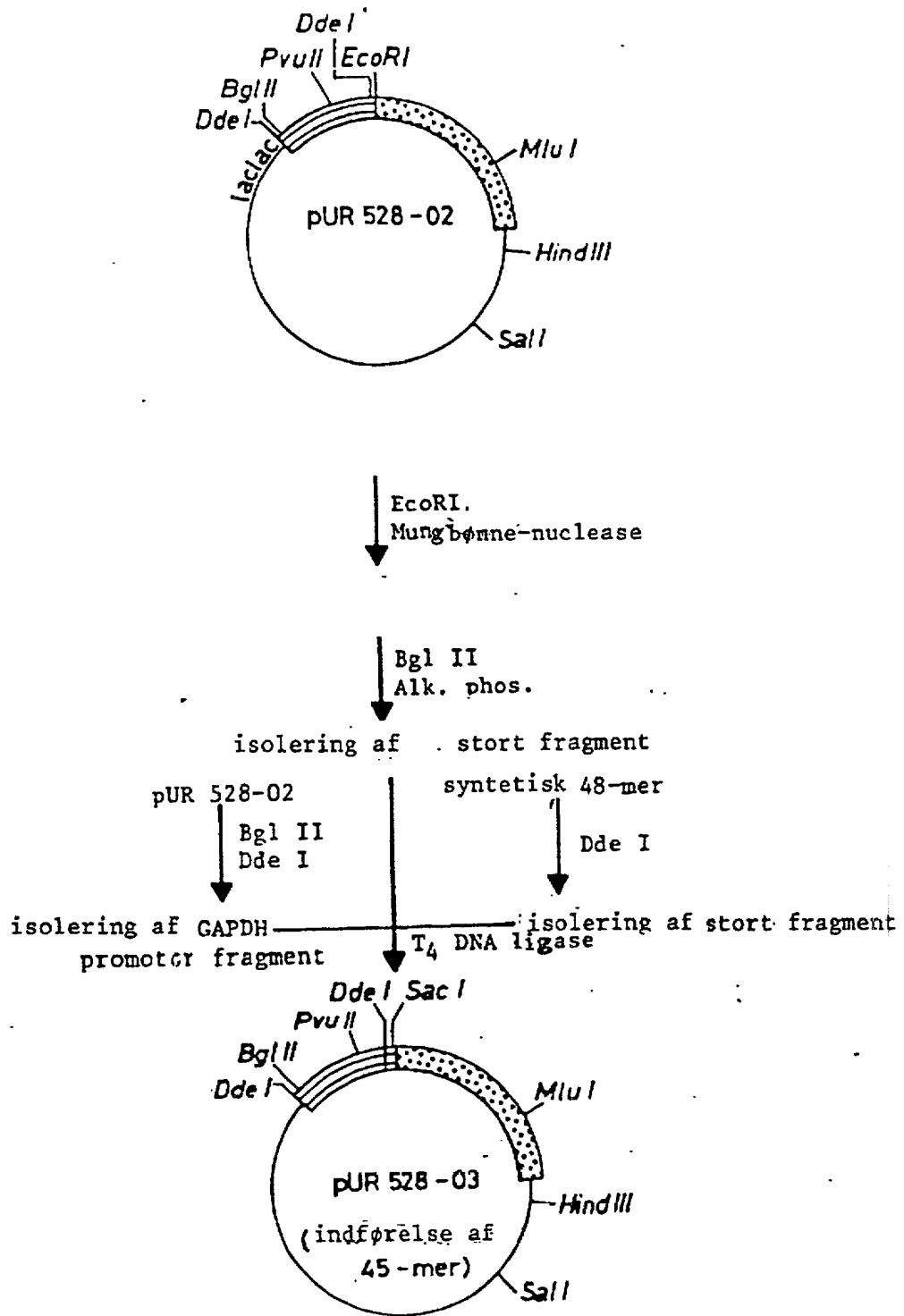
isolering af 4,3 kb GAPDH  
promotor-indeholdende fragment



isolering af Pvu II position-indeholdende  
promotor-fragment



Figur 8



Figur 9Sac I

5' CCC.TTA.GTT.TCA.AAT.TAA.AGA.GCT.CAT.CAC 3'

3' TCT.CGA.GTA.GTG.TGT.TTG.TTT.GTT.TTG.TTT 5'

Klenow DNA-polymerase  
: dNTP'erDde ISac I

5' CCC.TTA.GTT.TCA.AAT.TAA.AGA.GCT.CAT.CAC.ACA.AAC.AAA.CAA.AAC.AAA 3'

3' GGG.AAT.CAA.AGT.TTA.ATT.TCT.CGA.GTA.GTG.TGT.TTG.TTT.GTT.TTG.TTT 5'

## Dde I

Sac I

5' TTA.GTT.TCA.AAT.TAA.AGA.GCT.CAT.CAC.ACA.AAC.AAA.CAA.AAC.AAA 3'

3' CAA.AGT.TTA.ATT.TCT.CGA.GTA.GTG.TGT.TTG.TTT.GTT.TTG.TTT 5'

## Sac I

T<sub>4</sub> DNA-polymerase, dNTP'erT<sub>4</sub> DNA-ligase

5' TTA.GTT.TCA.AAT.TAA.AGC.ATC.ACA.CAA.ACA.AAC.AAA.ACA.AA 3'

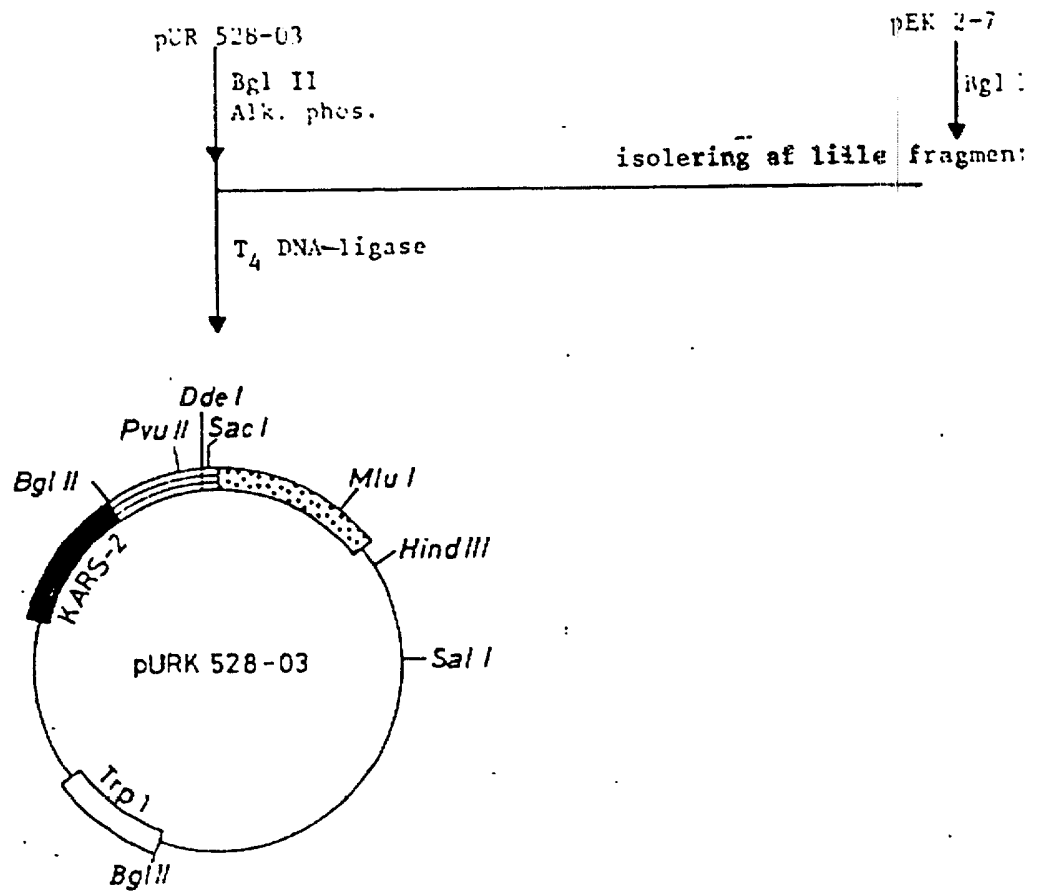
3' CAA.AGT.TTA.ATT.TCG.TAG.TGT.GTT.TGT.TTG.TTT.TGT.TT 5'

Fig. 7b

5' A.GCT.CAT.CAC.ACA.AAC.AAA.CAA.AAC.AAA 3'

3' TA.GTC.TGT.TTG.TTT.GTT.TTG.TTT 5'

Fig. 10





Figur 11

Analyse af S-mærkede proteiner fra *K. lactis* SD11 celler transformeret med pURK 528-03.

*K. lactis* SD11 celler dyrkedes i nærværelse af  $^{35}\text{SO}_4^-$ . De mærkede celler omdannedes til protoplaster og proteinerne immunopræcipiteredes og analyseredes på PAA-geler som beskrevet af L. Edens et al., *Gene* 18 (1982), 1.

Bånd 5:

Immunopræcipiterede- $^{35}\text{S}$ -mærkede proteiner fra *K. lactis* SD11 celler transformeret med plasmid pEK2-7.

Bånd 7:

Radioaktivt mærkede markerings-proteiner (Amersham).

Bånd 8:

Immunopræcipiterede  $^{35}\text{S}$ -mærkede proteiner fra *K. lactis* SD11 celler transformeret med plasmid pURK528-03.

1 2 3 4 5 6 <sup>A</sup>7 <sup>b</sup>8 9 10 11

└──────────┘

